

FITC 標識抗ヒト IgG 抗体(もしくは IgM 抗体)と反応させ、蛍光顕微鏡下で観察した。

#### 6) ELISA

SFTSV 中国株 HB29 を感染させた Huh7 細胞もしくは SFTSV-N 蛋白質発現バキュロウイルスを感染させた Sf9 細胞を 1% NP40 で溶解し、UV 不活化後、その上清を抗原とした。ELISA 用マイクロプレートに吸着後、患者検体(血液、血清、血漿)を反応させ、更に HRP 標識抗ヒト IgG 抗体と反応させた。基質である ABTS 液で発色させ、OD<sub>405</sub> の吸光度を測定した(図 1)。バックグラウンドの測定に非感染 Huh7 細胞もしくはコントロールバキュロウイルス感染 Sf9 細胞を用いた。

#### 7) 中和抗体測定

ウイルスとしては SFTSV 中国株 HB29 あるいは同 GP 蛋白質外套シュードタイプを用いた。SFTSV を用いた場合、ウイルスを患者検体と混合し一定時間培養後、Vero 細胞に感染させ、3 日後に間接蛍光抗体法によりウイルス抗原の有無を観察した。シュードタイプを用いた場合、ウイルスを患者検体と混合し一定時間培養後、Vero 細胞に感染させ、1 日後にレポーター(ルシフェラーゼ)の発現量を測定した。

#### 8) SFTS の病理学的解析

##### a) 検体

国立感染症研究所感染病理部に SFTS 病理診断のためにコンサルテーションされた症例のホルマリン固定パラフィン包埋組織検体を用いた。一部の症例では、凍結生組織検体を用いた検索も行った。

##### b) 免疫組織化学

パラフィン包埋切片を脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・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(国立感染症研究所 西條政幸 先生より供与)を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化剤(ニチレイ)中で 121°C 20 分オートクレーブ処理によって抗原賦活化した。その後、過酸化水素水・メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの阻止を室温 30 分で処理し、1 次抗体(1000 倍希釈)を加え 4°C で一晩インキュベートした。その後、ENVISION+ (DAKO)を用いてプロトコル通り免疫染色を実施した。

##### c) 定量的 RT-PCR 法

パラフィン切片から Pure Link FFPE RNA isolation kit (Invitrogen)で RNA を抽出し、SFTSV N gene を特異的に検出するプローブ、プライマーセットを用いて、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)にて SFTSV の遺伝子断片の増幅を行った。同時に内在性のコントロールとして beta-actin の検出を行った。

用いたプライマー・プローブセットは、

SFTSV(CHN)

Forward and RT-primer: 5'-CCCTG

ATGCCTTGACGATCT-3',

Reverse primer:

5'-TGATTGGGTGAAGGATACGAAGTT-3',

Probe:

5'-(FAM)TTGCCTCGAGTCAGGGCAAAGACAA(BHQ1)-3']

SFTSV(JPN1)

Forward and RT-primer:

5'-CCCTGATGCCTTGACGATCT-3',

Reverse primer:

5'-GGGTGAGRGACACAAAGTTCA-3',  
Probe:  
5'-(FAM)CATTGTCTTTGCCCTGACTCG  
AGGCA(BHQ1)-3'],

SFTSV(JPN2)

Forward and RT-primer:

5'-CCCTGATGCCTTGACGATCT-3',

Reverse primer:

5'-TGATTGGGTGAGGGACACA

AAGTT-3', Probe:

5'-(FAM)TTGCCTCGAGTCAG

GGCAAAGACAA(BHQ1)-3'

を使用した。

(倫理面からの配慮について)

書面によるインフォームドコンセントや匿名化のもと研究調査を行い、方法は国立感染症研究所内の研究倫理委員会の承認を得られたものを用いた。動物実験も同動物実験委員会の承認を得て実施された。病理検体を用いた SFTSV の検索は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行った(承認番号 427)。

## C. 研究結果

### 1) 日本における SFTSV に関する後方視的な臨床的・疫学的調査

後方視的調査として厚生労働省結核感染症課より全国の医療機関に情報提供及び協力の依頼を行い(厚生労働省結核感染症課長健感発 0130 第 1 号, 表 1), SFTSV を疑った患者の情報および検体収集を行った。検体については SFTSV 中国株(HB29)の検出用に準備されていた RT-PCR 法による遺伝

子検出, HB29 株感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法による抗体検出, Vero 細胞を用いたウイルス分離等のウイルス学的検査が実施された。送付された SFTSV 疑い患者 23 名の検体を解析したところ, うち 10 名(男 8 名, 女 2 名, うち 5 名死亡)が SFTSV 感染に罹患していたことが判明した。7 名は遺伝子陽性かつウイルス分離陽性により, 1 名は遺伝子陽性かつ抗 SFTSV に対する IgM 陽性により, 残る 2 名は抗 SFTSV に対する IgG 陽性により SFTSV と診断された。SFTSV 患者はいずれも 50 歳以上(図 2A), 発症時期は 2005 年(2 名)・2011 年(2 名)・2012 年(6 名)であり(図 2B), 発症月別では 4 月から 12 月(図 2C), 居住地は西日本の 6 県(長崎県, 宮崎県, 佐賀県, 山口県, 愛媛県, 高知県)であった(図 2D)。初めて SFTSV と診断された患者を含めた 11 名の臨床症状を解析した(表 2)。発熱, 全身倦怠感, 消化器症状が全例で認められ, 末梢血液検査では白血球減少および血小板減少が, 生化学検査によって血中 AST・ALT・LDH・CK の上昇が全例で認められた。BUN および CRE の上昇も約半数で認められ腎不全を伴う患者が多かった。血液凝固系の異常も全ての患者で認められた。11 例中 9 人で出血症状が認められた。蛋白尿および血尿も全ての患者で認められた。11 人中 5 人の患者で骨髓検査が実施され, 全ての患者で骨髓血球貪食像が認められた(図 3)。11 人中 9 人の患者で神経症状が認められた(表 2)。

### 2) 血清, 脳脊髄液, 尿からの SFTSV ゲノム検出

血中で SFTSV ゲノムが検出されても, 同時期に採取された脳脊髄液, 尿からは検出されてもその量は少なかった。急性期の血中

SFTSVゲノム量は、死亡した患者は生存している患者と比較して約10倍以上高く、その差は統計学的に有意であった(図4)。

3) 日本分離株の中国株と比較した系統樹解析

日本で分離された株は中国株と比較して新たに独立したクラスターを形成しており、この日本株が形成するクラスターには既存の中国株は一つも含まれていないことが明らかとなった(図5)。この結果はS, M, Lセグメントすべてで共通であった。更に日本株のうち1株は他の株が形成するクラスターから外れたものであった(図5)。

4) SFTSVに対する抗体検出システム開発

SFTSVに対する抗体検出法として、ELISA法および中和抗体測定法の確立と前述の間接蛍光抗体法の抗体検出における有用性を評価した。ELISA法では、SFTSV中国分離株HB29を感染させたHuh7細胞の溶解液を抗原とした場合に良好な反応性が認められ、回復患者の経時的血中抗体価は有意に上昇した[図6、バックグラウンドとして非感染Huh7細胞の溶解液を用い、OD値を差し引く(図1)]。SFTSVの組換えN蛋白質(SFTSV-rNP)を発現させる組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫 Sf9 細胞の溶解液を抗原としたELISAでは、検出感度が感染性SFTSVを抗原にした場合に比較して低い傾向があった。しかし、回復期に採取された血清が全てそれで陽性を呈し、診断における有用性が認められた(図6)。中和抗体測定法では、SFTSVを用いた方法とSFTSVのGP蛋白質(SFTSV-GP)をまとったシュードタイプウイルスを用いた2つの方法を確立し、中和活性を明確に測れることを確認した(図7、シュードタイプウイルスのデータ等は研究分担者有川より報告)。間接蛍光抗体法では、抗原と

してSFTSV感染Vero細胞もしくはウイルスのN蛋白質発現HeLa細胞のいずれを用いた場合でも、Huh7-ELISAでの結果と一致する反応性が認められた(図8、表3)。

5) SFTSの病理学的解析

a) SFTS症例の病理組織像

平成25年末までに国立感染症研究所感染病理部に検査依頼されたSFTS剖検症例は6例であった。これら6例には、いずれもリンパ節や脾臓などのリンパ系組織にリンパ芽球様細胞、組織球、リンパ球などの浸潤と広範な壊死が見られた。また、壊死部にはghost cellと核崩壊産物が目立つが、好中球などの顆粒球浸潤が目立たず、肉芽腫の形成も見られなかった(図9)。ダニ咬傷側に近いリンパ節に腫大を認める症例では、同リンパ節に上記のような所見が見られ、壊死性リンパ節炎の所見であった。さらに、これらのリンパ節や脾臓、骨髄には著明な血球貪食像(図3)が見られた。その他の臓器の変化は真菌感染症や肝小葉壊死などが見られる症例もあったが、症例により多様性に富み、共通して見られる所見としては、リンパ系組織の壊死と血球貪食像であった。

b) 免疫組織化学によるSFTSV検索

抗SFTSV NP抗体を用いた免疫組織化学では、壊死を伴うリンパ節や脾臓などのリンパ系組織に細胞質が明瞭に染色されるリンパ芽球様の抗原陽性細胞が多数見られた(図10)。骨髄、肝臓、副腎、腎臓、心臓、肺などの実質臓器には抗原陽性の芽球様細胞の浸潤が見られたが、壊死を伴うリンパ節や脾臓などに比べると、陽性細胞数は少なく、それぞれの臓器実質細胞の感染も明らかではなかった。

c) ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた SFTSV 遺伝子検索

一般的に剖検例では死後、時間が経過するとともに組織中の DNase, RNase の働きにより、DNA, RNA の分解が進む。さらにホルマリン固定により DNA は通常 200bp 以下に断片化される。RNA に至っては剖検例では 100bp 以下になることも少なくなく、ホルマリン固定した剖検例のサンプルは、遺伝子検出にとっては条件の悪いサンプルである。しかしながら、免疫組織化学で用いた切片と同じ検体を用いて遺伝子検査を行うことにより、抗体の非特異反応という問題を常に抱える免疫組織化学の結果を補完することができ、感染症の病理診断においては非常に有用である。また、Real-time PCR では目的遺伝子のコピー数が検出されることで、病原体と疾患との関連を考える上で大きな参考となる。特に、SFTS の病理に関しては不明な点が多く、さらに抗体の特異性について完全に保証されていないことから、このような遺伝子検査と免疫組織化学を組み合わせる必要がある。ホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) から抽出した核酸は断片化しているため、amplicon が 200bp 以上の通常の PCR では極端に感度が落ちる。そこで、FFPE サンプルから抽出した核酸の遺伝子検査には、amplicon が 200bp 以下の real-time RT-PCR が有用である。感染病理部では日本国内で症例が発見される前に、中国で分離された株の遺伝子配列を参考に病理組織検体に至適化した real-time RT-PCR の系を立ち上げていた (SFTSV(CHN)プライマー・プローブセット)。当初の SFTS 病理検査では、その系を用い

て診断を行っていたが、その後、日本の株の遺伝子配列が明らかになり、SFTSV(CHN)プライマー・プローブセットでは、検出感度が低い可能性が考えられたことから、山口県で分離された株の遺伝子配列を参考に SFTSV(JPN1)プライマー・プローブセットを作製した。この系では、日本の株の検出感度が 100 倍程度高くなっており、より詳細にウイルスの組織分布を評価することができるようになった (表 4)。この遺伝子検査の結果は、免疫組織化学の結果と非常に良く相関しており、検体の保管状況が良い場合は、標本中に存在する1つの陽性細胞を確実に検出できた。また、免疫組織化学では陽性所見が見られなかった組織においても低コピーながらウイルス RNA が検出された。これは、免疫組織化学の感度以下の少数のウイルス感染細胞が組織内に存在することが考えられるが、SFTSV は血中に大量のウイルスが存在していることから、組織内の血液中に存在するウイルスを検出している可能性も考えられ、必ずしも当該組織内でウイルスが増殖していることを意味しないと考えられた。その後、日本で分離された他の株で SFTSV(JPN1)プライマー・プローブセットに対するミスマッチが見つかったので、SFTSV(JPN2)プライマー・プローブセットを作製し、現在は、そちらを病理診断に用いている。

D. 考察

SFTS が国内で既に 2005 年には発生していたこと、および SFTSV の日本株が系統樹上で中国株と独立のクラスターを形成したことを考慮すると、SFTSV は、最近になって中国等から日本に侵入したのではなく、かつ、中国の流行が日本

から輸出されて発生していることではないことを示している。2005 年よりもっと以前から両国に分布しそれぞれの場所では変異を蓄積してきたと言える。

後方視的調査で用いられた症例定義(表 1)では重症例または死亡例であることが定義の 1 つとなっており、致死率(10 名中 5 名死亡, 50%)が中国における致死率(約 10%)と比較し明らかに高い。このことは表 2 に示す日本の SFTS の臨床データには軽症例は含まれていないことを意味し、SFTS の臨床症状や疫学の全体的な把握は未だできておらず、今後の情報収集の方法を検討する必要がある。SFTS と日本で初めて診断された患者を含めた 11 人の SFTS 患者の臨床的解析によると、出血傾向、神経症状、腎不全等の多臓器不全が認められた。11 人中 5 人の患者で骨髄検査がなされていた。その 5 人全てで血球貪食症候群の所見が認められた。SFTS の病態には血球貪食症候群、凝固異常(播種性血管内凝固症候群等)、多臓器不全が関わっており、それが予後不良の原因ではないかと考えられる。現時点では、SFTS に対する特異的な治療法はない。しかし、病態を明らかにすることで、それらに対する対症療法を実施することが可能となり、それが予後の改善に結びつく可能性がある。今後の研究が待たれる。

今回測定に使用した血液、血脳脊髄液、尿では血液が最も SFTSV ゲノム量が高く、ウイルスゲノムの検出という観点からも適したサンプルである。脳脊髄液に含まれる SFTSV ゲノムは、直接中枢神経組織で SFTSV が増幅した結果とは考えられず、血液の混入による可能性がある。

SFTSV は日本、中国で株間に明確な塩基配列の違いがあり、分離された SFTSV の解析の範囲で遺伝子交雑(か遺伝子再集合)は起きていないことが示唆された。日本株は、2 つの遺伝

子型に分類されることも明らかにされた。今後の詳細な解析が待たれる。

SFTS 患者の予後とウイルスゲノム量の関係が明らかにされつつある。今回の検討では、死亡例では回復例に比べてウイルスゲノム量(濃度)が高い傾向が示された。発症日時を合わせてウイルスゲノム量を死亡例と回復例で比較検討することで、より確実な結論を導くことが可能となる。更なる研究が必要である。

抗体検出系について、Huh7 細胞の溶解液を抗原とした ELISA は SFTSV に対する抗体を高感度に検出する検出系と考えられ、有用な実室診断の 1 つが確立された。またこの ELISA は SFTS 軽症例の検出や無症候感染者の検出にも役立つものと考えられる。中和抗体価測定系は中和活性を明確に測定するのに有用であることが明らかにされた。現時点では、地方衛生研究所においてはいわゆる一般的な RT-PCR 法しか導入されていない。今後は地方衛生研究所においても抗体検査が実施できる体制を整備することが求められる。

病理学的解析を行った全ての症例においてリンパ節や脾臓などのリンパ系組織において SFTSV 抗原陽性細胞が見られ、それらの組織では芽球様細胞の浸潤と核崩壊産物を伴う壊死が見られ、SFTSV 感染との関連が強く示唆される。また、リンパ節や脾臓、骨髄には著明な血球貪食像が見られたが、血球貪食細胞が SFTSV 抗原陽性となることは少なく、ヒト体内における主なウイルスの増殖部位はリンパ節や脾臓などリンパ系組織に存在する芽球様細胞であると考えられた。SFTS が発見されてから 2 年以上が経過するが、未だに SFTS 症例の病理解析の報告は数例に留まり、SFTS の病理と病態との関連について明らかにするためには更なる症例の検索が必要と考えられる。

## E. 結論

2012 年以前の SFTS 発生状況の把握と臨床データの収集を行った。

SFTSV 感染患者は、その血中ウイルスゲノム量(濃度)が高い程予後不良であることが明らかとなった。

日本には土着の SFTSV が存在し、また中国株同様、日本株でも少なくともクラスターの異なる 2 系統が存在する可能性が示唆された。

遺伝子検出系および抗体検出系を複数構築した。

日本国内の SFTS 剖検症例の検体を用いて形態学的検査と免疫組織化学法、パラフィン切片を用いた遺伝子検査を組み合わせた SFTS の病理学的検査法を確立した。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 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

## 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, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 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, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 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, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 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, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 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, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 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, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 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, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 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, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 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, June 16-21, 2013
  - 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, 2013 年 6 月, 岡山

- 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, 2013 年 11 月, 大阪
- 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, 2013 年 11 月, 大阪
- 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, 2013 年 11 月, 大阪
- 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, 2013.9.20~22, 岐阜大学
- 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
- 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, 2013.9.20~22, 岐阜大学
- 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, 2013.9.20~22, 岐阜大学
- 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, 2013.9.20~22, 岐阜大学

表 1. SFTS の症例定義(H25.1.30 厚生労働省健康局結核感染症課長通知より)

1.	38 度以上の発熱
2.	消化器症状(嘔気, 嘔吐, 腹痛, 下痢, 下血のいずれか)
3.	血小板減少(10 万/mm <sup>3</sup> 未満)
4.	白血球減少(4000/mm <sup>3</sup> 未満)
5.	血清酵素(AST, ALT, LDH のいずれも)の上昇
6.	他の感染症によること又は他の病因が明らか場合を除く
7.	集中治療を要する, 若しくは要した, 又は死亡した



表 2. 後方視的に SFTS と診断された患者の臨床症状と検査成績

カテゴリー	臨床症状および検査指標	各臨床症状カテゴリーの中の分類	陽性/陰性/不明(n=11)	
臨床症状	発熱		11/0/0	
		全身症状	全身倦怠感 筋肉痛 関節痛 頭痛	11/0/0 2/5/4 1/6/4 6/4/1
	消化管症状			11/0/0
			吐気	9/2/0
			嘔吐	6/5/0
			腹痛	6/5/0
			下痢	7/4/0
	呼吸器症状		食欲不振・低下	11/0/0
				3/8/0
			咽頭痛	2/9/0
	神経症状		咳	1/10/0
				10/1/0
	出血症状		失語	3/8/0
			意識障害	8/3/0
			けいれん	6/5/0
				9/2/0
			吐血	1/10/0
			紫斑	3/8/0
			血性下痢	4/7/0
			歯肉出血	5/6/0
			鼻出血	0/11/0
		生殖器出血	0/11/0	
	リンパ節腫脹		5/6/0	
検査所見	末梢血液検査	白血球減少	Number (%) 11 (100%)	
		血小板減少	11 (100%)	
	生化学検査	総蛋白質濃度(低蛋白濃度 < 6.0 mg/dL)	3 (27%)	
		アルブミン低下 (低アルブミン血症 < 3.0 mg/dL)	9%	
		AST (>30 IU/L)	11 (100%)	
		ALT (>30 IU/L)	11 (100%)	
		LDH (>250 IU/L)	11 (100%)	
		CK (>200 IU/L)	11 (100%)	
		BUN (>20 mg/dL)	7 (64%)	
		CRE (>1 mg/dL)	7 (64%)	
		炎症性パラメーター	CRP (>1 mg/dL)	3 (27%)
		尿検査	血尿	9 (90%)*
	蛋白尿		10 (100%)*	
	凝固系	凝固系検査†	11 (100%)	
	血球貪食症候群 関連検査	骨髄検査	血球貪食像	5 (100%)‡
フェリチン値の異常高値			8 (100%) §	
発症 2 週間前ま でのマダニ咬傷 の有無			2 (18%)	

\*: 10 人の解析

†: DIC の指標として, Prothrombin time, activated partial thromboplastin time, antithrombin-3, fibrinogen, D-dimer, and fibrinogen degradation products のこれらの濃度を測定した.

‡: 患者 5 人における解析

§ : 患者 8 人における解析

表 3. 間接蛍光抗体法 (IFA) により陽性を呈した SFTS 疑い患者血清とその抗体価. 数値は IFA で陽性を呈していた血清の希釈限界 (抗体価) を示す. SFTSV 感染細胞と SFTSV NP 発現細胞を用いた IFA は, ほぼ同程度検出可能であった. また一部の検体では IgM 抗体も検出された.

検体	IgG		IgM	
	感染細胞	NP 発現細胞	感染細胞	NP 発現細胞
A	10,240	>5,120	-	-
B	>5,120	1,280	>80	ND
C	2,560	1,280	-	-
D	2,560	2,560	40	20
E	2,560	320	-	-
F	2,560	-	40	ND
G	1,280	1,280	-	-
H	1,280	1,280	-	-
I	640	160	-	-
J	640	640	-	-
K	320	160	-	-
L	320	160	-	-
M	160	160	-	-
N	160	320	-	-
O	160	40	80	40
P	80	ND	20	ND
Q	80	80	-	-

表 4. 剖検がなされた患者(ID 番号:NIID13-05)の各組織における SFTSV 遺伝子の定量的検査. 2種類のパライマー・プローブセットを比較した。

検体の種類	組織	RNA 濃度 (ng/ul)	OD260/280	SFTSV(CHN)*	SFTSV(JPN1)**	Beta-actin	SFTSV/cell (Copy / cell***)	IHC
FFPE	右腋窩リンパ節	55.82	1.77	1.89E+03	2.22E+06	2.01E+05	1.66E+04	+
FFPE	骨髄	66.79	1.4	UDL	2.23E+02	1.01E+03	3.30E+02	+
FFPE	脾臓	149	1.57	UDL	4.66E+02	3.46E+04	2.02E+01	+
FFPE	大腸	17.16	1.71	UDL	8.40E+01	3.68E+04	3.42E+00	-
FFPE	腎臓	84.71	1.64	UDL	5.62E+01	5.83E+04	1.45E+00	-
FFPE	肝臓	61.09	1.58	UDL	3.31E+02	3.92E+04	1.27E+01	+
FFPE	肺	110.36	1.61	UDL	6.18E+01	5.49E+04	1.69E+00	-
FFPE	小腸	30.23	1.7	UDL	2.84E+02	4.75E+04	8.96E+00	-
FFPE	心臓	32.73	1.36	UDL	3.82E+01	9.07E+03	6.32E+00	-
FFPE	大動脈	22.97	1.28	UDL	2.83E+01	3.26E+04	1.30E+00	-
FFPE	膈腰筋	11.24	1.56	1.09E+00	2.93E+02	7.64E+05	5.75E-01	-
FFPE	副腎	29.98	1.78	3.46E+00	5.30E+02	6.28E+05	1.27E+00	+
FFPE	右頸部リンパ節	127.19	1.74	2.67E+03	9.98E+05	1.78E+05	8.41E+03	+
FFPE	小腸	22.09	1.6	1.18E+00	1.88E+02	2.84E+05	9.92E-01	-
FFPE	肝門部リンパ節1	72.12	1.83	2.06E+00	3.14E+02	3.13E+05	1.50E+00	-
FFPE	肝門部リンパ節2	54.37	1.83	1.54E+00	1.63E+02	6.88E+05	3.56E-01	-
FFPE	胸骨	47	1.47	2.52E-02	7.14E+01	9.02E+03	1.19E+01	+
FFPE	肋骨	10.52	1.56	4.36E-02	7.20E+00	6.20E+03	1.74E+00	+
FFPE	右腋窩リンパ節	72.91	1.55	3.20E+02	1.25E+05	2.98E+04	6.29E+03	+
FFPE	肝門部リンパ節	91.19	1.62	UDL	5.25E+01	2.69E+04	2.92E+00	-
FFPE	右心室	12.44	1.1	UDL	1.05E+01	1.25E+03	1.26E+01	-
FFPE	左心室、左心耳	26.52	1.25	UDL	5.94E+00	1.91E+03	4.67E+00	-
FFPE	肝臓	46.23	1.27	UDL	2.40E+02	1.97E+03	1.83E+02	+
FFPE	腎盂	53.3	1.38	UDL	3.28E+01	4.81E+03	1.02E+01	-
FFPE	腎臓	71.15	1.43	UDL	8.48E+01	2.77E+03	4.59E+01	-
FFPE	気管 分岐部リンパ節	97.63	1.53	UDL	2.11E+01	2.56E+04	1.24E+00	-
FFPE	気管支肺門部リンパ節	107.87	1.54	UDL	3.25E+01	3.01E+04	1.62E+00	-
FFPE	胃体部	25.23	1.33	UDL	4.22E+00	5.63E+03	1.13E+00	-
FFPE	胃幽門部 潰瘍	34.8	1.43	UDL	1.28E+01	1.00E+04	1.91E+00	-
FFPE	大腸、小腸	35.77	1.44	UDL	1.39E+01	9.81E+03	2.12E+00	-
FFPE	膈間膜	92.04	1.5	UDL	1.40E+01	1.38E+04	1.52E+00	-
FFPE	脾臓	78.79	1.41	UDL	5.93E+02	1.86E+03	4.79E+02	+
FFPE	左肺下葉(鬱血部位)	87.68	1.49	UDL	1.14E+01	3.05E+04	5.63E-01	-
FFPE	右肺下葉	124.94	1.49	UDL	1.09E+01	2.30E+04	7.09E-01	-

\*中国株に至適化したプライマー、プローブセット

\*\*日本株に至適化したプライマー、プローブセット

\*\*\*b-actin が  $1.5 \times 10^3$  copies/cell としたときの、細胞あたりのウイルスコピー数

UDL: Under detection limit

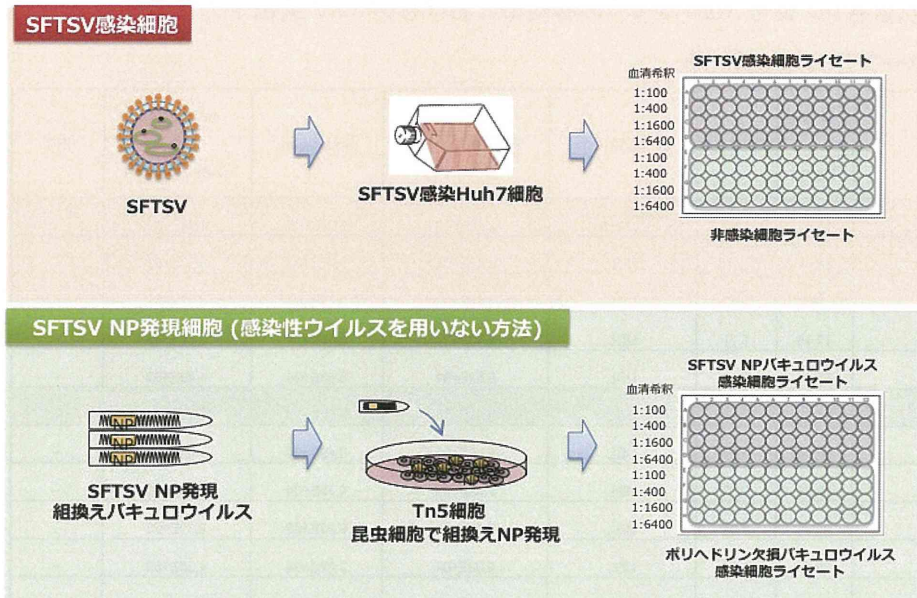


図 1. SFTSV 感染細胞(上段)および組換え SFTSV 各蛋白質抗原(下段)とした ELISA 法の概要.

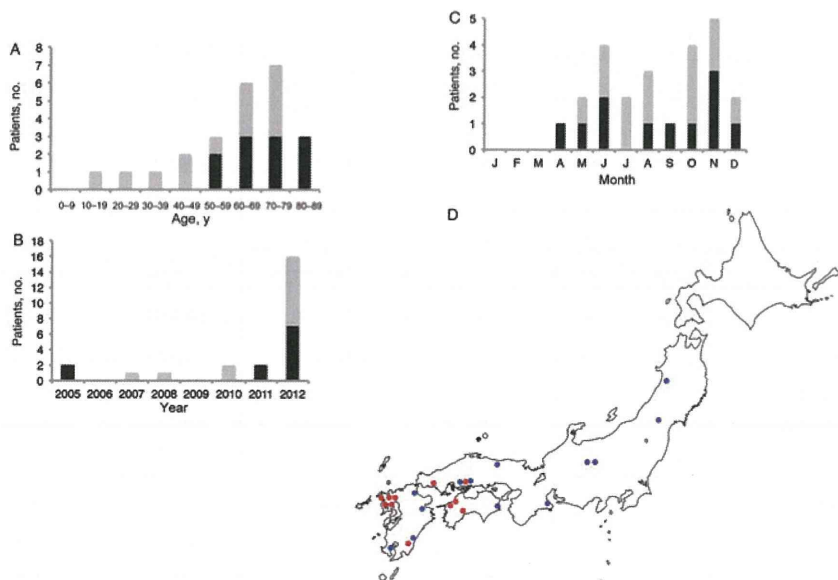


図 2. 後方視的に SFTS と診断された患者 11 名の年齢(A), 発症年(B), 発症月(C), および, 患者発生地(D, 赤点が SFTS 患者を, 青点が非 SFTS 患者を示す).



【骨髓穿刺検査（腸骨）】

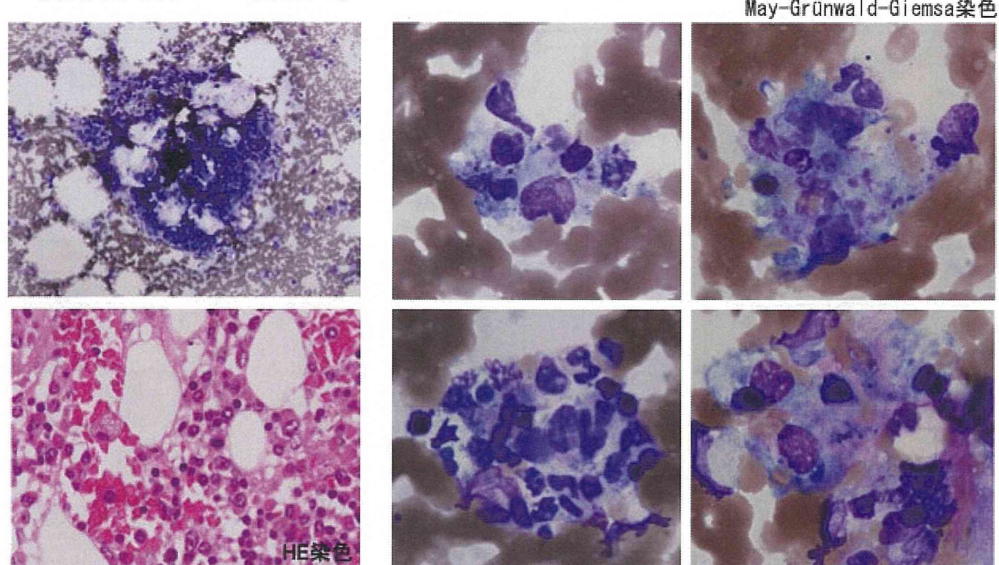


図 3. 骨髓穿刺検査（腸骨）所見（May-Grünwald-Giemsa 染色）。骨髓は軽度低形成で、芽球や異型細胞の骨髓浸潤はなかった。巨核球も数的に保たれていた。活性化した組織球と血球貪食細胞が明らかに増加し、血球貪食像は顕著にみられ、1個の組織球内に貪食された血球成分が極めて多いものも散見された。

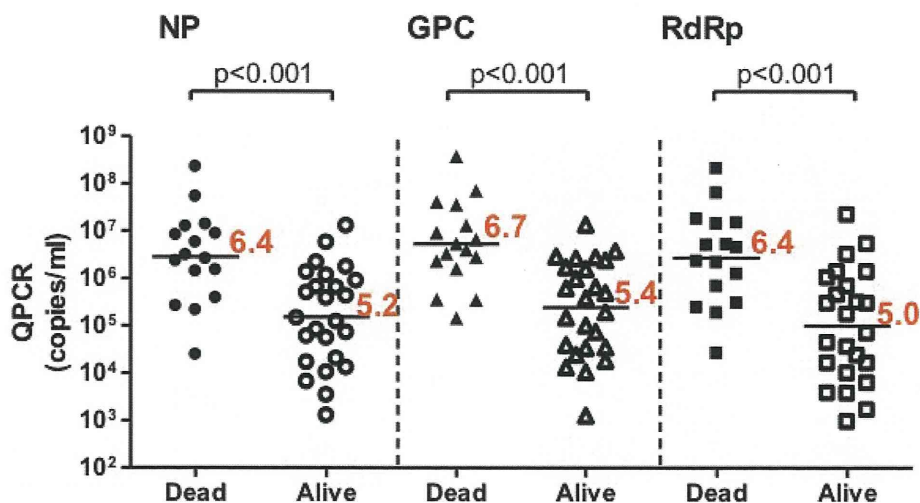


図 4. SFTS 患者検体中のウイルスゲノム量の死亡例および回復例における比較。S-遺伝子 (NP), M-遺伝子 (GPC), L-遺伝子 (RdRp) を標的とした定量的 RT-PCR により、死亡例では回復例に比較してウイルスゲノム量が有意に高い。

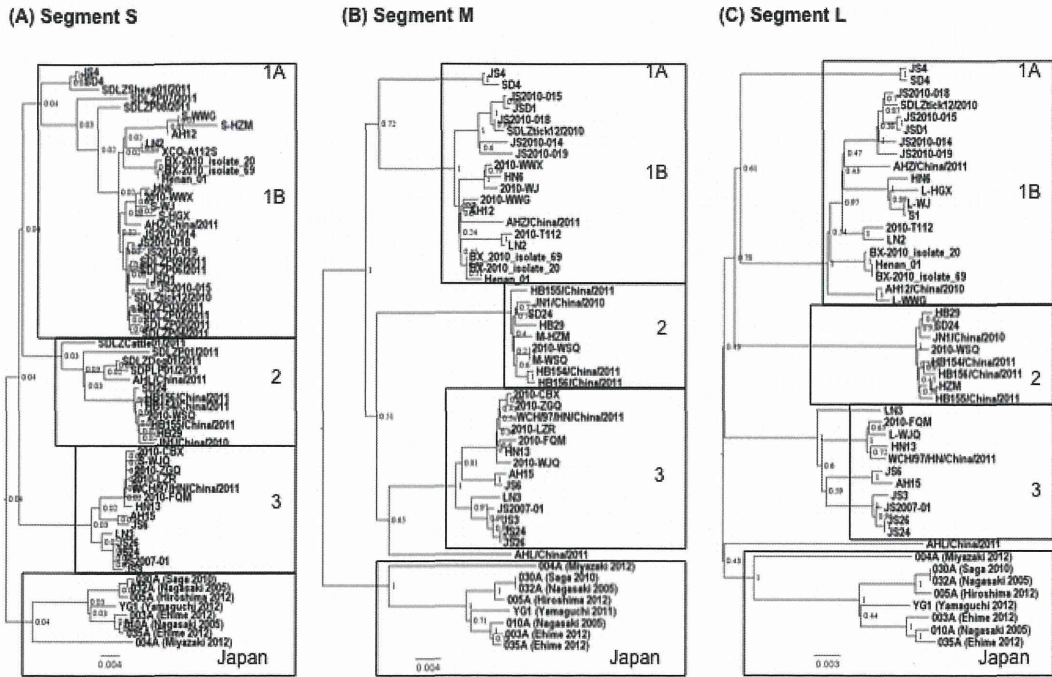


図5. SFTS ウイルスの系統樹解析. 中国株は遺伝子型 1~3 の 3 つの遺伝子型に、そして、日本株は 1 つのクラスターを形成する. 日本株の系統樹解析を詳しく解析すると、日本株は 2 つの遺伝子型(サブクラスター)を形成する.

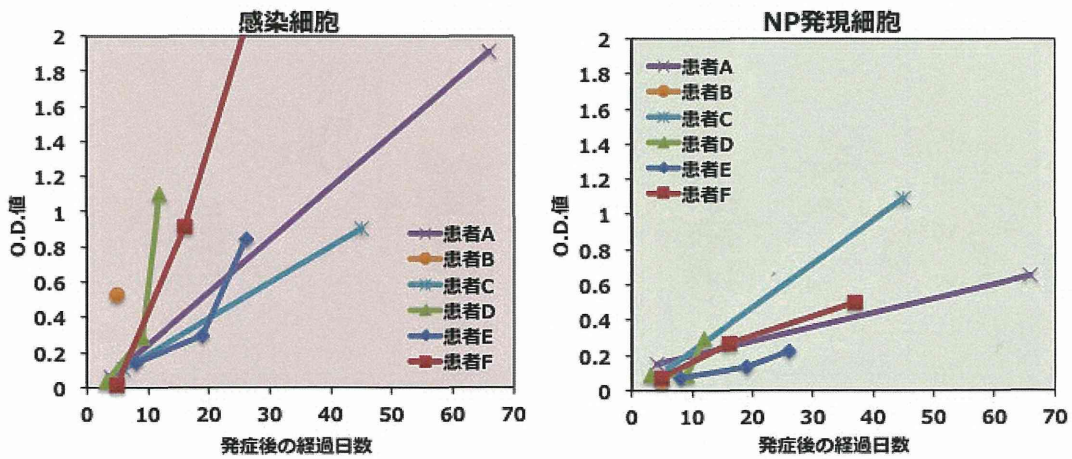


図6. 患者血清中のIgG抗体価の推移

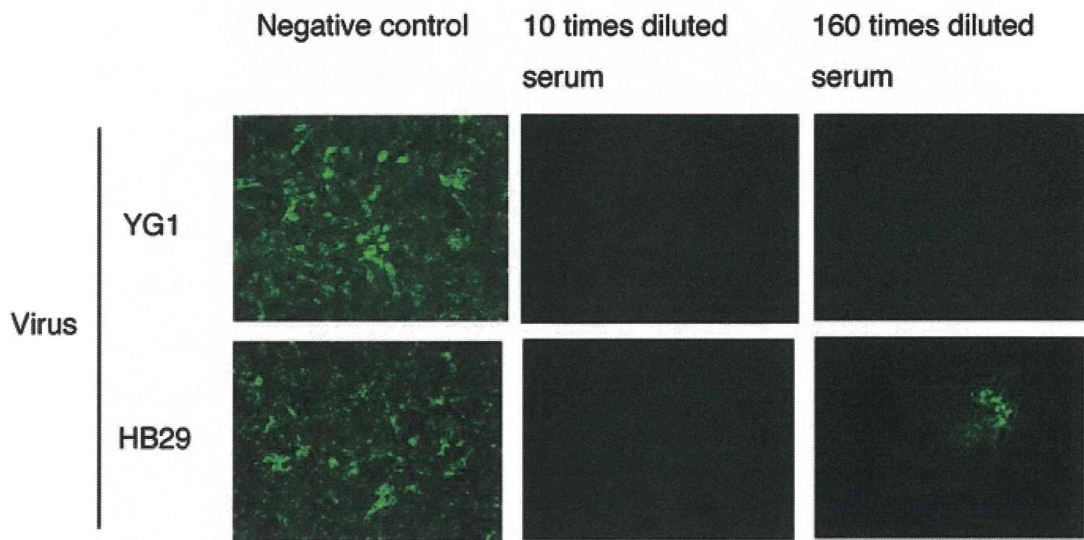


図 7. SFTS 回復者血清の中和活性

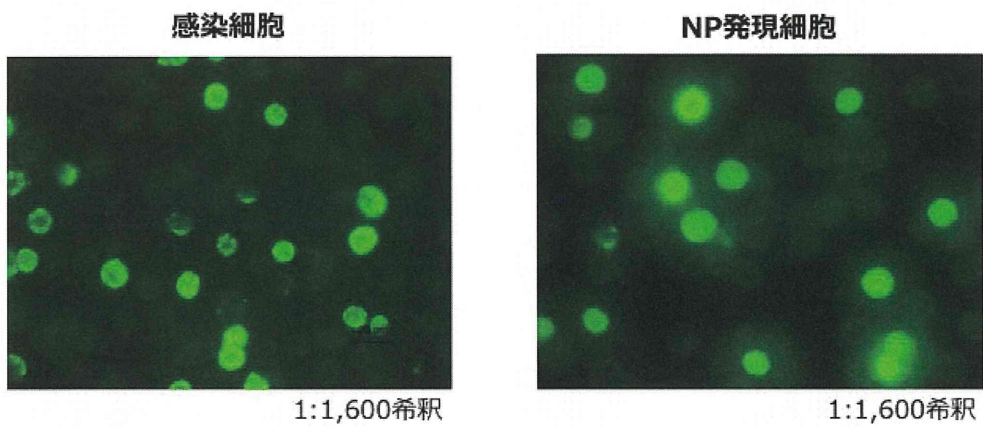


図 8. 抗 SFTSV NP ウサギ血清を用いた NP 抗原の確認



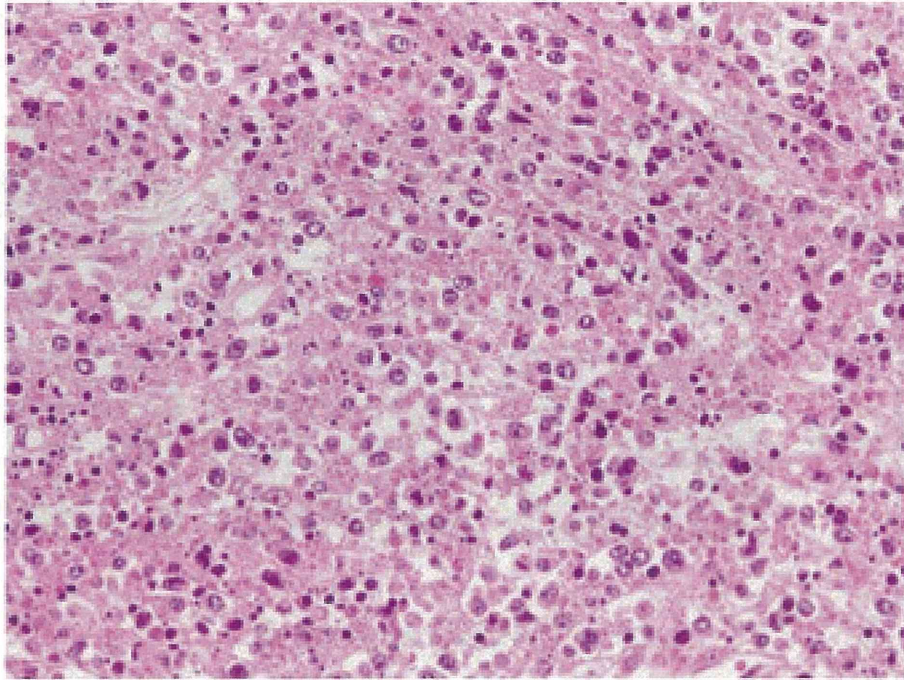


図 9. SFTS 剖検症例リンパ節(NIID13-05). 核崩壊産物が目立つ壊死性リンパ節炎の所見.

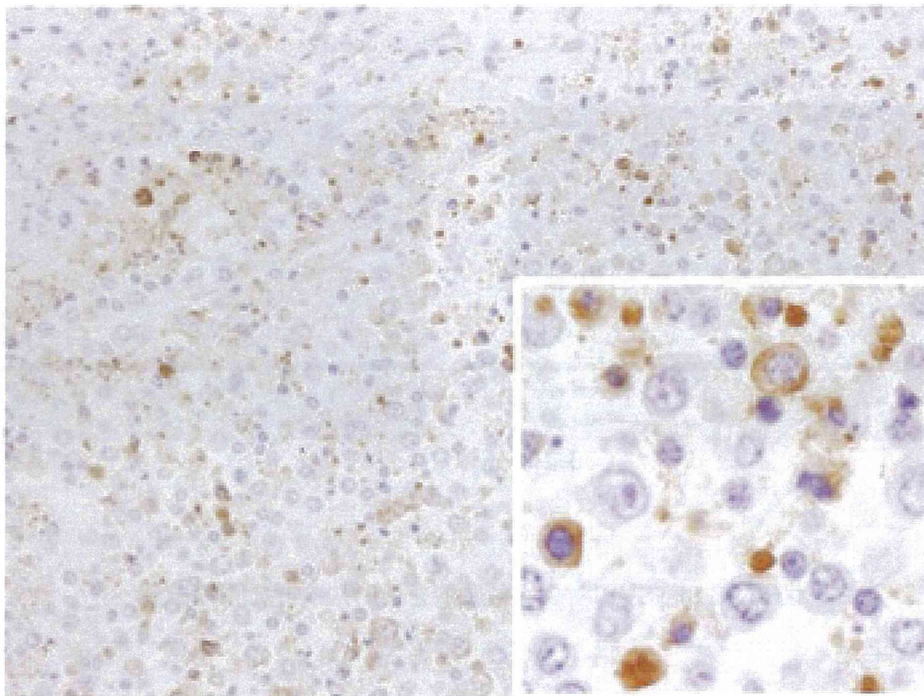


図 10. SFTS 剖検症例リンパ節(NIID13-05)の免疫組織化学.

リンパ芽球様細胞の細胞質に抗原が陽性となる.



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)

日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明

研究分担者	森川茂	(国立感染症研究所獣医科学部)
研究協力者	澤邊京子	(国立感染症研究所獣医科学部)
	安藤秀二	(国立感染症研究所獣医科学部)
	川端寛樹	(国立感染症研究所獣医科学部)
	新倉綾	(国立感染症研究所獣医科学部)
	木村昌伸, 藤田修, 今岡浩一, 宇田晶彦, 加来義浩, 野口章	(国立感染症研究所獣医科学部)
	新井智	(国立感染症研究所感染症疫学センター)
	高田伸弘	(福井大学医学部)
	藤田博己	(馬原アカリ医学研究所)
	高野愛, 前田健	(山口大学共同獣医学部)
	岸本寿男	(岡山県環境保健センター)
	四宮博人	(愛媛県立衛生環境研究所)
	苅和宏明	(北海道大学獣医学部)
	有川二郎	(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)
	柳井徳麿	(岐阜大学獣医学部)
西園 晃	(大分大学医学部)	

研究要旨: SFTSV はマダニ媒介性であるため、ウイルスの生活環には吸血される動物が重要な役割を果たしている。そこで、日本の自然界における SFTSV の存在様式の解明とヒトへの感染リスクの評価を行うために、初年度は、1) 国内のマダニの調査を行い SFTSV の宿主・媒介マダニ種の同定とその分布を調査し、2) 各種動物の血清疫学を実施した。その結果、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%程度とマダニの種類により違いがあった。調査したほとんどの自治体で SFTSV 遺伝子陽性マダニが見つかったことから、国内に広く分布していると考えられる。一方、シカは、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。

#### A. 研究目的

SFTS は、中国で 2009 年から中国で発熱、消化器症状、リンパ節腫脹、出血症状を主徴とする原因不明の感染症の流行があり、2011 年にブニヤウイルス科の SFTS ウイルス(SFTSV)が原因であることが明らかになった。中国では年間 1,000 症例以上の患者が発生している。SFTS はダニ媒介性ウイルス感染症で、致死率の高い新興ウイルス感染症であるが、2013 年 1 月に国内の SFTS 患者が確定診断されたのが初めてで、その後さかのぼり調査で 12 名、2013 年の 3 月以降の患者が 40 名確認されている。これらの患者は、九州、四国、中国、近畿地域の 13 県に集中している。一方、SFTSV はダニ媒介性であることから、自然界では、ダニと動物間で生活環を形成していると考えられるが、日本の自然界に

おける SFTSV の存在様式は、その分布、生活環に関する動物など全く不明である。このため、ウイルス保有マダニの調査、各種動物での血清疫学等を実施して、自然界におけるダニと動物間での SFTSV の生活環を解明することを目的とする。初年度は、マダニからの高感度 SFTSV 遺伝子検出法の開発と全国のマダニからのウイルス遺伝子検出を行うこと、動物からの SFTSV 特異的抗体検出法の開発と野生動物や愛玩動物の調査を行った。

#### B. 研究方法

1) MGBプローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR の開発とマダニからの SFTS ウイルス遺伝子検出: 日本の SFTSV は分子系統学的に中国の SFTSV と異なり、中国で開発さ

れたリアルタイム RT-PCR は、使用するプライマー配列が日本のウイルス株と一致しないため、日本の SFTSV 株を効率よく検出できないと考えられた。そこで、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 通りデザインした。これらを、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。その結果、S-RNA の NP 遺伝子を標的とする MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR の 1 つが選択された。各地で捕獲されたマダニを、まずダニ種を同定した。成ダニは 1 匹毎、若ダニ、幼ダニは 5 匹ずつプールして IsogenII を用いて RNA を抽出した。これらの RNA 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。

- 2) 各種動物からの SFTSV 特異的抗体の検出法の確立と国内の野生動物、愛玩動物の血清疫学調査：SFTSV HB29 (中国 CDC より分与) と YG1 株 (国内初症例から分離された日本株) を各種細胞に感染させたところ、HB29 株の増殖が優っていたため、抗原調整には HB29 株を用いた。HB29 株感染細胞ライセート中の SFTSV 抗原価は抗 SFTSV-NP ウサギ血清を用いた ELISA で比較した (図 1)。その結果、Huh7 細胞ライセートが最も高い抗原価を示した (図 1)。そこで、ELISA 抗原には HB29 株感染 Huh7 細胞ライセートを用いた。Huh7 細胞に HB29 株を感染 3 日後に細胞を PBS で洗浄し、1% NP40/PBS で 10 分間可溶化したライセートを、チューブに移して短

波長 UV トランスイルミネータ上で 10 分間 UV 照射による不活化を行った。その後 12,000rpm、10 分間遠心した上清を ELISA 抗原とした。ELISA 抗原は、抗 SFTSV NP ウサギ血清を用いた ELISA で最大抗原価を示す最大希釈の 4 倍低い希釈で用いた。

間接蛍光抗体法 (IF 法) は、HeLa W229 細胞を用いた。HeLa W229 細胞は SFTSV 感受性が低いため、感染後、細胞を 2 代継代した。2 代継代するとほぼ全細胞がウイルス抗原陽性となった。そこで、トリプシン処理、PBS 洗浄により浮遊化させた感染 HeLa W229 細胞と非感染 HeLa W229 細胞を 1:2 の比率で混合し、IF 法の抗原とした (図 2)。

(倫理面からの配慮について)

抗 SFTSV-NP ウサギ血清は、大臣確認実験として承認された遺伝子組み換え実験により作製された組換え精製 SFTSV-NP を、動物実験委員会により承認された実験によりウサギに免疫して作製した。その他の実験は該当しない。飼育犬においては飼育者の同意を得た上で採取された血清を用いた。

### C. 研究結果

- 1) MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR の開発：デザインした 10 種のリアルタイム RT-PCR のうち 1 つのリアルタイム RT-PCR が、1) 遺伝子検出が 10 コピー (1FFU) と高い、2) ダニ由来 RNA に対する非特異的増幅がない、3) ダニ由来 RNA による増幅効率への影響がなかった (図 3)。
- 2) 国内における SFTSV 保有マダニ種とウイル

ス保有率：九州から北海道にかけて、19 自治体において旗ざり法で採取した植生マダニとシカに付着しているマダニを調査した。調査したマダニは 18 種 1,645 検体(3,802 匹)であった。その結果、複数のマダニ種(タカサゴキラマダニ、フタゲチマダニ、キチマダニ、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、その保有率はマダニの種類により異なり 5~20%程度であった(表 1)。このうち、SFTS 患者との関連が確認されているのは、タカサゴキラマダニ、フタゲチマダニの 2 種である。

3) 国内における SFTSV 保有マダニの分布：九州から北海道にかけて、26 自治体において植生マダニとシカに付着しているマダニを調査した。調査したマダニは 18 種であった。その結果、SFTSV 保有マダニは、これまでに SFTS 患者が確認されている自治体(宮崎、鹿児島、徳島、愛媛、高知、岡山、島根、山口、兵庫県)に加えて、SFTS 患者が報告されていない自治体(三重、滋賀、京都、和歌山、福井、山梨、長野、岐阜、静岡、栃木、群馬、岩手、宮城県、北海道)でも確認された(図 4)。一方、澤(北大人獣共通感染症リサーチセンター)の調査では、北海道各地から採取した 273 匹、和歌山県からの 13 匹、山形県からの 19 匹の計 305 匹のマダニが全て SFTSV 遺伝子陰性であった。

4) ダニ中の SFTSV RNA の量：植生マダニにおける SFTSV RNA のコピー数は、 $10^2 \sim 10^3$  コピー/tick と低コピー数であった。一方、シカ付着マダニは、2013 年 12 月から 2014 年 1 月に捕獲されたシカに付着していた 1,001 匹

のマダニを調べた結果、438 匹が SFTSV 遺伝子陽性(陽性率 43.9%)であった。また、最大で  $6 \times 10^6$  コピー/tick と高コピー数のマダニが認められた(表 2)。また、シカ付着マダニでは、同一動物に付着しているマダニの 70% が SFTSV 陽性と陽性率が非常に高いケースがあった(表 3)。

5) 国内の動物における SFTSV 抗体保有状況：2007 年から 2014 年に採取されたシカ血清中の SFTSV 抗体保有状況を調査した。その結果、調査した 27 自治体のうち、17 自治体(福岡、熊本、宮崎、鹿児島、島根、広島、山口、徳島、愛媛、三重、京都、兵庫、滋賀、和歌山、長野、静岡、宮城県)で抗体陽性のシカが確認されたが、その他の 10 自治体(大分、高知、岐阜、山梨、栃木、群馬、千葉、岩手、福島県、北海道)では抗体陽性のシカは確認されなかった。ただし大分、高知、千葉、福島県の 4 自治体では、それぞれ 3、1、5、4 頭しか調査されていないため、現時点で抗体陽性シカの有無は判断できない。シカにおける SFTSV 抗体陽性率は、陽性シカが認められた自治体の平均は 31%であったが、自治体により陽性率は 0.9%から 90%と地域差が大きかった。SFTS 患者発生自治体では、平均で 39.2%のシカが抗体陽性あったのに対し、患者が発生していないが陽性シカが認められた自治体では、平均で 17.0%のシカが抗体陽性あり、患者発生自治体で抗体陽性率が高い傾向が認められた。なお、北海道のエゾシカは、研究協力者の苅和(北大獣医)による調査でも、調査したエゾシカ 315 頭(斜里町ウトロ 139 頭、標津町 139 頭、札幌 18 頭、静内