

19 頭を調査した結果、全てが抗体陰性であった。

イノシシは、2005年から2013年に採取された血清を調査した結果、調査した15自治体のうち、7自治(熊本、鹿児島、高知、愛媛、徳島、香川、広島県)で抗体陽性のイノシシが確認された。8自治体(宮崎、大分、島根、兵庫、三重、長野、静岡、千葉県)では抗体陽性のイノシシは確認されなかった。ただし宮崎、大分、島根、兵庫、三重県では調査等数が少ないため、現時点で抗体陽性イノシシの有無は判断できない。

イヌは、2009年から2013年に採取された血清を調査した結果、調査した19自治体のうち、10自治(熊本、鹿児島、宮崎、高知、愛媛、徳島、香川、三重、岐阜、富山県)で抗体陽性のイヌが確認された。9自治体(沖縄、長崎、広島、滋賀、愛知、静岡、長野、新潟県、北海道)では抗体陽性のイヌは確認されなかった。西園(大分大医学部)による大分県のイヌ(飼育犬568頭、放浪犬40頭)の調査では、飼育犬が3頭(0.53%)、放浪犬が1頭(2.5%)抗体陽性であった。

その他の動物では、四国、九州で2005年から2007年に採取されたノウサギで抗体陽性(陽性地域では17%)が確認された。前田(山口大学共同獣医学部)の調査では、近畿のアライグマ(103/1414, 7.3%)、タヌキ(24/434, 5.5%)、アナグマ(6/74, 8.0%)、ハクビシン(1/6, 17%)、ニホンザル(3/15, 20%)から抗体が検出された。また、有川(北大医学部)による北海道の齧歯類の調査では、調査した斜里、南富良野のエゾヤチネズミ、ミ

カドネズミ、ムクゲネズミ、ヒメネズミ、アカネズミ、トガリネズミ合計555匹の全てが抗体陰性であった。

#### D. 考察

日本のSFTS患者や患者に付着していたマダニから分離、検出されたSFTSVの遺伝子型は、中国の3遺伝子型と異なるため、中国で開発されたリアルタイムRT-PCRは適用できない。このため、マダニから効率よくSFTSV遺伝子を検出出来るリアルタイムRT-PCR法を開発した。本リアルタイムRT-PCR法ではMGBプローブを用いた。これにより、多くの自治体のマダニを調査した結果、調査した多くの自治体でSFTSV遺伝子陽性マダニが検出された。中国では媒介・宿主マダニは、フタトゲチマダニと言われているが、日本では少なくとも患者との関連が強く疑われるマダニはフタトゲチマダニとタカサゴキラマダニである。一方、SFTSV遺伝子保有マダニ種は、タカサゴキラマダニ、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と少なくとも複数種のマダニがSFTSVを保有していることが強く示唆された。また、植生ダニと比較してシカ付着ダニでは、ウイルス遺伝子保有率が高く、遺伝子コピー数も非常に高いマダニがいることがわかった。このことから、シカなどの動物に多くのマダニが吸血することにより水平感染する可能性がある。また、吸血することによりマダニでSFTSVが増殖してSFTSV遺伝子コピー数が増加する可能性がある。これらの証明にはより詳細な解析が必要である。一方、動物の抗体保有状況を調査した結果、シカなどではSFTS患者発生地域で抗体陽性率が高い傾向

があったことから、動物の血清疫学調査の成績は患者発生のリスクを評価するのに有用である可能性がある。ただし、患者発生県でもシカなどの抗体陽性率が非常に低い県があったことから、複数種の動物の血清疫学的調査が重要である。北海道では、SFTSV 遺伝子陽性マダニが検出されたが、多くの動物種で抗体が全て陰性であったことから、SFTSV 保有マダニが稀にしかいないか、限局した地域にのみ分布する可能性がある。いずれにしても SFTS 患者発生自治体と比較すると患者発生リスクは低いと考えられる。一方、多くの野生動物が抗体を保有していたことから、SFTSV は多くの動物に感染することがわかった。今後、マダニと動物の調査を継続することにより、ある自治体での患者発生リスクが上昇するのかなどを明らかにしたい。

謝辞:本研究には、研究協力者以外にも多くの自治体、大学、大日本猟友会、結核感染症課の皆様にご多大な御協力をいただくことにより実施できました。ここに謝意を表します。

#### E. 結論

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。そこで国内の SFTS ウイルスの宿主・媒介マダニ種の同定とその分布と各種動物での抗体保有状況を調べた。その結果、九州から北海道の 26 自治体において、タカサゴキラマダニ、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。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、

国内にウイルスが広く分布していると考えられる。一方、動物ではシカが抗体陽性率が高く、SFTS 患者発生自治体では陽性率が高い傾向が見られた。その他、イヌや多くの野生動物で抗体が検出されたことから、SFTS ウイルスは自然界でシカやその他の多くの動物とマダニで生活環を形成していると考えられた。

#### F. 健康危険情報

中国で罔動物を於いた実験や、動物への感染実験から感染はしても発症する動物は確認されていない。また、動物や動物の血液などとの接触で感染し発症した例は報告されていない。

#### 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(6):816-27, 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) 森川茂: 重症熱性血小板減少症候群, 獣疫学雑誌 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, 岐阜(2013.9)
- 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, 岐阜(2013.9)
- 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, 岐阜(2013.9)
- 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, 岐阜(2013.9)
- 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, 岐阜(2013.9)
- 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, 神戸(2013.11)
- 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, 神戸(2013.11)
- 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(2013.11)
- 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, 神戸(2013.11)
- 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, 神戸 (2013.11)
- 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, 神戸 (2013.11)
- 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, 神戸 (2013.11)
- 13) 高橋徹, 亀井敏昭, 前田健, 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)
- 14) 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)
- 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

表 1. 国内の植生マダニにおける SFTS ウイルス陽性ダニ種

ダニ種*		検査結果			国内分布*	宿主*
学名	和名	陽性数	検体数	陽性率		
<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	85	421	20.20%	北海道～奄美大島	ヒト、大中型哺乳類、鳥
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	72	357	20.20%	北海道～奄美大島	ヒト、大型哺乳類
<i>Amblyomma testudinarium</i>	タカサゴキラマダニ	10	66	15.20%	関東～西南日本	ヒト、哺乳類、鳥
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	フタトゲチマダニ	45	350	12.90%	北海道～屋久島	ヒト、大中型哺乳類、鳥
<i>Haemaphysalis kitaokai</i>	ヒゲナガチマダニ	18	170	10.60%	東北～西南日本	猪、犬、鹿、兎
<i>Haemaphysalis hystricis</i>	ヤマアラシチマダニ	6	79	7.60%	四国～南西諸島	ヒト、大中型哺乳類
<i>Haemaphysalis formosensis</i>	タカサゴチマダニ	4	66	6.10%	四国～南西諸島	猪、犬、鹿、兎
小計		240	1509	15.90%		
その他 (未同定含む)		7	136	5.15%		
計		247	1645	15.00%		

\*病原ダニ図譜より

(注: 成ダニは 1 匹ずつ, 若ダニと幼ダニは 5 匹プールしたものを検体とした)

表 2. シカ付着マダニでの SFTS ウイルス遺伝子検出

ダニ種*		SFTSV陽性数	マダニ数	平均コピー数 /ダニ	最大コピー数 /ダニ
学名	和名				
<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	83	188	7.8E+04	5.7E+06
<i>Haemaphysalis japonica</i>	ヤマトチマダニ	2	7	1.3E+03	2.4E+03
<i>Haemaphysalis kitaokai</i>	ヒゲナガチマダニ	29	100	6.6E+03	1.1E+05
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	321	687	9.0E+03	5.1E+05
その他		4	19	1.5E+04	4.0E+04
総計		439	1001		

表 3. シカ付着マダニからの SFTS ウイルス検出例

(同一シカに付着しているマダニの SFTS ウイルス遺伝子陽性率が高い場合があった)

地域	抗体	ダニ種・学名	ダニ種・和名	ステージ	飽血	陽・陰	陽性率	コピー数/ダニ
東北	陽性	<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	♂		+		980
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	♂		+		28,100
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	♂		+		1,330
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♂		+		11,900
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♂		+	6/9	767
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀		-	(67%)	
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀		+		708
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph		-		
東北	陽性	<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♂		-		
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		3,300
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		1,560
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		979
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	-		
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		1,450
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	-	10/14	
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	-	(71%)	
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		618
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		3,360
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		1,670
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		4,530
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		12,100
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	♀	○	+		2,650		
中部	陰性	<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	♂		+		2,980
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	♂		+		2,280
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	♂		-		
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph	○	+		610
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph	○	-	7/10	
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph	○	+	(70%)	1,220
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph		-		
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph		+		2,800
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	♂		+		1,780
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	nymph		+		603

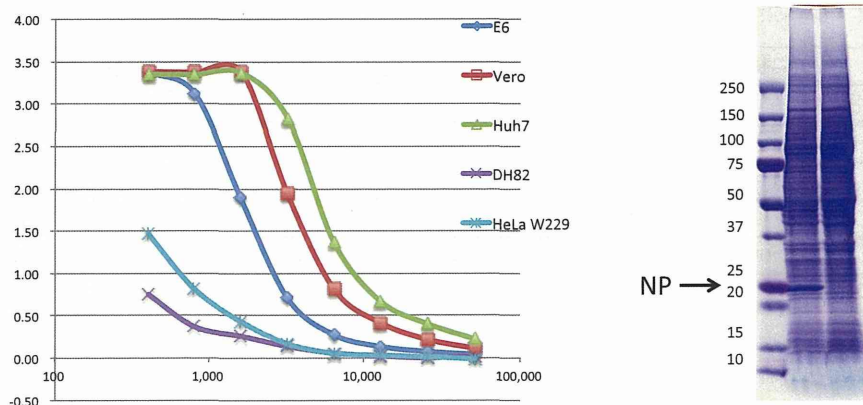


図1. 各種 SFTS ウイルス感染細胞での SFTS ウイルス抗原レベル. Huh7 細胞での SFTS ウイルス抗原量が最も高かった. SDS-PAGE ではライセート中の SFTSV-NP が CBB-R で染色されるほど高発現であった.

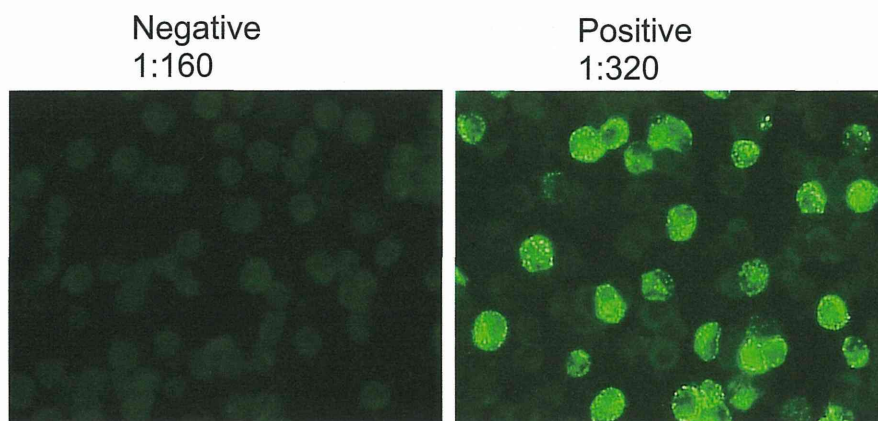
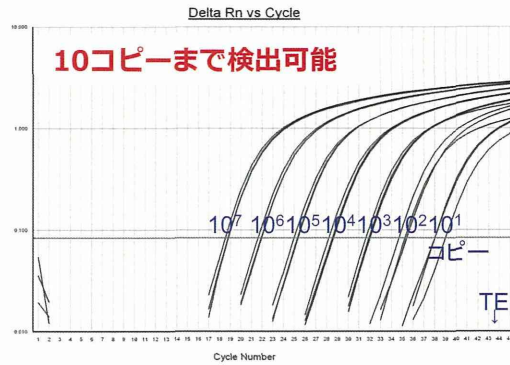


図 2. 間接蛍光抗体法(IF 法). HeLa W229 細胞を用いた IF 法. 抗体陽性血清では, 細胞質内に顆粒状に染色される特異像が観察される.

陽性コントロール用のプラスミドを用いた検出限界の測定



リアルタイム RT-PCR 法におけるダニ RNA の影響

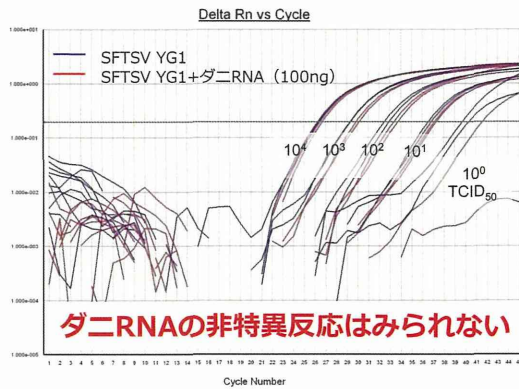


図 3. MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR の開発



図 4. SFTS ウイルス陽性マダニの国内分布.

(陽性マダニが確認された自治体が赤, 未調査等が白)

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)

SFTS ウイルスの感染機構・増殖機構・病原性の解明研究

研究分担者	有川 二郎	北海道大学医学研究科微生物学講座
研究協力者	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
	下島 昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
	安田 二郎	長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野
	鈴木 忠樹	国立感染症研究所感染病理部
	西園 晃	大分大学医学部微生物学講座
	山田 健太郎	大分大学医学部微生物学講座
	澤 洋文	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
	吉松 組子	北海道大学医学研究科微生物学講座

研究要旨 SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性に関する研究の推進を目的とし、1) シュードタイプ SFTSV の作製とそれを用いた感受性細胞や吸着や侵入過程に関する研究、2) SFTS 症例の病理学的解析、3) 抗 SFTSV 薬の検討、4) SFTSV 感染の肝細胞病原性に関する研究、5) 抗 SFTSV 単クローン抗体の作製、についての研究が実施された。

A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS)はブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される SFTS ウイルス(SFTSV)によって引き起こされる急性のウイルス感染症で、発熱、血小板減少、白血球減少、血中肝酵素の上昇等を主徴とする。2011 年に特定されたダニ媒介性の新興ウイルス感染症である。SFTS の診断、

治療及び予防対策の整備・構築が望まれているが、それらの研究遂行に重要な SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性に関する情報は未だ限られている。

以上の背景のもと、本分担研究では、表1に示す研究協力者と研究課題に基づき、SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性に関する研究の推進を目的として実施した。

シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の



解析:SFTSV の感染機構の解析を目的として、エンベロープ蛋白質遺伝子欠損水疱性口内炎ウイルス(VSVΔG)に SFTSV のエンベロープ蛋白質(GP)を外殻したシュードタイプウイルス(SFTSVpv)を作製し、各種解析を行った。

SFTS 症例の病理学的解析:新しい感染症である SFTS の病態形成機序を理解するためには、ヒト症例の病理学的解析が必要不可欠であるが、これまで日本国内のみならず世界各国からも全く SFTS の病理学解析の報告はなく SFTS の病理像については未だ不明である。本研究では日本国内で確認された SFTS の剖検例につ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核酸検査を組み合わせた病理学的解析を行い、SFTS の病理像の一端を明らかにすることを目的とした。

抗 SFTSV 薬の検討:SFTS に対する有効なワクチン・治療薬はなく、現時点で治療法も確立されていない。そこで、現在既に他のウイルス感染症に対して臨床使用されているリバビリン、インターフェロン-α、更に研究協力者らが注目している細胞内酵素 S1P に対する低分子酵素活性阻害剤 (S1P 阻害剤, PF-429242)の SFTSV 複製に与える影響を検討し、抗 SFTSV 薬としての有用性を検討した。

SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性:SFTS は SFTSV 感染によって引き起こされ、発熱、血小板減少、血中肝酵素の上昇等の他に、重症例では血液凝固異常等が認められるが(Gai et al, J Infect Dis, 2012; Takahashi

et al, J Infect Dis, 2013), その病態形成機構については未解明である。通常、血液凝固には12種類の凝固因子が関与し、それらのほとんどが肝臓で産生される。SFTSV の C57/BL6 マウスへの実験感染では、非致死性で明らかな臨床症状は認められないものの、ウイルス RNA および病変が脾臓、肝臓、腎臓で認められている(Jin et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2012)。乳飲みマウスにおける感染は致死的で、肝臓において広範な壊死巣が認められている(Chen et al, J Gen Virol, 2012)。したがって、SFTSV 感染によって引き起こされる肝機能障害とそれに伴う血液凝固異常が、SFTS の病態形成に関係している可能性も考えられている(Zhang et al, Clin Infect Dis), 2012)。そこで本研究では、SFTSV 感染が肝細胞機能に与える影響について、培養肝細胞で検討することを目的とした。また研究を遂行するうえで必要となる、各ウイルス蛋白質に対する抗血清の作製も併せて行った。

Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用:本施設に設置されている real time RT-PCR 機器 (Applied Biosystems 社, StepOnePlus) を用いて SFTSV RNA を検出する系を構築すること。及び、構築した系を用いて、乳のみマウス脳内接種後の SFTSV RNA の検出を試みること。

抗 SFTSV 単クローン抗体の作製:SFTSV の GP に対するモノクローナル抗体を作成し、診断および治療への応用を試みる。

## B. 研究方法

### 1) シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の

解

SFTSV(中国株 HB29)の GP を発現するプラスミドを作製し、そのプラスミドを 293T 細胞に発現させ、抗 GP1 抗体を用いた間接蛍光抗体法にて細胞内局在を確認した。発現の確認後、SFTSV<sub>pv</sub> を作製した(図 2)。比較対照として、同じブニヤウイルス科のリフトバレー熱ウイルス(RVFLV)の GP を外套したシュードタイプウイルス(SFTSV<sub>pv</sub>)およびラッサウイルスの GP を外套したシュードタイプウイルス(LASV<sub>pv</sub>)、レトロウイルス科のマウス白血病ウイルス(MLV)の GP を外套したシュードタイプウイルス(MLV<sub>pv</sub>)も作製した。これらの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、エンドサイトーシス阻害剤を用いて、シュードタイプウイルスおよび 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 感染患者血清中の中和活性価を検討した。C 型レクチン(DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECtin)発現細胞での SFTSV<sub>pv</sub> の感染性および SFTSV の増殖についても検討した。シュードタイプウイルスの感染はレポーターであるルシフェラーゼの活性を、SFTSV の感染は抗 NP 抗体を用いたフォーカスアッセイを指標とした。

## 2) SFTS 症例の病理学的解析

### a) 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°C20 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。

### b) 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 Forward and RT-primer: SFTS-F2, CCCTGATGCCTTGACGATCT (20 mer), Reverse primer: SFTS-R2b, TGATTGGGTGAGGGACACAAAGTT (24 mer), Probe: SFTS-probe-Fam2, TTGCCTCGAGTCAGGGCAAAGACAA (25 mer)と 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 B-actin の検出を行った。

### 3) 抗 SFTSV 薬の検討

96 穴プレートに 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)を播種し、SFTSV (YG1 株)を moi=0.1 で感染させた。感染 2 時間後に DMSO(コントロール)、リバビリン(100mM)、インターフェロン- $\alpha$  ( $1 \times 10^3$  unit/ml)、S1P 阻害剤(30mM)、またはそれぞれの組み合わせを含む培地に置き換え、更に 48 時間培養した。S1P 阻害剤処理に

- においては最終濃度 50mM となるようコレステロールを添加したもの及びしないものを用意した。これらの培養上清を 96 穴プレートに播種しておいた VeroE6 細胞に感染させ、感染 2 時間後に培地を新たな培地と交換した。更に 14 時間培養を続け、4%パラホルムアルデヒドにて細胞を固定した。固定細胞を抗 SFTSV NP 抗体を用いて標識した。2 次抗体に FITC 標識抗体を用い、蛍光顕微鏡にて N 発現細胞数を測定した。
- 4) SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性
- a) SFTSV の調整: SFTSV 山口株を Vero E6 細胞にて増幅させ、同細胞にて抗 NP マウス血清を用いたフォーカス法により感染価 (FFU/ml) を測定した。
- b) SFTSV 蛋白質発現プラスミドの構築: RT-PCR 法にて各遺伝子断片 (NP, NS, Gn, Gc, Gn/Gc) の増幅を行い、それぞれ真核細胞用発現プラスミド pCI vector (プロメガ社) に挿入しクローニングした。
- c) プラスミド免疫法による抗血清の作製: 各プラスミドをそれぞれ ICR マウス (6 週齢, 雌) に 2 週間間隔にて 1 回あたり 50  $\mu$ g で大腿筋に接種した。時々、尾部より部分採血を行い、間接蛍光抗体法およびウェスタンブロット法により、抗血清としての有用性を検証した。
- d) SFTSV の Huh-7 細胞への感染と解析: 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た。上清については感染価を測定し、細胞についてはウェスタンブロット法により各種蛋白質の発現について調べた。
- 5) Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用
- a) SFTSV RNA を検出する系を基にして、real-time RT-PCR 機器 (Applied Biosystems 社, StepOnePlus) を用いて、SFTSV RNA の検出条件を検討した。国立感染症研究所の primer set に関しては、Takara 社 One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) を用いた。また今回作成した primer sets に関しては、Agilent 社 Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR master Mix, Invitrogen 社 Express One-step Superscript qRT-PCR kit 等を用いて検討した。PCR の条件はそれぞれの kit に応じて設定した。
- b) NCBI の website から入手した SFTSV YG1 strain の segment S の配列を基に以下の primer sets を選択し作成した。  
SFTSV-S173F:(173-192bp) GAGACAGGT GGAGATGATTG SFTSV-S357R (338-357bp) ACAGGAGTGATTGAGAGCCT. Probe は MGB probe SFTSV-S2-317 MGB CTGGTTGAGAGGGCA (森川茂研究分担者) を使用した。
- c) 機器は Applied Biosystems 社, StepOnePlus 及び、他の機種として Roche 社, Light Cycler, Bio-Rad CFX connect を用いた。
- d) ダニは北海道各地 (273 検体), 和歌山 (13 検体), 山形 (19 検体) から採集した 305 検体を用いた。各検体から RNA を抽出して、

本研究で作成した real time RT-PCR の系で SFTSV の RNA の発現を検索した。

- e) SFTSV(山口株)を生後2日目の Balb/c マウスに脳内接種し接種後10日目に各臓器を採集し、SFTSV の RNA の発現を検索した。
- 6) 抗 SFTSV 単クローン抗体の作製  
組換え SFTSV エンベロープタンパクのうち、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、これを抗原として作成する。北米株、中国、日本(YG1 株)のエンベロープ蛋白のアミノ酸配列の比較から、以下の部位 A, B, および C を選択した:A) 保存的な領域 198-380 aa;B) アジア型に固有の領域を含む 556-743 aa;C) 保存的な領域 789-966 aa。SFTSV YG1 株を感染させた VeroE6 細胞の総 RNA を抽出し、RT-PCR によって SFTSV の M segment の上記 A, B, および C をコードする領域を増幅した。

(倫理面からの配慮について)

「シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の解析」の研究で用いられた SFTSV 患者血清は行政検査依頼がなされたものを用いた。「SFTSV 症例の病理学的解析」の研究における病理検体を用いた 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)。「SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性」に関する研究における SFTSV の取扱いについては厚労省への届出のうえ、許認可された大分大学内 BSL3 実験室内に

て行った。プラスミド構築については、大分大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認(承認番号 25-5)を得て行われた。動物実験は大分大学動物実験委員会の承認(承認番号 P01001)を得て行われた。「Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用」研究で用いた SFTSV(山口株)は三種病原体として届け出を実施している。また、本研究は、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの微生物利用実験計画、特殊空調施設利用実験計画、さらに動物実験計画を提出し承認を受けている。

### C. 研究成果

- 1) シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の解析
- a) SFTSV の GP は、感染細胞およびプラスミドで発現させた Vero 細胞の表面にはほとんど存在せず、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(図 1)。
- b) 細胞表面に発現しない性質の GP であるために、シュードタイプウイルスの感染性は細胞表面に発現する種の GP を外套したものに比べて低いものの、RVFVpv と同程度の感染性を示した(図 2)。
- c) 様々な哺乳動物細胞株で SFTSVpv の感染性を比較したところ、多くの細胞株に感受性を示した(図 3)。一方で、リンパ球系細胞(Raji, Jurkat, Molt4)にはほとんど感染性を示さなかった(図 3)。
- d) バフィロマイシン A や塩化アンモニウムなどのエンドサイトーシス関連阻害剤処理により SFTSVpv の感染性および SFTSV の増殖は低下した(図 4)。RVFVpv でも同様の結

果となった。

- e) SFTS 回復患者血清によって SFTSVpv および SFTSV の感染は阻害されたが、VSVpv の感染は阻害されなかった(図 5)。
- f) 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、SFTSVpv 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 100 倍以上増強した(図 6)。

## 2) SFTS 患者の病理学的解析(患者概要と病理所見)

50 歳代女性。40°C の発熱、嘔吐、下痢(黒色便)により発症。明らかなダニ咬傷はなく、入院時血液検査所見では、白血球数(400/mm<sup>3</sup>)と血小板数(8.9 × 10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>)が著明に減少していた。また、AST, ALT, LDH, CK の高値が認められた。血液凝固系の異常、フェリチンの著明な上昇も認められた。尿検査で血尿、蛋白尿が認められた。胸腹部単純 CT では右腋窩リンパ節腫大を認めた。骨髓穿刺検査により、マクロファージによる血球貪食像を伴う低形成髄の所見が認められた。その後四肢脱力および肉眼的血尿と多量の黒色便を認め、入院 3 日目に全身状態不良となり死亡した。入院中に採取された血液からウイルスが分離され、SFTSV と同定された。血清は ELISA, IF 法による SFTSV に対する抗体検査において陰性であった。右腋窩リンパ節は 3.5×2.0cm 大に腫大しており、肝臓には脂肪変性が見られた。組織学的には、右腋窩リンパ節および右頸部リンパ節は正常な濾胞構造は消失しており、辺縁洞、皮質領域を中心として強い壊死と組織球、免疫芽球様細胞、

リンパ球などの浸潤が認められた。脾臓と骨髓には著明な血球貪食像、肝臓には小葉中心帯の肝細胞に軽度の大滴性脂肪沈着が見られた。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。骨髓、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。

## 3) 抗 SFTSV 薬の検討

SW13 細胞, 293T 細胞, Huh-7 細胞のいずれにおいても効率良い SFTSV 増殖が観察された。Huh-7 細胞からのウイルス産生量は 293T 細胞の約 20 倍、SW13 細胞からのウイルス産生量は 293T 細胞の約 5 倍であった。

単独使用においては全ての細胞でリバビリン、インターフェロン-α とともに強い抗ウイルス効果を示した(感染性ウイルス産生を ~5% まで減少)。

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(感染性ウイルス量 1% 以下)。S1P 阻害剤処理 SFTSV 感染細胞においてコレステロール添加の有無はウイルス増殖に影響しなかった。

## 4) SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性

- a) 作製した抗血清の有用性の検証: 各ウイルス蛋白質発現プラスミドをそれぞれマウスに接種することにより、各ウイルス蛋白質に対する抗血清の作製に成功した(図 7A)。特に、NP 発現プラスミドを接種したマウスでは、他

のプラスミド接種群に比べて抗体価が効率的に上昇し、フォーカス法によるウイルス感染価測定およびウェスタンブロット法による NP 蛋白質検出(図 7B)においても有用であることが確認された。

b) SFTSV の感染が Huh-7 細胞における血液凝固因子の発現に与える影響: 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(図 8A)。また、Huh-7 細胞内において、血液凝固因子の一つである組織因子(第 III 因子)の発現については感染細胞と非感染細胞の間に顕著な変化は認められなかったが、第 I 因子であるフィブリノゲンの発現については、その各サブユニット( $\alpha$ E 鎖,  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖および  $\gamma$  鎖)と想定されるシグナルの低下が感染細胞で認められた(図 8B)。また同様に、プロトロンビン(第 II 因子)の発現についても検討を行ったが、今回用いた抗体(abcam 社より入手)ではシグナルが検出されなかった。

5) Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用

a) Applied Biosystems StepOnePlus Instrument を用いて、今回作成した primer sets で条件検討した結果、Invitrogen の Express One-step Superscript qRT-PCR kit を用いた際に、感度、特異度とも良好な結果が得られた(plasmid 10 copy の CT と DW の区別が可能だった)。また他の機種においても同様の感度と特異度が得られた(図 9)。

b) 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、前述した real time RT-PCR を用いて検索した結果、これらの検体からは SFTSV の RNA は確認出来なかった。

c) 上記の実験系を用いて脳内接種した乳のみマウスの各臓器の SFTSV RNA の検出を試みた結果、脳において SFTSV RNA は強く検出された。また、脳以外の肺、肝、脾、腎からも弱いシグナルが検出された(図 10)。

6) 抗 SFTSV 単クローン抗体の作製

RT-PCR で得られた増幅断片は期待された分子量であった。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解析した結果、増幅とクローニングが確認された。現在この断片の大腸菌ベクターでの発現を試みている。

#### D. 考察

シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の解析: SFTSVpv は、RVFVpv と同様に様々な哺乳動物細胞に効率良く感染できることが明らかとなった。また、この感染は pH 依存的事であることから、エンドゾームでの膜融合で感染が成立すると考えられる。さらに、SFTSVpv は SFTSV と同様に SFTS 回復患者血清で特異的に中和することが明らかとなり、中和試験への応用が期待できる。C 型レクチンは SFTSV の侵入の際の増強因子になりうると考えられる。DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECtin は樹状細胞やマクロファージ、リンパ節や肝類洞の内皮細胞に発現しており、SFTSV がこれらの細胞に感染しやすい可能性がある。

SFTS 症例の病理学的解析: 多数の SFTSV 抗原陽性細胞が見られた右腋窩リンパ節には広範な壊死を伴うリンパ節炎が見られ, SFTSV 感染との関連が強く示唆される。脾臓や骨髄には著明な血球貪食像が見られたが SFTSV 抗原陽性細胞は少なく, 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網内系組織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。

抗 SFTSV 薬の検討: リバビリン, インターフェロン- $\alpha$ , S1P 阻害剤の何れも細胞種によって抗 SFTSV 効果に差が見られたが, 2 剤もしくは 3 剤併用すると, 相加的効果が観察された。それぞれの抗ウイルス効果が異なること, また, リバビリン, インターフェロン- $\alpha$  は既に C 型肝炎治療目的で使用されていることから SFTS 感染患者へのこの 2 剤併用療法が有効であることが示唆された。S1P は脂質・コレステロール合成を制御する細胞性因子として知られているが, 本研究において S1P 阻害剤が SFTSV 増殖を抑制するものの S1P 阻害+コレステロール添加が SFTSV 増殖を回復しなかったことから, SFTSV は① S1P によって直接制御されている, もしくは② S1P によって制御されるコレステロール・脂質以外の細胞性因子によって制御されているという 2 つの可能性が考えられる(図 11)。

SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性: 今回, SFTSV 山口株の Huh-7 細胞への感染が, 細胞内のフィブリノゲンの発現低下をもたらすことを示唆する結果が得られた。肝臓のフィブリノゲン

産生量の低下は易出血性につながり, SFTS における病態と矛盾しない。しかしながら, 今回使用した抗フィブリノゲン抗体は, 精製したヒトのフィブリノゲンを免疫原にして作製されたポリクローナル抗体であるため, この抗体により検出されたそれぞれのシグナルが本当にフィブリノゲンの各サブユニットに由来するののかについては疑いが残る。これについては, 各サブユニットに対する特異的抗体を用いて再検証する必要がある。また, 他の血液凝固因子やアルブミン等でも SFTSV 感染により培養肝細胞で発現が低下するののか確認する必要がある。さらに, このような SFTSV 感染による肝細胞機能の低下は, どのウイルス蛋白質の発現によりもたらされるののかについて発現プラスミドを用いて検証する必要がある。

Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用: 本研究において, Applied Biosystems 社, StepOnePlus 機器に適した Real time RT-PCR の系を構築した。この系を用いてダニからの SFTSV RNA の検出を試みたが現在の段階では陽性結果は得られていない。SFTSV を接種した乳のみマウスの脳内では, SFTSV は接種後少なくとも 10 日間は存在することが示唆された。

抗 SFTSV 単クローン抗体の作製: 今後, 作成した抗原をマウスに免疫し, 常法によりモノクローナル抗体を作成する。スクリーニングは SFTSV 感染 Vero 細胞を抗原とした間接蛍光抗体法によって実施し, さらに中和活性の測定, 合成ペプチドによるエピトープの特定を行うことにより, 特定の部位に結合するモノクローナル抗体を樹立する。

## E. 結論

SFTSV<sub>pv</sub> は今後 SFTSV の細胞侵入を解析する上で、より簡便に評価するツールになる。また、回復患者における中和抗体検出のための中和試験にも応用できることが明らかにされた。

日本国内で確認された SFTS 患者の剖検例につ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核酸検査を組み合わせた病理学的解析を行い、SFTS の病理像の一端を明らかにした。

ヒト培養細胞において、リバビリン、インターフェロン- $\alpha$ 、S1P 阻害剤はそれぞれ SFTSV に対して抗ウイルス効果を示し、それぞれの併用は相加的抗ウイルス効果を示した。

SFTSV の感染はヒト肝細胞癌由来 Huh-7 細胞において血液凝固因子の一つであるフィブリノゲンの発現を低下させることが示唆された。また、今回作製した SFTSV の各ウイルス蛋白質に対する抗血清は、本研究課題の遂行において非常に有用であることが確認された。

Applied Biosystems 社、StepOnePlus 機器に適した Real time RT-PCR の系を構築し、疫学

研究および動物実験を実施した。

部位特異的な抗体を用いて、中和、レセプター結合、細胞融合等のエンベロープ蛋白質の機能解析およびアジア型と北米型の鑑別、診断法の構築等数多くの応用が期待される。

## F. 健康危険情報

大分県健康対策課と共に、県内の SFTSV 侵淫状況の調査を飼育犬、放浪犬、野外植生ダニなどを対象に鋭意進行中である。これまで一部のイヌに抗体を保有している陽性例が確認されている。ただし、SFTS 患者発生は報告されていない。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
特になし
2. 学会発表  
特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 研究協力者と分担課題

研究協力者	所属	役割分担
谷英樹, 福士秀悦, 下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第1部	SFTSV の感染機構の解析
鈴木忠樹	国立感染症研究所感染病理部	SFTS 症例の病理学的解析
安田二郎	長崎大学熱帯医学研究所	抗 SFTSV 薬の検討
西園晃, 山田健太郎	大分大学医学部	SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性
澤洋文	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用
有川二郎, 吉松組子	北海道大学医学研究科	抗 SFTSV 単クローン抗体の作製



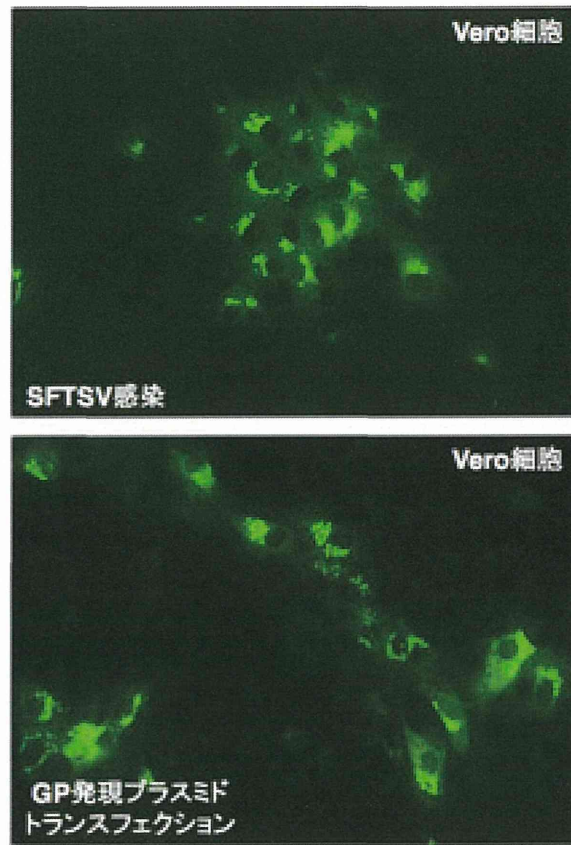


図 1. SFTSV-GP 蛋白質の細胞内局在

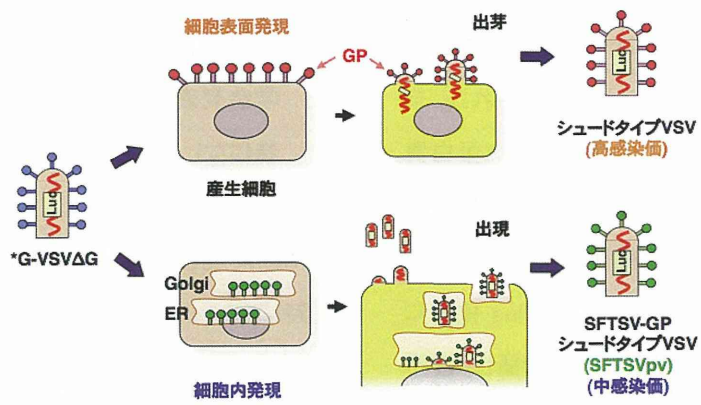


図 2. SFTSV-GP シュードタイプ VSV (SFTSVpv)

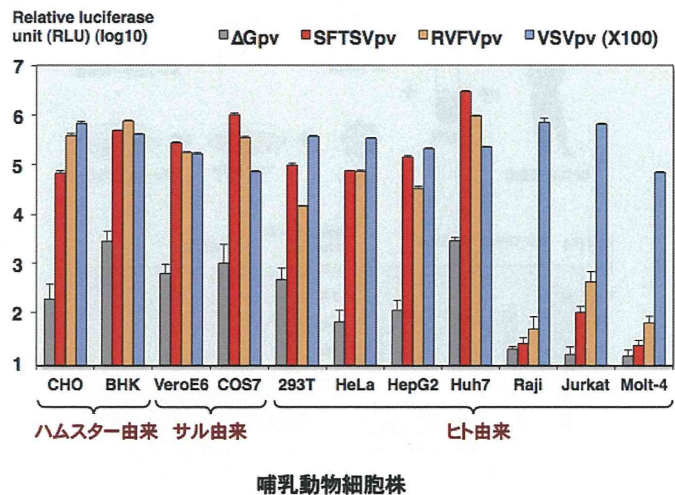


図 3. SFTSVpv の各種哺乳動物細胞への感染性

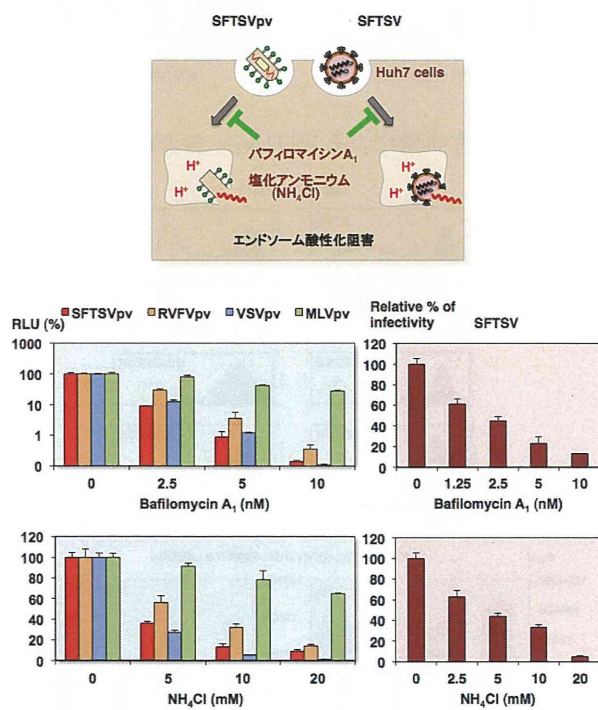


図 4. H<sup>+</sup>-ATPase 阻害剤による SFTSVpv および SFTSV の感染阻害

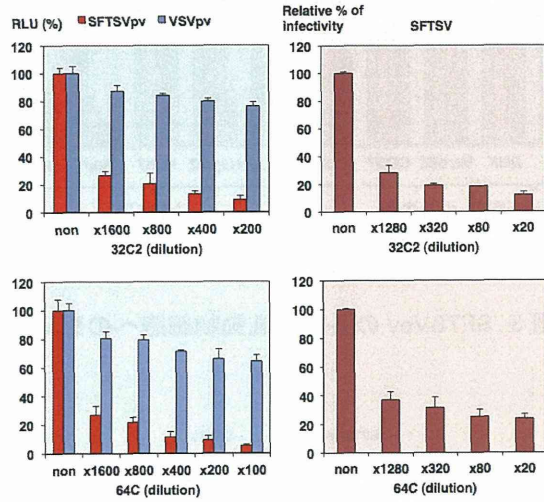
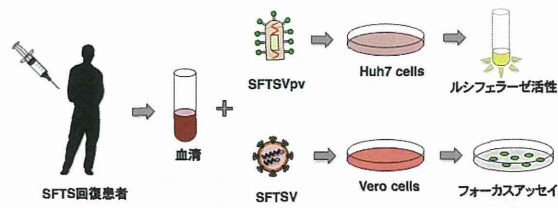


図 5. SFTS 回復期患者血清による SFTSVpv および SFTSV の感染中和

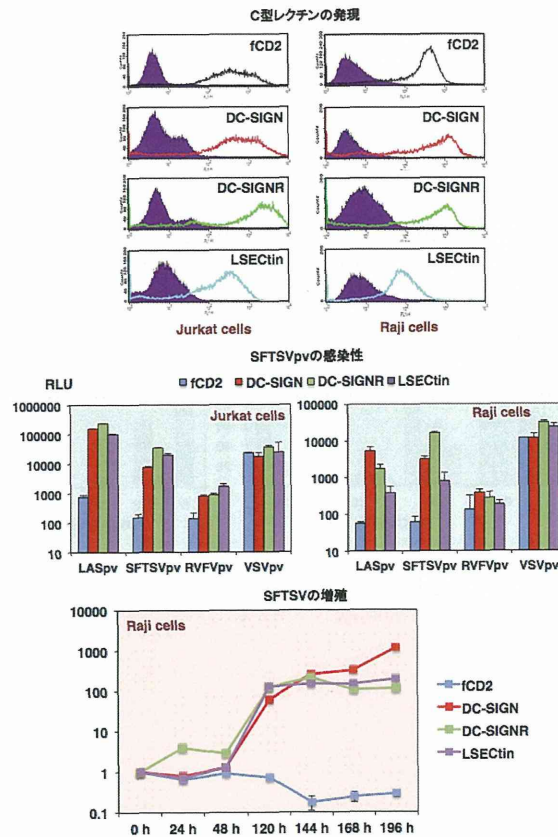


図 6. C 型レクチン発現細胞における SFTSVpv の感染性および SFTSV の増殖効果

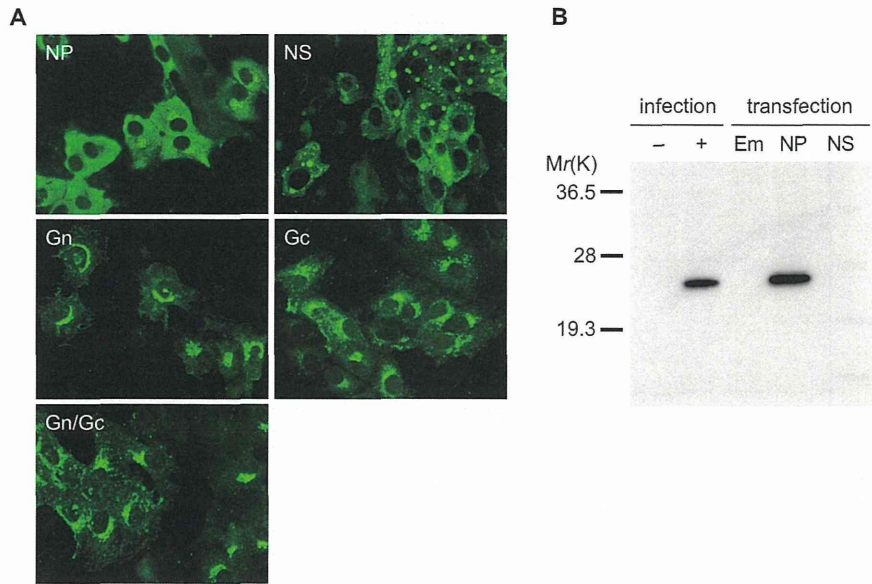


図 7. 各ウイルス蛋白質に対する抗血清の有用性の検証. A) 間接蛍光抗体法により各抗血清の SFTSV 感染 Vero 細胞に対する反応性を検討した. 2 次抗体には Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Life Technologies) を使用した. B) ウェスタンブロット法による検出での抗 NP 血清の有用性について, SFTSV 感染 Vero E6 細胞および発現プラスミド導入 Vero E6 細胞を用いて検討した. 図中の Em は空 (Empty) ベクターの導入を示す.

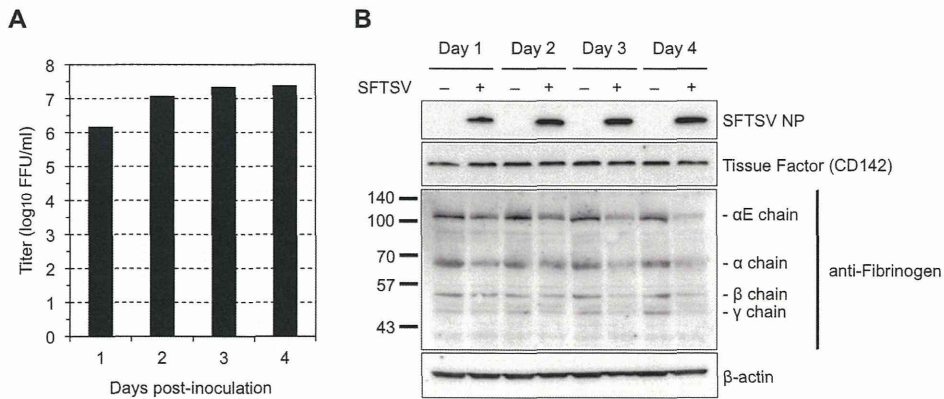


図 8. SFTSV の感染が Huh-7 細胞における血液凝固因子の発現に及ぼす影響. SFTSV を Huh-7 細胞に multiplicity of infection (moi) 10 以上で接種し, 経時的に培養上清と細胞を回収した. A) 培養上清中のウイルス感染価については, Vero E6 細胞を用いてフォーカス法により測定した. B) 細胞については, ウェスタンブロット法により各種蛋白質の発現について検討した. 抗組織因子 (Tissue factor) 抗体は Bioass 社, 抗フィブリノゲン抗体は abcam 社および抗 β-actin 抗体は abm 社より入手した.