

- 前田健. 野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査. 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会(山口大学)(2014, 05)
- 22) 早坂大輔, 余福勲, 吉川亮, 嶋田聡, Guillermo Posadas Herrera, Mya Myat Ngwe Tun, 吾郷昌信, 森田公一. 長崎県における野生動物およびマダニの SFTS ウイルス感染状況の調査. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)
- 23) Nishio S, Tsuda Y, Ito R, Shimizu K, Yoshimatsu K, Arikawa J. Seroepidemiological and biological studies on SFTSV. The 10th China-Japan International Conference of Virology Changchun, China (2014.08)
- 24) Ito R, Tsuda Y, Nishio S, Shimizu K, Yoshimatsu K, Arikawa J: Analysis of intracellular localization of virus proteins of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Taipei, Taiwan (2015.01)
- 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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

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 の診断・治療・予防法に関する研究: 中和抗体測定法の開発

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・室長

研究要旨：SFTS ウイルスを多数回にわたり継代して得られた SPL030 p50-2 株は、通常分離直後の SFTS ウイルスと異なり Vero 細胞でプラークを形成することができる。この性状変化を利用し、以下の 2 点の成果を得た。1：長期培養や特異抗体を必要としない迅速かつ安価な中和抗体価測定法の確立。2：ウイルス蛋白質 GP の細胞膜融合能を変化させるアミノ酸の同定。これらの成果は SFTS 診断の迅速化や普及、SFTS ウイルスの基本性状の解明に貢献すると思われる。

A. 研究目的

ウイルスは一般的に継代(実験的な増殖)を重ねることにより弱毒化する等、性状が変化することが知られている。この現象は一方では変異した蛋白質の性状解析など基礎研究で用いられることもあるし、また他方では弱毒生ワクチンとしてそれぞれの感染症に対する対策として応用されている。

SFTS ウイルスを Vero 細胞で 50 回継代したところ、通常分離直後のウイルスと比べ明らかに早く増殖し、明瞭なプラークを形成できるように性状が変化したウイルス株(SPL030 p50-2 株とする)が得られた。このウイルス株を SFTS の診断の1つ、中和抗体価の測定に活用できないか、また特に GP 蛋

白質の基本性状解析に活用できないか検討した。

B. 研究方法

1) 中和抗体価測定法

従来の中和抗体価測定法：SPL030 p50-2 のもとである継代回数が少ないウイルス株(SPL030 Original 株とする)を被検血清と混合後 Vero 細胞に接種し、メチルセルロース存在下で 8 日間培養した。ホルマリンで固定後、SFTS ウイルスの NP 蛋白質に対する特異ウサギ抗体を反応後、更に HRP ラベルの抗ウサギ抗体を反応させた。DAB で発色させ、フォーカス数を数えて中和抗体価を算出した。

p50-2 株を用いた中和抗体価測定法：

p50-2 株を被検血清と混合後 Vero 細胞に接種し、アガロース存在下で3日間培養した。ニュートラルレッドを加えて一晩培養し、プラーク数を数えて中和抗体価を算出した。

2) GP 蛋白質の細胞融合能評価

SFTS ウイルスより RNA を精製し cDNA を得て、ゲノム塩基配列の決定と GP 遺伝子の発現プラスミドへのクローニングを行った。またプライマーに基づく変異導入も行った。GP 発現プラスミドを蛍光蛋白質 Venus 発現プラスミドと共に Vero 細胞に導入後、様々な pH の溶液に一定時間暴露させ、通常の培養液(DMEM)で2時間培養し、融合細胞の有無や大きさを蛍光顕微鏡下で観察した。

(倫理面からの配慮について)

SFTS(疑い)患者および健常人の血清の利用については国立感染症研究所倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) SFTS(疑い)患者および健常人の血清について、従来の中和抗体価測定法による中和抗体価および p50-2 株を用いた中和抗体価測定による中和抗体価に示した(図 1)。2 つの測定法による中和抗体価に大きな差異は認められなかった。

2) SPL030 の Original 株および p50-2 株の塩基配列では、GP 遺伝子の 6 か所に違いが認められ、うち 4 か所はアミノ酸変異も伴うものであった(図2)。Original 株および p50-2 株の GP 蛋白質の細胞融合能には差があり、後者

はより高めの pH で細胞融合を起こしていた。GP 蛋白質の細胞表面への発現量に差は認められなかった(図3)。

3) GP 蛋白質に認められた 4 つのアミノ酸変異のうち、962 番のアミノ酸変異が Original 株の GP 蛋白質と p50-2 株の GP 蛋白質の細胞融合能の差をもたらす変異であった(それぞれセリンおよびアスパラギン)。

D. 考察

SPL p50-2 株を用いた中和抗体価測定法は少ない日数で終了できかつ特異抗体を必要としないにも拘らず、従来の中和抗体価測定法と同様の結果を示した。

SPL p50-2 株の少なくとも GP 蛋白質には変異が認められ、細胞融合が比較的高い pH でも起こせるように性状が変化していた。この性状変化は GP 蛋白質の 962 番のアミノ酸変異によりもたらされていた。p50-2 株が示す明瞭なプラーク形成能の一因はこのアミノ酸変異によるものと考えられた。

E. 結論

SPL030 p50-2 株を用いた迅速かつ安価な中和抗体価測定法を確立した。SFTS ウイルスの GP 蛋白質による細胞融合は GP 蛋白質の 1 アミノ酸により変わりうるものであることが判明した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani Hi, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. J Clin Microbiol 52:3325-3333, 2014
- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe

fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. Jpn J Infect Dis 67:423-427, 2014

2. 学会発表

- 1) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷 英樹, 谷口 怜, 西條政幸. プラークを形成するSFTSウイルスによる中和抗体価測定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし.
2. 実用新案登録
該当なし.
3. その他
該当なし.

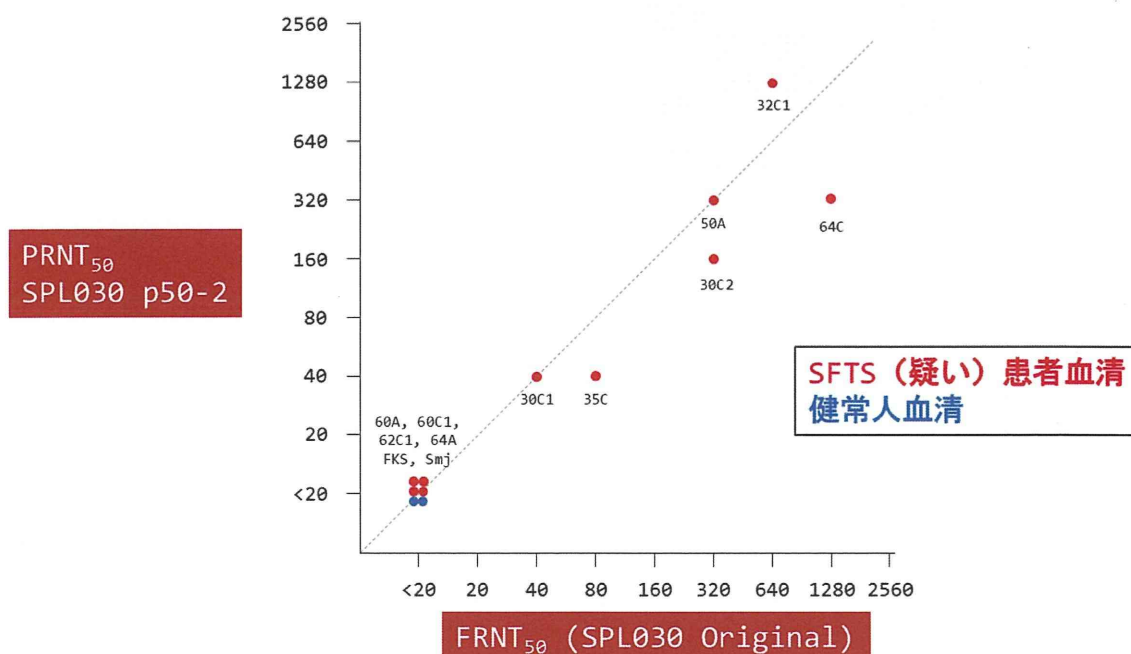


図 1: 2つの中和抗体価測定法によるヒト血清の中和抗体価の比較

GP sequence	328	1149	1382	1828	2289	2885
Original	A (110K)	T	T (461L)	C (610P)	T	G (962S)
p50-2	G (110E)	C	A (461H)	T (610S)	C	A (962N)

図 2: Original 株と p50-2 株の GP 遺伝子の差異

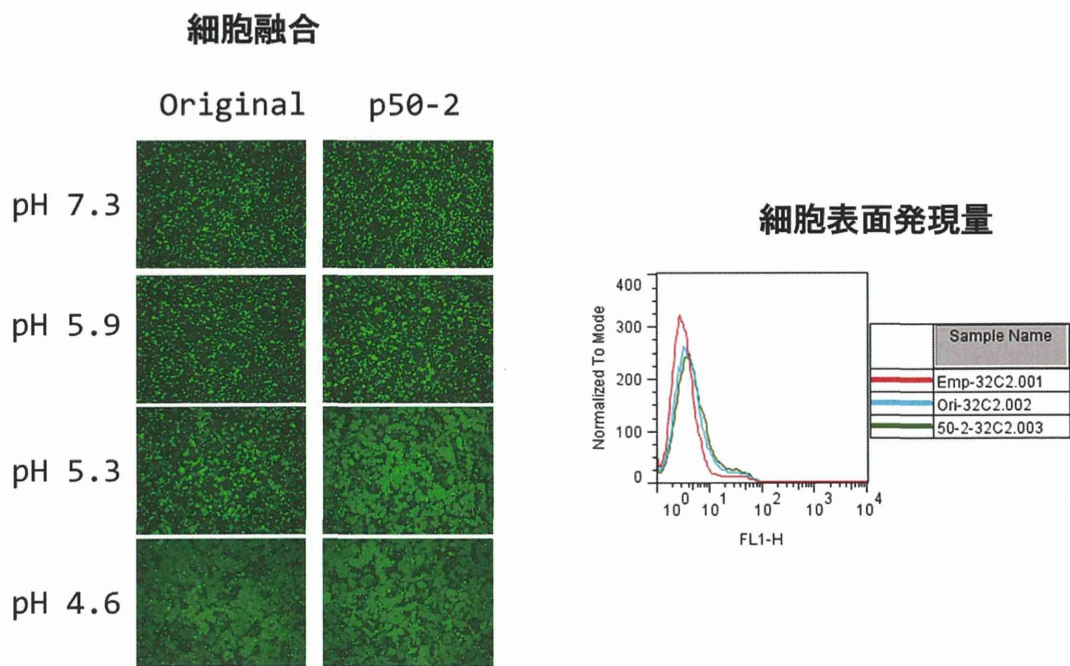


図 3: SFTS ウイルス GP 蛋白質による細胞融合と細胞表面発現量

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

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 の診断・治療・予防法の開発に関する研究:

重症熱性血小板減少症候群剖検症例の病理学的解析

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:	長谷川秀樹	国立感染症研究所 感染病理部・部長
	片野晴隆	国立感染症研究所 感染病理部・室長
	永田典代	国立感染症研究所 感染病理部・室長
	中島典子	国立感染症研究所 感染病理部・主任研究官
	鈴木忠樹	国立感染症研究所 感染病理部・室長

研究要旨: 新しい感染症である SFTS の有効な予防・治療法を確立するためには、その病態形成機構を正しく理解する必要がある。そのためには、ヒト症例の病理学的解析が必要不可欠である。国立感染症研究所感染病理部で、これまでに 15 例の剖検例について病理解析を行った結果、①大型リンパ球の浸潤が目立つ壊死性リンパ節炎、②節外臓器への大型リンパ球浸潤、③著しい血球貪食が SFTS の病理学的特徴であり、ウイルスは主にリンパ組織に存在する大型リンパ球で増殖していると考えられた。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日本からの数例に留まり、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。

A. 研究目的

新しい感染症である SFTS の有効な予防・治療法を確立するためには、その病態形成機構を正しく理解する必要がある。そのためには、ヒト症例の病理学的解析が必要不可欠である。ウイルス感染症の病理解析のためには、病変部においてウイルスの存在を正確に把握することができるウイルス特異的な免疫組織

化学、ISH(In situ hybridization)法、遺伝子検査などが必要不可欠である。国立感染症研究所感染病理部では SFTS の病理解析のためにこれらの検査系を確立し、SFTS の病理診断について全国の医療機関からコンサルテーションを受け付けている。そこで本研究では、SFTS の病理像を明らかにすることを目的に、これまでにコンサルテーション依頼のあった

15 例の剖検例について病理学的手法によりウイルス感染と病変との関連性について解析した。

B. 研究方法

1) 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 15 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。

2) 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(国立感染症研究所ウイルス第一部作製)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 分間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)を用いてプロトコール通り免疫染色を実施した。

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°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)を用いてプロトコール通り免疫染色を実施した。

3) 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 beta-actin の検出を行った。

(倫理面からの配慮について)

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) SFTS 剖検例の病理学的解析

ほとんどの症例において、表在若しくは深部リンパ節の腫脹を認めており、それらの腫脹し

たリンパ節には Cell debris や核崩壊産物が目立つ壊死と大型リンパ球の浸潤を伴う壊死性リンパ節炎が見られた。激しい壊死がリンパ節全域に及ぶことが多いが、好中球などの顆粒球浸潤はほとんど見られなかった。SFTSV NP 抗原は、上記の所見を伴うリンパ組織に存在する大型リンパ球の細胞質と壊死部の Cell debris に検出された(図 1)。全身のリンパ節や脾臓、骨髄など網内系組織に多数の血球貪食像を認めた。一部の症例において、これらの細胞の細胞質に貪食された感染細胞と考えられる抗原陽性像が見られたが、血球貪食細胞がウイルス感染の主要な標的となっているとは考えにくい所見であった。骨髄では、著明な血球貪食像は認めるが明らかな巨核球の減少は見られず、血小板減少は産生量減少によるものであるとは考えにくい所見であった。骨髄、肝臓、脾臓、副腎などの臓器を主体に大型リンパ球浸潤、抗原陽性細胞が見られたが、明らかな節外臓器実質細胞への感染は見られなかった。また、リンパ節に抗原陽性細胞が限局する症例と腸管(図 2)や肺、腎臓、甲状腺などの全身諸臓器に抗原陽性細胞が分布する症例が存在した。全身諸臓器に抗原陽性細胞が分布する症例においては、約半数の症例において組織内毛細血管内に大型リンパ球の集簇像が見られ、同細胞にウイルス抗原陽性となり、ウイルス感染リンパ球が全身を循環していると考えられた。そのような症例においても明らかな節外臓器実質細胞への感染は見られなかった。

D. 考察

日本国内で発症した SFTS 致死例の 15 症例について病理学的解析を行った結果、壊死性リンパ節炎と血球貪食像が SFTS の病理学的特徴であると考えられた。臨床的には同様の経過をたどった致死症例ではあるが、ウイルス感染細胞分布にいくつかのパターンが存在しており、SFTS 病態形成に複数の機構が関与していることが考えられた。SFTS の病理学的解析は、日本のみで実施されている。最近、米国で SFTS ウイルスの近縁ウイルスである Hartland ウイルスの致死症例の剖検解析について報告があったが、ウイルス感染細胞は SFTS に類似していたにも関わらず、血球貪食像に乏しく、SFTS の病理像とは大きく異なっていた。今後、SFTS ウイルスと Harland ウイルスの標的細胞とその病理を比較解析していくことにより、SFTS を始めとした新しいフレボウイルス感染症の病態が明らかになることが期待される。

E. 結論

国立感染症研究所感染病理部で、これまでに 15 例の剖検例について病理解析を行った結果、①大型リンパ球の浸潤が目立つ壊死性リンパ節炎、②節外臓器への大型リンパ球浸潤、③著しい血球貪食が SFTS の病理学的特徴であり、ウイルスは主にリンパ組織に存在する大型リンパ球で増殖していると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiraki T, Yoshimitsu M, Suzuki T, Goto Y, Higashi M, Yokoyama S, Tabuchi T, Futatsuki T, Nakamura K, Hasegawa H, Saijo M, Kakihana Y, Arima N, Yonezawa S. Two autopsy cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in Japan: A pathognomonic histological feature and unique complication of SFTS. Pathology International 64(11):569-575, 2014

2. 学会発表

- 1) 長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋徹, 鈴木忠樹, 片野晴隆, 中島典子, 森川茂, 西條政幸, 倉田毅. 日本国内で発生した重症熱性血小

板減少症候群の病理解析. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, (2014. 4)

- 2) Suzuki T, Hasegawa H. Pathology and pathogenesis of emerging and re-emerging viral infections. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 神奈川, (2014. 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし.

1. 特許取得
該当なし.
2. 実用新案登録
該当なし.
3. その他
該当なし.

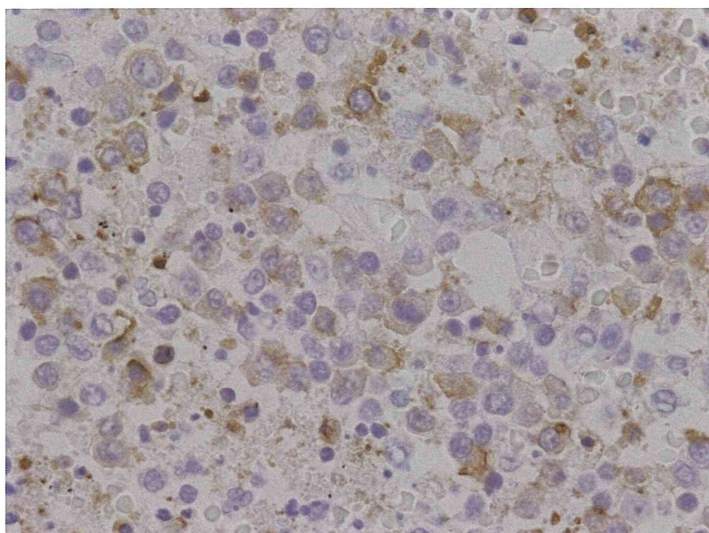


図 1. 壊死性リンパ節炎を伴うリンパ節の抗 SFTSV NP 抗体による免疫組織化学. 多数の大型リンパ球浸潤が見られ, 同細胞の細胞質と壊死した細胞残屑に抗原陽性となる.

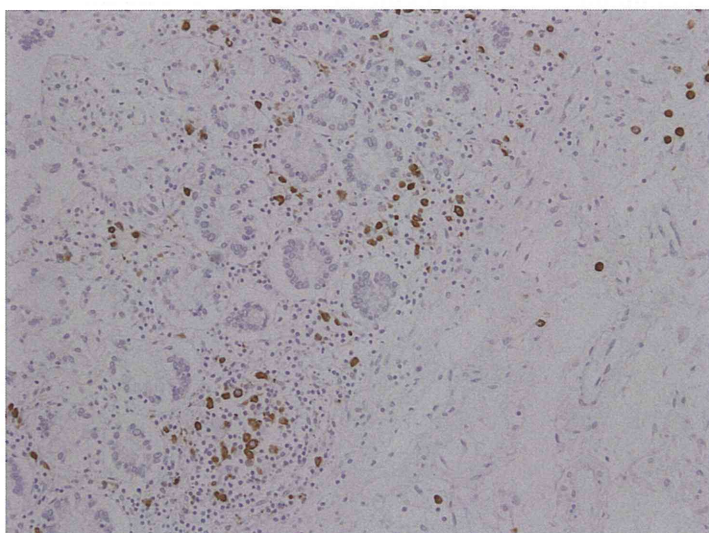


図 2. 全身諸臓器に抗原陽性細胞が見られた症例の回腸粘膜組織. 粘膜固有層にウイルス抗原陽性となる大型リンパ球の浸潤を認める. 腸管上皮細胞にウイルス抗原は検出されない.

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

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 の診断・治療・予防法の開発に関する研究:重症熱性血小板減少症候群ウイルスの
分子系統学的特徴とその地理的分布との相関についての研究

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	吉河智城	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
研究協力者	下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・室長

研究要旨:重症熱性血小板減少症候群(SFTS)はダニによって媒介されるSFTSウイルス(SFTSV)により引き起こされる急性感染症であり,日本,中国,韓国で患者が報告されている.既に我々のグループは,日本で確認されたSFTSVの塩基配列を中国で確認されたウイルス株とともに分子系統学的解析を行ったところ,日本の株は中国株と比較して系統学的に独立していることを明らかにした.しかし国内初の患者確認は2013年であり,当時解析に供することができた日本の株は8株と限定されていた.そこで本研究では,より詳細な知見を得るために更に最近までの国内発生患者由来のSFTSVゲノム塩基配列の決定を行い,分子系統学的解析を行った.その結果,SFTSVはその系統樹の根から大きく2つのクレードに分けることが出来た.この分類は日本で確認された株と中国/韓国で確認された株という地理的な分布と一致した.ウイルスは8つの遺伝子型に分類可能であり,中国/韓国のクレードに5種類,日本のクレードに3種類存在していた.更に日本で確認された,いくつかの株については中国のクレードに分類されること,一方中国で確認されたいくつかの株については日本のクレードに分類されることが明らかとなった.

A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)はダニによって媒介されるSFTSウイルス(SFTSV)により引き起こされる急性感染症であり,日本,中国,韓国で患者が報告されている.既に我々のグループは,日本で確認された

SFTSVの塩基配列を中国で確認されたウイルス株とともに分子系統学的解析を行ったところ,日本の株は中国株と比較して系統学的に独立していることを明らかにした.しかし国内初の患者確認は2013年であり,当時解析に供することができた日本の株は8株と限定

されていた。そこで本研究では、より詳細な知見を得るために更に2014年の国内発生患者由来のSFTSVゲノム塩基配列の決定を行い解析に供した。

B. 研究方法

国立感染症研究所ウイルス第一部で開発した検査法により、SFTSVゲノムが含まれていることが確認された患者の血液検体からRT-PCR法及び次世代シーケンシング法を用いて、その塩基配列の決定を行った。これにより新規に決定された75株と既報の8株を含めた合計83株の日本で確認されたウイルス株を、データベース上に登録されていた中国で確認された株と韓国で確認された株を含めてL, M, S各分節ゲノムそれぞれの塩基配列について分子系統学的解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

本研究は国立感染症研究所人を対象とする医学研究倫理審査委員会において審議され、承認されている。

C. 研究結果

SFTSVはその系統樹の根から大きく2つのクレードに分けることが出来た(図1)。この分類は日本で確認された株と中国/韓国で確認された株という地理的な分布と一致した。ウイルスは8つの遺伝子型に分類可能であり、中国/韓国のクレードに5種類、日本のクレードに3種類存在していた。更に日本で確認された3株については中国のクレードに分類されること、一方中国で確認されたいくつかの株につ

いて日本のクレードに分類されることが明らかとなった。

D. 考察

系統樹の根、つまり共通祖先から直ちに分岐している2つのクレードによるウイルス株の分類と、その地理的分布が一致することからSFTSVはウイルス出現後の早い段階から日本と中国/韓国というそれぞれの地域で独立して進化を遂げてきたことが強く示唆された。日本と中国のどちらの地域においても複数株の別のクレードのウイルス株の存在が確認されたこと、そして少なくとも日本国内の患者に渡航歴は無かったことより、ウイルスは海を越えて別の地域に伝播していることが明らかとなった。

E. 結論

SFTSVの分子系統学的な特徴はその地理的分布とよく相関することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

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):816-827, 2014
- 2) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains and prediction of patient survival based on viral load. *J Clin Microbiol* 52:3325-3333, 2014
- 3) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 67: 423-427, 2014
- 4) 谷英樹, 西條政幸:重症熱性血小板減少症候群ウイルス:バイオセーフティと家族内感染および院内感染に対する対応, *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 35: 37-38, 2014
- 5) 谷英樹, 西條政幸:重症熱性血小板減少症候群(SFTS), *血液フロンティア* 24: 80-83, 2014
- 6) 福士秀悦, 吉河智城, 谷英樹, 福間藍子, 下島昌幸, 西條政幸:重症熱性血小板減少症候群の検査法, *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 35: 40-41, 2014
- 7) 下島昌幸, 西條政幸:中国での重症熱性血小板減少症候群の発生状況, *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 35: 33-34, 2014
- 8) 谷英樹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. *臨床検査* 58(4):467-473, 2014
- 9) 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS ウイルス感染症). *日本医師会雑誌 感染症診療 update* 143 特別号(2): S398-399, 2014
- 10) 西條政幸. 日本におけるマダニ媒介性ウイルス感染症の発見 -TBEとSFTS-. *小児科臨床* 67:1245-1249, 2014
- 11) 西條政幸. 新興ウイルス感染症と重症熱性血小板減少症候群. *日本臨床内科医会会誌* 29:69-76, 2014
- 12) 西條政幸. 日本における重症熱性血小板減少症候群と今後の課題. *日本内科学会雑誌* 103:2581-2586, 2014
- 13) 石堂亜希, 重岡徹, 富永貴元, 末広泰子,

福士秀悦, 下島昌幸, 西條政幸, 高橋徹.
重症熱性血小板減少症候群(SFTS)様の
症状を呈した患者における抗 SFTS ウィル
ス抗体の検討. 山口医学 63:257-261,
2014

- 14) Hiraki T, Yoshimitsu M, Suzuki T, Goto Y,
Higashi M, Yokoyama S, Tabuchi T,
Futatsuki T, Nakamura K, Hasegawa H,
Saijo M, Kakihana Y, Arima N, Yonezawa
S. Two autopsy cases of severe fever
with thrombocytopenia syndrome (SFTS)
in Japan: A pathognomonic histological
feature and unique complication of SFTS.
Pathol Int 64(11):569-75, 2014
- 15) Ohagi Y, Tamura S, Nakamoto C,
Nakamoto H, Saijo M, Shimojima M,
Nakano Y, Fujimoto T. Mild clinical course

of severe Fever with thrombocytopenia
syndrome virus infection in an elderly
Japanese patient. Case Rep Infect Dis.
2014;2014:918135.

2. 学会発表

- 1) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹,
福間藍子, 谷口怜, Harpal Singh, 須田遊
人, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸.
重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分
子系統学的特徴とその地理的分布との相
関. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会,
横浜,(2014.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

M Segment

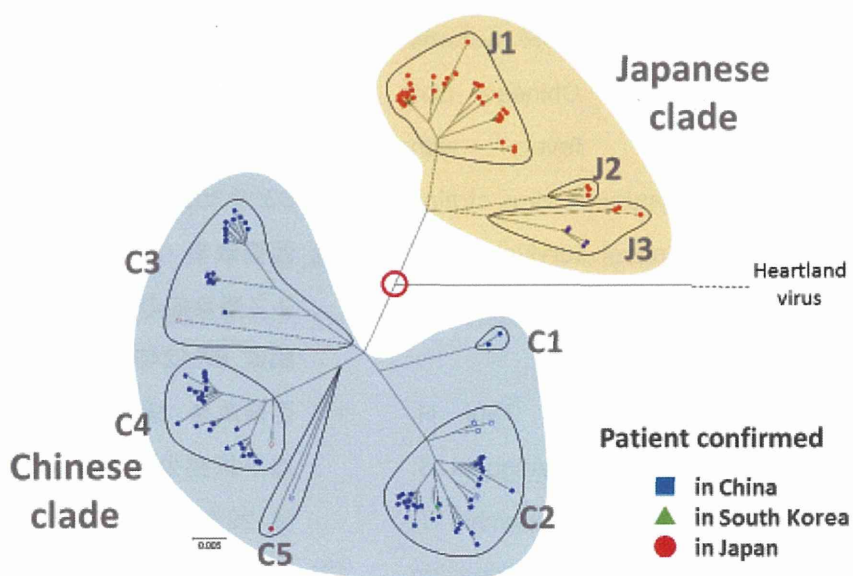


図 1. SFTSV M セグメントの系統樹

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

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 の診断・治療・予防法に関する研究:SFTS ウイルス抗原検出法の開発

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	福間藍子	国立感染症研究所ウイルス第一部・流動研究員
研究協力者	谷口怜	国立感染症研究所ウイルス第一部第一室・研究員
研究協力者	福士秀悦	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
研究協力者	谷英樹	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
研究協力者	吉河智城	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
研究協力者	下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・室長
研究協力者	森川茂	国立感染症研究所獣医科学部・部長
研究協力者	鈴木忠樹	国立感染症研究所感染病理部・室長
研究協力者	長谷川秀樹	国立感染症研究所感染病理部・部長

研究要旨:重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体を作出し、それをを用いた抗原検出 ELISA 法を開発した。また、SFTS 患者から採取された病理組織中の SFTS ウイルス抗原を、このモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学法により検出できることが明らかにされた。これらの SFTS ウイルス核蛋白質検出法は SFTS の診断に有用である。

A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)は、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)によって引き起こされるダニ媒介性感染症で、ヒトにおいて致死率 10%を超える重篤な疾患を引き起こす。2013 年に日本国内における SFTS 患者の存在が明らかとなって以降、新

たな患者の発生が発生していることから、迅速で簡便な SFTS 診断法の整備が急務である。本研究では、SFTSV の核蛋白質(SFTSV-N)を認識するモノクローナル抗体を作製し、これを用いて SFTSV-N 抗原検出 ELISA 法を開発し、その診断における有用性について検討した。

B. 研究方法

1) モノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA

SFTSVのN遺伝子領域をクローニングし、バキュロウイルス発現系により組換え核蛋白質(rN)を発現させた。精製されたrNをマウスに免疫し、ハイブリドーマ細胞を作製し、SFTSV感染細胞を抗原としたELISAでモノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングした。得られたモノクローナル抗体は、間接蛍光抗体法及び免疫組織染色を用いて反応性を確認した。得られたモノクローナル抗体とrNをウサギに免疫して得られたウサギ抗rN血清を、それぞれ補足用抗体と検出用抗体とした抗原検出ELISAを開発した。SFTS疑い患者の急性期血清を用いて本ELISAのSFTSの診断における有用性を、ウイルス遺伝子検出のための定量RT-PCRと比較して検討した。

(倫理面からの配慮について)

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。SFTSV-Nに対するモノクローナル抗体作製は国立感染症研究所動物実験倫理委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

1) モノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA

rNをマウスに免疫し、2つのモノクローナル抗体(9D3および2D11)を作製した。間接蛍光抗体法では、これらのモノクローナル抗体は、他のフレボウイルス(RVfV、

Forecariah virus, Palma virus)の感染細胞には反応せず、SFTSV感染細胞特異的に反応した(図1)。また免疫組織染色の結果、これらのモノクローナル抗体はSFTSV患者組織特異的に反応した(図2)。モノクローナル抗体9D3を補足用抗体として用いた抗原検出ELISAの検出最少濃度は、rNで5 pg/100 μ lであった。ウイルスそのものを抗原として用いたところ、中国株1株(HB29株)と日本株3株はいずれも検出可能であり、検出感度は350(SPL010株)-1,220(YG1株)TCID₅₀/100 μ lであった。SFTS疑い患者の急性期血清61検体について抗原検出ELISAを行なった結果、定量RT-PCR陽性37検体中27検体が陽性であり、10⁵ copies/ml以上のウイルスRNAを含む24検体はすべて抗原検出ELISAで陽性であった。一方、10⁵ copies/ml以下の検体は抗原検出ELISAで陰性になる傾向が見られた(表1)。定量RT-PCRで陰性を示した検体はすべて陰性であった(感度73%、特異度100%)。

D. 考察

本研究において、SFTSV-Nを特異的に認識するモノクローナル抗体が得られた。また本研究で開発された抗原検出ELISAは、定量RT-PCRと比較し感度は低いものの、ウイルスRNA量の高い検体(10⁵ copies/ml以上)中のウイルス検出が可能であった。SFTS患者の血中ウイルスRNA量は、発症後10⁵⁻⁶ copies/mlに達し、死亡患者では10⁷ copies/ml以上に増加することが報告され

ている。したがって、本研究で開発された抗原検出 ELISA は、SFTS の急性期診断法の一つとして、また予後の推測に有用であると考えられた。

E. 結論

SFTSV の核蛋白質を特異的に認識する抗体が得られた。高いウイルス RNA 量を含む検体中のウイルス検出可能な抗原検出 ELISA が構築された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol* 52:3325-3333, 2014

- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S,

Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis* 67:423-427, 2014

2. 学会発表

- 1) Fukuma A, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Ogata M, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montréal, Canada. (2014.07)
- 2) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 谷英樹, 谷口怜, 鈴木忠樹, 佐藤由子, 長谷川秀樹, 下島昌幸, 西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし。

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。

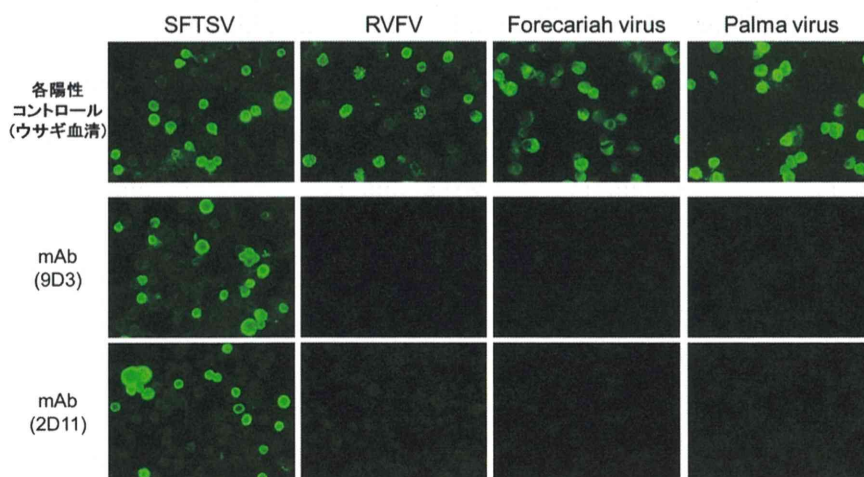


図 1. 間接蛍光抗体法による単クローン抗体の特性

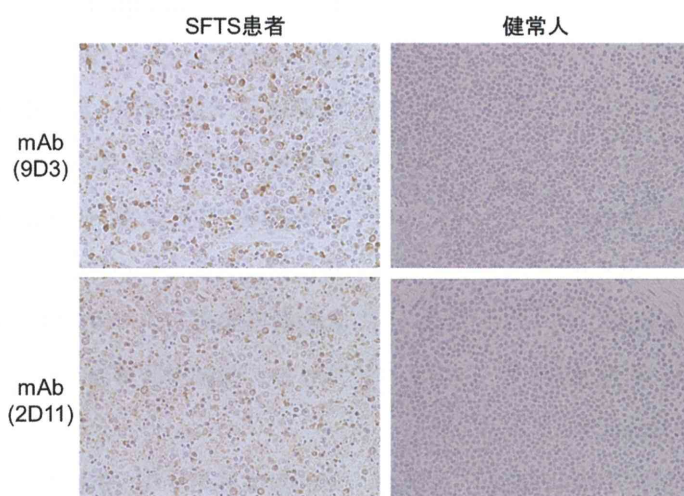


図 2. モノクローナル抗体を用いたリンパ節組織の免疫組織染色による SFTSV 抗原検出

表 1. Ag capture ELISA 法と qRT-PCR 法の比較 (SFTS 疑い患者の急性期血清, N=61)

Ag capture ELISA	qRT-PCR		(計)
	Virus RNA (copies/ml)		
	陽性(+)	陰性(-)	
	⁵ >10	⁵ <10	
陽性(+)	24	3	0 (27)
陰性(-)	0	10	24 (34)
(計)	(24)	(13)	(24) (61)

感度: 73% (27/37) 特異性 : 100% (24/24)

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]
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 の診断・治療・予防法に関する研究:

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)報告症例の臨床像と感染リスク因子の推定

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	山岸拓也	同 感染症疫学センター・主任研究官
	加藤博史	同 実地疫学専門家養成コース・医師
	大石和徳	同 感染症疫学センター・センター長

研究要旨：日本における重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS) の曝露状況 (感染源, 感染リスク), 臨床経過, 治療状況を明らかにすること, また, 死亡のリスク因子を調査することを目的として症例の詳細情報を収集した. 対象は, 2013 年 1 月 1 日以降に SFTS と診断され, 感染症発生動向調査 (National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease: NESID) に届出をされた患者とし, 臨床的・疫学的情報に関して NESID で不足している情報を調査票にて郵送回収した. 対象は 97 名で, うち 40 名から回答が得られ (回収率: 41%), 致命率は約 30%であった. 農業従事者 (特に田畑での活動), 自宅周囲環境が山林であることが罹患の高リスクであると推測され, 死亡のリスクとして加齢, 神経症状, 高度な血小板減少, 腎機能障害, AST 高値, 凝固障害が挙げられた. 死亡のリスクは中国からの報告と同様であったが, 罹患リスクは評価が十分ではなく, 中国でのリスクとは違う可能性があることから, 罹患リスクを評価する研究が望まれる. また, 国内報告例は重症例に偏っており, 軽症例の診断報告の推進が重要である.

A. 研究目的

2011 年に中国で, 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による重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS) が報告された. 日本においても, 2012 年に山口県で SFTS ウイルスが分離された以降, SFTS が国内で散発的に発生していることが明らかとなった. 散発例の情報から, 西日本に流行していること, 高齢者に患者が多いこと, 臨床的特徴として血球貪食症候群, 播種性血管内凝固症候群 (Disseminated intravascular coagulation: DIC), 多臓器不全が認められる等が判明してきた. 2014 年 12 月 10 日現在, 感染症発生動向調査 (National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease: NESID) にて 107 例の症例が報告されている. しかし, 届出は情報が乏し

く, 感染源, 臨床像, 転帰などの知見は限られている. そこで, 症例に関する詳細情報を収集し, SFTS の曝露状況 (感染源, 感染リスク), 臨床経過, 死亡のリスク因子, 治療状況を明らかにすることにした.

B. 研究方法

本研究は質問紙調査 1 回で情報を収集する横断研究である. 対象は 2013 年 1 月 1 日以降に SFTS と診断され, NESID へ届出られた患者とし, 質問紙を感染症発生動向調査に届出を行った医師に郵送し, 患者カルテ等からの情報収集を行ってもらい, 返送してもらった. 患者本人または家族などの代理人に, 本研究の目的と方法について説明をしていただき, 研究参加の同意を得た. 収集した情報は NESID で不足している感染前の行動の詳細, 臨床経過, 治療状況とし,