

図 2. アライグマとタヌキの年代別の陽性率の推移 (B 県)

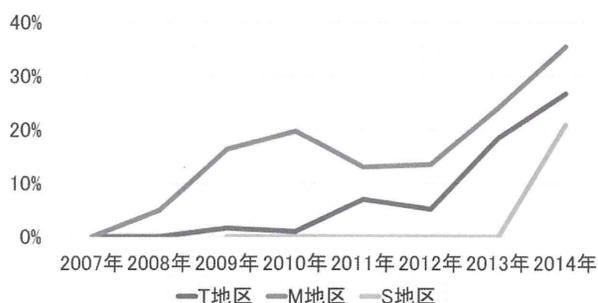


図 3. B 県アライグマの地区別の抗 SFTSV 抗体陽性率の推移

	2011-2014年	2008-2014年	SFTSV患者の発生地のイノシシ	
			ELISA	OD
県全域			W07035	-0.07
		ハクビシン アライグマ	W07061	0.02
			W07069	-0.01
検査頭数	60	168	W09011	-0.08
			W09014	1.44
陽性頭数	0	0	W09022	-0.04
			W09027	-0.02
陽性率	0%	0%	W09029	-0.02

図 4. C 県の野生動物の抗 SFTSV 抗体保有状況

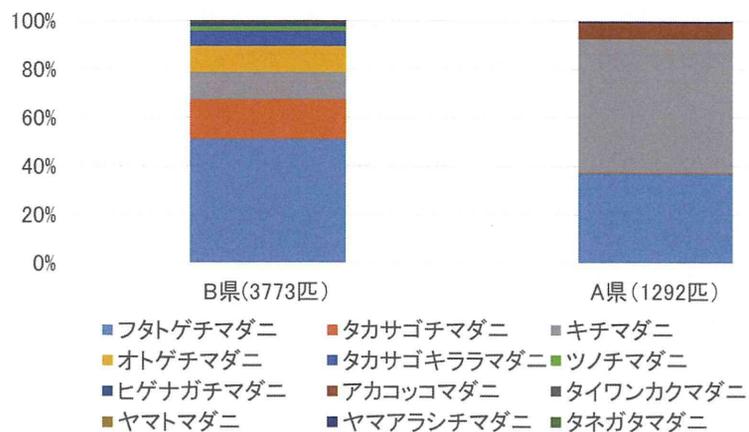


図 5. A 県と B 県で旗振り法により捕集されたマダニ種 (2014 年)

表 1. 全国調査で陽性率が高かった動物病院(A 県)に来院した飼育犬の抗 SFTSV 抗体陽性率と SFTSV 遺伝子検出率(2014 年)

	ELISA	PCR
検査頭数	136	136
陽性頭数	5	2
陽性率	3.7%	1.5%

表 2. SFTSV 遺伝子あるいは抗 SFTSV 抗体陽性犬の血液検査結果(2014 年)

犬 ID	56	63	89	93	94	98	117
採血日	5 月 9 日	5 月 12 日	5 月 27 日	5 月 30 日	5 月 30 日	5 月 31 日	6 月 14 日
GOT(U/l)	26	21	22	24	19	22	27
GPT(U/l)	36	39	52	42	60	36	44
ALP(U/l)	40	306	106	81	205	75	40
GGT(U/l)	16	6	3	17	5	10	9
LDH(U/l)	72	210	65	166	85	199	580
CPK(U/l)	54	104	51	51	40	62	181
CRP(mg/dl)	0	0.25	0	0	0.1	0	0
抗 SFTSV 抗体	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
SFTSV 遺伝子	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

表 3. B 県における野生動物の SFTSV 抗体保有状況

種	検査頭数	陽性頭数	陽性率
アライグマ	1666	164	9.8%
タヌキ	496	37	7.5%
イノシシ	89	2	2.2%
アナグマ	74	6	8.1%
イタチ	17	0	0.0%
サル	15	3	20.0%
ハクビシン	15	5	33.3%
テン	13	0	0.0%
シカ	9	1	11.1%
キツネ	2	0	0.0%
ネコ	1	0	0.0%
ノウサギ	1	0	0.0%

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)

日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明:国内外において採集した
ダニを対象とした SFTSV ゲノムの検出

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部・部長
研究協力者 澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究要旨:国内外の研究施設と連携して, SFTSV のダニにおける疫学調査を実施した. ザンビアで採集した 361 検体, 台湾で採集した 369 検体, 国内 12 道県で採集した 1352 検体のダニを対象として, real-time RT-PCR 法を用いて, SFTSV のゲノムを検索した. その結果, 国内で採集した 1352 検体のダニの内, 北海道で採集されたヤマトチマダニ(*Haemaphysalis japonica*)から抽出したRNAから陽性所見が得られた. 今後は, 陽性所見が得られたダニが寄生していた動物個体由来の血液, 臓器等の解析を実施することを試みる.

A. 研究目的

国内外の研究施設と連携して, SFTSV のダニにおける疫学調査を実施し, SFTSV の分布状況を把握する. 疫学調査により得られた SFTS の分布状況に関する知見を, 今後の SFTS 対策に活用することを目的とする. 尚, 本研究は, 研究協力者の澤洋文が主導して行われた.

B. 研究方法

1) ダニは旗ふり法, または動物に付着したものを回収した. 採集したダニの大部分は体表を 70%エタノールで洗浄した後に, 100 μ L の細胞用培地 MEM を添加して, 3,000 rpm, 30 sec の条件下でビーズを, 用いて破碎した.

2) 破碎した乳剤は 50 μ L をウイルス分離用として -80°C で保存し, 残りの 50 μ L から blackPREP Tick DNA/RNA kit (analytikjena cat. No.845-BP-5100050)を用いて, 核酸を抽出した.

3) 抽出した RNA を用いて, 国立感染症研究所から頂いたプロトコールに従って, real-time RT-PCR を実施し, SFTSV のゲノムの検出を試みた.

4) real-time RT-PCR において使用した試薬は RNA-directTM Realtime PCR Master Mix (TOYOBO)を用いた. Primer は下記の SFTSV-S2-237s (GCAACAAGATCGTCAAGGCATCAGG 50

pmol/μl), 及び Primer SFTSV-S2-400a (TGCTGCAGCACATGTCCAAGTGG 50 pmol/μl), を用いた. また probe は FAM/MGB-Probe SFTSV-S2-317MGB (CTGGTTGAGAGGGCA 10.3 pmol/μl)を使用した. Real-time RT-PCR は StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて実施した.

(倫理面からの配慮について)

特になし.

C. 研究結果

- 1) ザンビアで採集した 361 検体(図 1), 台湾で採集した 369 検体, 国内 12 道県で採集した 1352 検体(図 2)のダニから RNA を抽出して, real-time RT-PCR 法を用いて, SFTSV のゲノムを検索した.
- 2) ザンビアで採集した 361 検体, 及び台湾で採集した 369 検体のダニから抽出した RNA を用いた, SFTSV の Real-time RT-PCR では陽性所見は得られなかった.
- 3) 国内で採集した 1352 検体のダニの内, 北海道で採集したヤマトチマダニ (*Haemaphysalis japonica*) から抽出した RNA を用いた SFTSV の Real-time RT-PCR で陽性所見が得られた (図 2).

D. 考察

今後は, 北海道で採集された陽性所見が得られたダニが寄生していた動物個体由来の血液, 臓器等を用いて, SFTSV のゲノム等の検索を実施することを試みる.

E. 結論

国内で採集した 1352 検体のダニの内, 北海道で採集したヤマトチマダニ (*Haemaphysalis japonica*) から抽出した RNA から SFTSV の Real-time RT-PCR で陽性所見が得られた.

F. 健康危険情報

特になし.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

1. 特許取得

特になし.

2. 実用新案登録

特になし.

3. その他

特になし.

研究協力者

1. 瀬戸順次 (山形県衛生研究所 微生物部)
2. 門馬直太, 千葉一樹 (福島県衛生研究所 微生物課)
3. 山本正悟 (宮崎大学医学部)
4. 西條政幸, 長谷川秀樹, 鈴木忠 (国立感染症研究所)
5. 有川二郎 (北海道大学大学院医学研究科)

6. 海老原秀喜(米国国立衛生研究所 国立アレルギー・感染症研究所)
7. 中尾亮, 梶原将大, 邱永晋, 森垂紀奈, 直亨則, 高田礼人, 村松美笑子, 加藤里美, 五十嵐学, 山内聡子, 小林進太郎, 佐々木道仁, 大場靖子(北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター)
8. 徐慶霖とその講座のスタッフ(国立中興大學 獣醫教學醫院)
9. Bernard Hang'ombe 先生 (ザンビア大学 獣医学部)
- 以上, 順不同, 敬称略

Zambiaにおけるダニのサーベイランス

ザンビアダニ検体			
Ticks	number	pool	RT-PCR positive
Adult	1	1	0/1
Nymph	60	3	0/3
Larva	300	3	0/3
total number	361	7	0/7

Rhipicephalus spp.



図 1. ザンビアで採集したダニの real-time RT-PCR の結果

国内におけるダニのサーベイランス

国内		
都道府県	検体数	RT-PCR positive
北海道	735	1/735
福島	231	0/231
山形	154	0/154
栃木	9	0/9
長野	21	0/21
静岡	5	0/5
和歌山	13	0/13
奈良	39	0/39
広島	28	0/28
宮崎	99	0/99
鹿児島	8	0/8
沖縄	10	0/10
合計	1352	1/1352

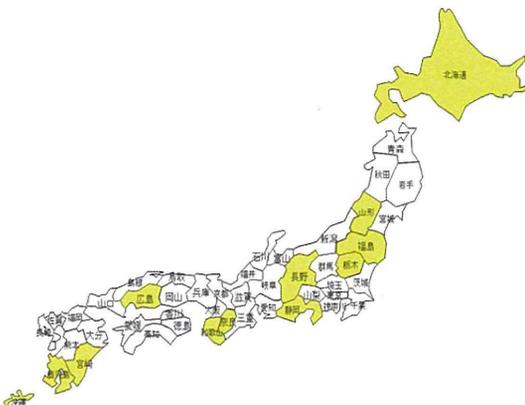


図 2: 日本で採集したダニの real-time RT-PCR の結果

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 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

研究分担者	森田公一	長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野・教授
研究協力者	泉川公一	長崎大学医歯薬学総合研究科・教授
研究協力者	吾郷昌信	長崎大学熱帯学研究所ウイルス学分野
研究協力者	吉川亮	長崎環境保健研究センター
研究協力者	堀尾政博	長崎大学熱帯医学研究所ミュージアム
研究協力者	奥村順子	長崎大学熱帯医学研究所共同研究室
研究協力者	早坂大輔	長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野・助教

研究要旨：本分担研究では、平成 25 年度に引き続き、SFTS 流行地域における、ヒト、動物、ダニでの SFTS ウイルスの流行状況を明らかにして感染リスクを評価すること、また調査のためのツールとしての抗体検出系の開発、加えて流行地域における SFTS ならびにその他感染症に関するリスクコミュニケーションのあり方を検討し、予防対策上より有効な情報発信体制を構築することを目的として研究を実施した。本年度は、1) 昨年度開発した安価な抗体検出系を中国の SFTS 患者血清を用いて評価し、2) 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での非特異反応の対策、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実施した。SFTS ウイルスの N タンパク質を大腸菌で発現させた診断抗原は安価で大量生産に適しており、開発した診断系は中国の患者血清でも高い感度特異を示した。また 2 年度の調査でも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 例も発見できていない。動物の血清疫学調査で問題となる非特異的反応について抗原のクロマト精製によりほとんど解決されることが分かったが、それでもなお稀に非特異反応を示すものがあった。これについては類似ウイルス存在も視野にいたれた検討が必要である。またダニの調査では今年も、ウイルスは分離できておらずダニのウイルス保有率は極めて低いと思われる。一般市民の意識調査では、SFTS 及びその他のダニ媒介性疾患の危険性に関する認識の低い者が少なからず存在し、目下の住民啓発方法では不十分であることが示唆された。患者の早期発見と早期治療を促す上で、テレビ・新聞・インターネットを活用したより有効な注意喚起・住民啓発を検討する必要がある。

A. 研究目的

SFTS 流行地域である長崎県においてヒト、動物、ダニにおけるSFTSウイルスの流行状況を明らかにして感染リスクを評価すること、また調査のためのツールとしての抗体検出系等の開発、加えて流行地域におけるSFTSならびにその他感染症に関するリスクコミュニケーションのあり方を検討し、予防対策上より有効な情報発信体制を構築することを目的として研究を実施した。

B. 研究方法

1) 診断系の開発

SFTS ウイルスの N 蛋白遺伝子を大腸菌発現ベクターpQE30 のクローニングサイトに挿入して His-tag を付加した状態で大腸菌に発現させニッケルカラムにて精製した蛋白を BALB/マウスに免疫し、ミエローマ細胞 SP2/0 を用いてN蛋白に対する単クローン抗体を作成し IgM 捕捉 ELISA 法を作成した。この手法の感度と特性を検討するため、中国河南省CDC の協力を得て、同施設が保有するパネル血清を用いて評価を実施した。またプレート上で単クローン抗体を用いて発現蛋白を捕捉して実施する間接 IgG-ELISA 法を検討した。

2) ヒトにおける血清疫学調査

研究の対象者は、おもに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用いる。調査内容について、対象

者の年齢、性別、生活歴、ダニ咬傷歴、おもに活動する野山の場所、居住地、SFTS 様の症状の既往の有無、基礎疾患、SFTS 抗体保有の有無を調査する。

3) 動物における血清疫学調査

SFTSV および RVFV の N タンパク質は、N-末端に His-tag を有する融合タンパク質として大腸菌に発現させ超音波処理により破碎し、その遠心上清を菌体 lysate とした。これをMCカラムにかけた後、150 mM イミダゾールで溶出されてくる画分を分取して N タンパク質粗画分とし、さらにゲル濾過カラムクロマトグラフィー及び陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、ELISA 検査を実施して従来抗原と比較した。

4) ダニ調査

2014 年 8 月に長崎県で発生した SFTS 患者の居住地周辺において、フタトゲチマダニ(若虫 4 匹、幼虫 105 匹)を採集した。また、長崎県内で捕獲されたイノシシに付着していたタカサゴキラマダニ、ヤマアラシチマダニ、タカサゴチマダニ、フタトゲチマダニを採集した。これらのマダニについて 1-20 匹をプールにして、ビーズ式細胞破碎装置を用いてホモゲナイズしたマダニ乳剤を A129 マウスおよび VeroE6 に接種しウイルス分離を試みた。また、マダニ乳剤から RNA を抽出し、Real-time RT-PCR 反応により遺伝子検出を行った。

5) 地域住民の意識調査

本研究は、インターネット上で実施する

質問票による横断調査型研究である。研究者は質問票の作成の後、プレテストを実施し、必要な修正を加え、楽天リサーチ株式会社の登録者を対象としてインターネット上で調査を実施した。調査会社に対して、長崎県、山口県、徳島県、東京都、北海道に居住の20～79歳の男女を対象とするよう依頼した。調査期間は平成26年8月6日から8日の間の3日間とした。居住地域は郵便番号によるものとし、回答者の氏名・住所などの個人情報が特定可能な情報は収集していない。主な質問内容は：1) ダニ媒介性疾患について、2) SFTSについて(予防を含む)、3) 治療希求行動等である。

(倫理面からの配慮について)

本件研究におけるヒトサンプルの採取については長崎大学病院倫理委員会の承認を得て、適切なインフォームドコンセントを得て実施した。また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については、長崎大学熱帯医学研究所倫理審査委員会において「疫学研究に関する倫理指針」に則り、承認を受けた後、実施した。

C. 研究結果

1) 診断系の開発

大腸菌発現 SFTS-N タンパク抗原の回収率は1リットル培養で10mgの収率であった。合計32のハイブリドーマを得た。N蛋白との反応性をウエスタンプロット法、間接蛍光法で確認した。この単クローン

抗体を用いて作成したIgM補足ELISA法の評価を河南省CDCのパネル血清で評価した(表1)。

SFTS回復期患者85名、陰性コントロール30名の血清でIgM補足ELISAでは陽性85、陰性30であり、感度100%、特異度100%、一致率100%であり、我々のIgM補足ELISA法の有用性が確認できた。

さらにプレート上に単クローン抗体をコートし発現抗体を捕捉させ、その後、ヒト血清、抗ヒトIgG標識血清を反応させる抗原捕捉間接IgG-ELISAについての結果を(表2)に示す。これも感度、特異度、一致率、全て100%となった。

2) ヒトにおける血清疫学調査

SFTS患者の発症した地域における被験者282人(男性254人、女性28人)、平均年齢57.5歳(8-86歳)の対象者について調査した。282人中161人(57.1%)の対象者に明らかなダニの咬傷歴があり、うち、86人(30.5%)では2回以上の咬傷歴を認めた。抗体保有率は0%であった。コントロール群については、リスク保有群で保有率が0%であったことをうけて、行わない方針とする。

3) 動物における血清疫学調査

前年度の野生動物血清の調査では診断抗原に対して非特異反応を示したサンプルについて、新たな精製法を検討した。

リガンドにNi²⁺とCo²⁺を用いた場合には明らかに後者の方が明らかにレジンへの非特異吸着が少なく、溶出したNタンパク

質画分への夾雑タンパクの混入も少ないことが解った。したがって、精製法の検討には Co^{2+} MCAC で簡易精製した両ウイルスの組換え N タンパク質を出発材料とした。 Co^{2+} MCAC で簡易精製した両ウイルスの組換え N タンパク質は先ずゲル濾過カラムクロマトグラフィーにかけて所定分子サイズの画分を分取した(図 1A)。さらに、分取した画分について陽イオン交換カラムクロマトグラフィーをおこなったところ、両ウイルスの N タンパク質は約 0.3 M 付近の塩濃度(NaCl)で単一ピークとして溶出された(図 1B)。この画分を分取し、N タンパク質の最終精製標品としてイノシシ血清との反応性を検討した。

上述の方法で精製した両ウイルスの N タンパク質に対するイノシシ血清の反応性を Co^{2+} MCAC のみで簡易精製した標品と ELISA 法により比較した。被検血清には長崎市内で捕獲されたイノシシより採取した血清、46 検体を 100 倍希釈して使用した。その結果を表 1 に示す。陽イオンカラムクロマトグラフィーにより最終精製した N タンパク質を抗原とした場合、MCAC のみと比較して明らかに非特異反応が減弱し、RVFV に対する吸光値は 46 検体中 37 検体が 0.1 未満を示した。残る 9 検体のうち 8 検体は 0.1-0.4 の値を示したものの、MC のみの値と比較して明らかな減少が認められた。しかしながら、N21-26 のように非特異反応が殆ど減少しない検体が存在した。

4) ダニ調査

研究結果 SFTSV およびフレボウイルス遺伝子検出を試みたが、すべて陰性であった。Vero E6 細胞に接種後回収した上清中からのウイルス分離は確認されなかった。

5) 地域住民の意識調査

合計 1500 名の有効回答を得、長崎県、山口県、徳島県、東京都、北海道の回答者数はそれぞれ 300 名であった。回答者の平均年齢は、49.1 歳(±14.0 SD)で男女の比率は 3 対 2 であった。また、医師・看護師などの医療従事者は、全体の 3% であり地域間で差はなかった。

ウイルス、リケッチアの別を問わず「ダニ媒介性疾患」について知っているとした回答者は、長崎、山口、徳島の三県では 75% 以上であったのに対し、東京都と北海道では 70% 程度であった ($p < 0.01$)。SFTS について聞いたことがある者の割合は山口および徳島の両県が 21% 以上であったのに対し、その他の地域では 11% ~ 13% と低かった ($p < 0.001$)。両疾患に関する主たる情報源は、テレビ、新聞、インターネットであったが、山口と徳島の両県においてテレビと新聞と回答した者の割合が高かった。

地域間で有意差は認められなかったものの、蚊による吸血や飛沫感染を感染ルートとして上げた回答者が見られた。予防手段として、野原や山でダニによる吸血を阻止するとした者は、全体の 89% であったが、家ダニの駆除をあげた者も全体の 29% に見られた。ダニによる吸血経験

を有する者は、長崎県と徳島県でそれぞれ 49%と 47%であったが、北海道では 32%と地域間で差が認められた ($p < 0.001$)。ダニによる吸血の後発熱した際の対処方法については、「SFTSについて聞いたことがある ($n = 242$)」と回答した群ではその 92%が病院に行くかと回答したが、「聞いたことがない $n = 1258$ 」群では、75%と低かった ($p < 0.001$)。

D. 考察

前年度に開発した SFTS ウイルス N タンパク質の大腸菌発現蛋白は 1 リットル培養で 2000 枚の ELISA 検査に利用できる量の発現がみられ、安価な血清診断用抗原であることが示された。今回樹立した、単クローン抗体により IgM 補足 ELSIA 法が確立され高感度、高特異度の血清診断系が確立できた。中国患者血清を用いた検討によりこの方法は日本型、中国型いずれの SFTS ウイルスに感染した患者でも利用可能であることがわかった。抗原捕捉間接 IgG-ELISA 法が確立でき、今後、これまで非特異反応の高かった動物血清での検査において評価しその有用性を検討する必要がある。

SFTS ウイルスに対する抗体保有率は、現在の対象者においては 0%であり、不顕性感染の病歴を有する対象者は少ないと思われる。

長崎県全体ではフタトゲチマダニが最も多く採集されたが、マダニ種の割合は地区によって異なっていた。これまでにマダニか

ら SFTSV は検出されず SFTS 患者の居住周辺地域で採集したマダニからも SFTSV 検出は確認されなかった。マダニでの SFTSV 陽性率が低い、またはマダニ中の SFTSV 量が少ないことが考えられた。今後はマダニ採集地区をひろげ、検出に用いるマダニ数を増やしてさらに調査を進める。

動物における血清検査でみられた非特異反応を減弱させるため、抗原の精製法の改良を検討した。Co²⁺MCAC 簡易精製に加えてゲル濾過カラムクロマトグラフィーおよび陽イオン交換カラムクロマトグラフィーによって高度に精製した N タンパク質を抗原として用いると、多くの非特異反応は減弱した。しかし少数のサンプルで、N21-26 のように RVFV N タンパク質とも同程度の反応性を示す、即ち非特異反応が殆ど減少しないイノシシ個体が存在したことから、その要因についてさらに検討する必要があるものとする。イノシシの中にどの程度の割合でこのような非特異反応性の高い個体が存在するかについても調査する必要があるものと思われる。これについては類似ウイルス存在も視野にいった検討が必要である。

認知度における地域差 については(図 2.参照)、調査地域の特徴として、1) 長崎、山口、徳島の三県では、これまでに SFTS 患者が報告されているが、東京都及び北海道では SFTS 患者の報告例がないこと。2) 山口県では、国内初の SFTS 患者が、徳島県では、日本紅斑熱が初めて報告されたことがあげられる。山口・徳島の両県

で SFTS について聞いたことがある者の割合が高かった背景には、各種メディアによる活発な報道および地元自治体における住民啓発活動等があり、これらが SFTS を含むダニ媒介性疾患に対する住民意識に何等かの影響を及ぼしていると考えられる。

認知度と治療希求行動(図 2. 参照)については、ダニによる吸血後発熱した際の対処方法で、「病院に行く」と回答した者の内、「SFTS について耳にしたことがある者」が有意に多く、「SFTS について聞いたことがない者」では、何もせずに我慢する者や薬局に解熱剤を購入しセルフメディケーションを行うという回答が有意に多かった。SFTS 及びその他のダニ媒介性疾患の危険性に関する認識の低い者が少なからず存在し、患者の早期発見と早期治療を促す上で、テレビ・新聞・インターネットを活用したより有効な注意喚起・住民啓発の必要性が示唆された。

E. 結論

SFTS の大腸菌発現 N タンパク質と単クローン抗体を樹立してより感度、特異度高い、SFTS 血清診断用 ELISA 法を樹立した。また、この手法は日本株、中国株のいずれの SFTS に暴露された患者血清も十分に診断することが可能であった。

野生動物の血清検査に用いる抗原精製において各種カラムクロマトグラフィーにより高度に精製した N タンパク質を抗原として用いたにもかかわらず、依然非特異反応

性の高い個体が少数存在したことから、その要因について、さらに検討する必要があるものと思われる。しばらくは動物検体の血清調査においては、ELISA 法を一次スクリーニング、確定試験をウイルス中和法で実施するのがよいと判断される。

長崎県内でのヒトでの血清疫学調査では患者周辺のハイリスクと思われるグループの不顕性感染は確認されていない。

今回実施した聞き取り調査では、回答者 1500 名中 632 名 (42%) がダニに咬まれたことがあるにも関わらず、その三分之一が特に何もしなかったと答えており、SFTS の感染流行が危惧される事態が起こった際には、目下の住民啓発方法では不十分であると考えられる。テレビ・新聞・インターネットを活用した注意喚起と住民啓発が必要である。

F. 健康危険情報

SFTS 及びその他のダニ媒介性疾患の危険性に関する認識の低い者が少なからず存在し、より有効な注意喚起・住民啓発の必要性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 泉川公一, 宮村拓人, 原信太郎, 住吉誠, 高園貴弘, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 河野茂, 早坂大輔, 余福勲, 森田公一: リケツチア感染症と臨床的鑑別が困難であった軽症の重症熱性血小板減少症候群の 1 例. IASR Vol. 35 p.

2. 学会発表

- 1) 早坂大輔: SFTS ウイルスについてこれまでわかったこと: 第 22 回 Seminar on Acari-Disease Interface, 太宰府 (2014, 7)
- 2) 黒崎陽平, 中前小百合, 早坂大輔, 安田二郎: 新規ナイロウイルス遺伝子検出法の開発: 第 51 回ウイルス学会九州支部総会, 鹿児島 (2014, 9)
- 3) 早坂大輔, 嶋田聡, Guillermo Posadas Herrera, 森田公一: 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス感染マウスモデルを用いた抗血清および薬剤効果の検討: 第 51 回ウイルス学会九州支部総会, 鹿児島 (2014, 9)
- 4) 早坂大輔, 嶋田聡, 青木康太郎, 森田公一: 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス遺伝子検出法の確立と長崎県における媒介マダニ調査: 第

157 回日本獣医学会学術集会, 札幌 (2014,9)

- 5) 早坂大輔, 余福勲, 吉川亮, 嶋田聡, Guillermo Posadas Herrera, 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)
- 6) 泉川公一. 免疫不全患者の感染症とその対策. 第 21 回日本臨床微生物学会教育セミナー, 長崎, (2014. 8)
- 7) 泉川公一. グローバル化する感染症の現状と対策. 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 84 回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会共同開催, 岡山, (2014. 10)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

<図表>

表 1. IgM 補足 ELISA 法のパネル血清での評価

TABLE 1. Sensitivity and specificity of IgM capture ELISA with reference to a total antibody sandwich ELISA.

Sandwich ELISA	IgM capture ELISA		Total
	Positive	Negative	
Positive	85	0	85
Negative	0	30	30
Total	85	30	115

Concordance^a: 100% Sensitivity^b: 100% Specificity^c: 100%

^a(No. of samples positive by both methods + No. of samples negative by both methods)/total number of samples x 100.

^bTrue positive/(true positive + false negative) x 100.

^cTrue negative/(true negative + false positive) x 100

表 2. 単クローン抗体による補足抗原による間接 IgG-ELISA のパネル血清を用いた評価

TABLE 2. Sensitivity and specificity of capture antibody indirect IgG ELISA with reference to a total antibody sandwich ELISA.

Sandwich ELISA	capture antibody indirect IgG ELISA		Total
	Positive	Negative	
Positive	85	0	85
Negative	0	30	30
Total	85	30	115

Concordance^a: 100% Sensitivity^b: 100% Specificity^c: 100%

^a(No. of samples positive by both methods + No. of samples negative by both methods)/total number of samples x 100.

^bTrue positive/(true positive + false negative) x 100.

^cTrue negative/(true negative + false positive) x 100

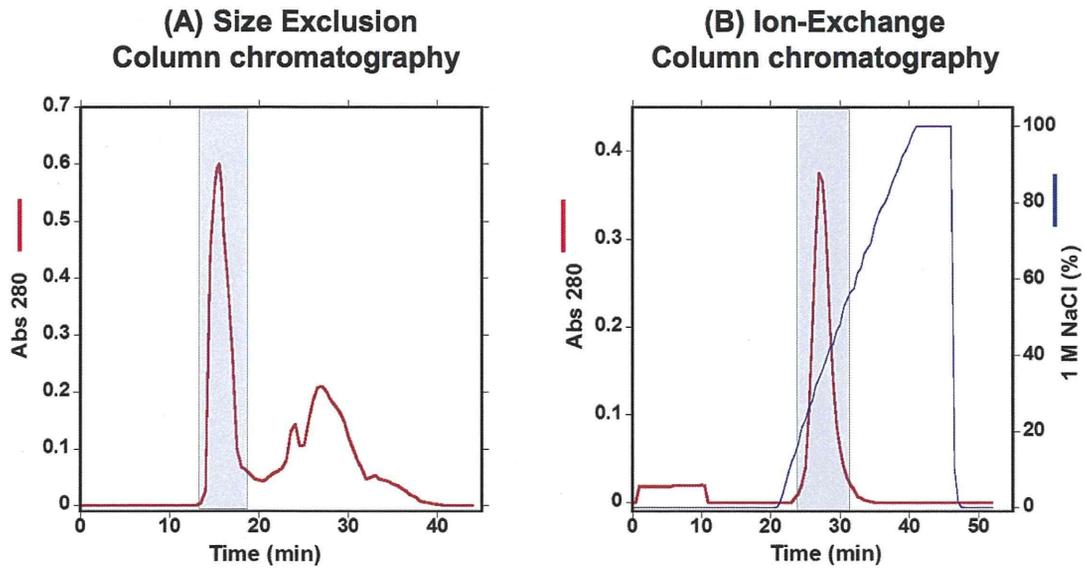


図 1. カラムクロマトグラフィーによる SFTSV N タンパク質の精製

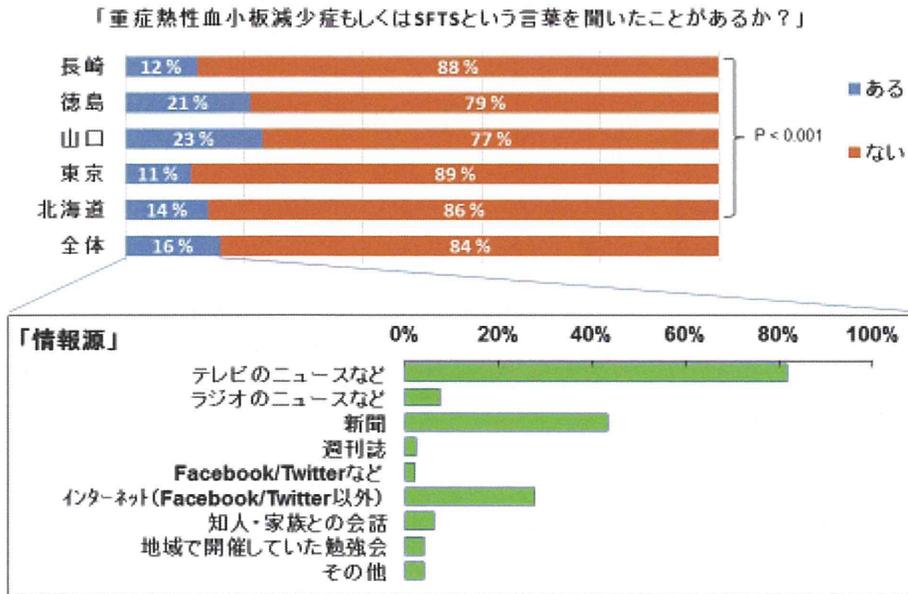


図 2 地域別 SFTS 認知度と情報源

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 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
研究協力者	谷 英樹	国立感染症研究所ウイルス第1部
	福士 秀悦	国立感染症研究所ウイルス第1部
	下島 昌幸	国立感染症研究所ウイルス第1部
	安田 二郎	長崎大学熱帯医学研究所
	西園 晃	大分大学医学部
	山田 健太郎	大分大学医学部
	吉松 組子	北海道大学医学研究科

研究要旨

本研究では SFTS ウイルス(SFTSV)の感染機構・増殖機構・病原性の解明を目的として以下の研究を実施した。リバビリン、インターフェロン- α 、S1P/SKI-1 阻害剤の抗 SFTSV 効果を複数のヒト由来培養細胞を用いて解析した。その結果、3 剤とも SFTSV の増殖を抑制することがわかった。更に、S1P/SKI-1 活性欠損細胞株を用いて、SFTSV 増殖における S1P/SKI-1 の関与を示した。一方、マウス個体レベルではリバビリン投与は SFTSV の増殖に影響を与えなかった。SFTSV 感染マクロファージ細胞系細胞株を用いて、感染による貪食能の亢進および抗体依存性感染増強(ADE)の解析を行った。貪食能亢進は認められなかったものの ADE は確認され、SFTS の病態形成に関与している可能性が考えられた。SFTSV のエンベロープ糖蛋白(GP)は中和のターゲットとなる重要なウイルス蛋白であり、吸着・侵入に関わる多くの機能を持つ。本研究では GP によって誘導される細胞侵入に関わる現象として、感染細胞の pH 依存性細胞融合の解析を進めた。細胞融合は 25-hydroxycholesterol (25-HC)によって阻害され、ウイルスと細胞膜との融合に作用して阻害効果を示しているものと考えられた。また、この細胞融合能を指標とした簡易ウイルス定量法の確立を試みた。さらに SFTS ウイルスの感染機構、膜融合、中和の解析を目的として、GP を外套したシュードタイプウイルスを用いた解析および GP に対するマウスモノクローナル抗体を作製することを試みた。

A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) に対する有効なワクチン・治療薬はなく、現時点で治療法は確立されていない。そこで、現在既に他のウイルス感染症に対して臨床で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/SKI-1 の SFTS ウイルス (SFTSV) 複製に与える影響を検討し、抗 SFTSV 薬としての有用性を細胞レベルおよび個体レベルで検討した。

SFTS の病態について、骨髄におけるマクロファージによる赤血球貪食像 (赤血球貪食症候群)、血液凝固系の異常 (播種性血管内凝固症候群)、重症化した場合の高い致死性 (致死率 10~30%) に着目し、*in vitro* でその機序解明を試みた。血液凝固系異常については、エボラ出血熱ではウイルスに感染したマクロファージが血液凝固系活性化の引き金となる Tissue Factor (TF) を過剰に発現することが報告されており、デング出血熱やエボラ出血熱における高い致死性については抗体依存性感染増強 (Antibody dependent enhancement, ADE) の関与が考えられている。そこでマウス腹腔マクロファージ由来細胞株 Raw264.7 細胞を用いて、SFTSV 感染 Raw264.7 細胞の貪食能、TF の発現、および抗 GP 血清による ADE について検討を行った。

SFTSV の感染機構および膜融合の解析を目的として、SFTSV 各株および SFTSV の GP を外套したシュードタイプウイルス (SFTSVpv)、ウイルス感染細胞を用いて、各種解析を行った。また、膜融合による細胞融合を指標とする簡便なウイルス定量法の確立を試みた。さらに GP の機能解析を目的として、GP に対する単クローン

抗体の作成を試みた

B. 研究方法

1) 薬剤の細胞レベルでの抗ウイルス効果

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) $\text{moi}=0.1$ 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- α (1×10^3 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。また、S1P/SKI-1 活性欠損細胞株 (SRD12B) においては親株 CHO-K1 細胞株とそれぞれに $\text{moi}=0.1$ で感染させた。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 N 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、SFTSV 力価とした。

2) リバビリンの細胞レベルでの抗ウイルス効果

C3H マウスに、 5×10^5 FFU 量の SFTSV を皮内接種し、感染 1 時間後から毎日、100mg/kg のリバビリンを腹腔内投与し、血小板および白血球数の変化と、脾臓におけるウイルス増殖を、PBS を投与したコントロール群と比較した。

3) SFTSV 感染 Raw264.7 細胞の貪食能の検討

SFTSV-YG1 株を、培養液(10%ウシ胎児血清添加 RPMI1640 培地)に浮遊させた Raw264.7 細胞と混合し、96 穴プレート中で一晚培養した。続いて、FITC 標識ウサギ IgG 抗体結合ラテックスビーズ (Phagocytosis Assay kit, IgG FITC; Cayman Chemical 社)を培養液中に滴下し、さらに一定時間(1~6 時間)の培養を行った。細胞に取り込まれなかった FITC 標識ビーズについてはトリパンプルー処理により quenching を行い、その後、4%パラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定し、0.2% Triton X-100 による透過処理後、抗 NP マウス血清および AlexaFluor568 標識抗マウス IgG 抗体(Life Technologies 社)による間接蛍光抗体法により、ウイルス感染の確認を行った。

4) SFTSV 感染 Raw264.7 細胞における凝固因子 TF 発現の検討

24 穴プレートで培養した Raw264.7 細胞に YG1 株を接種した。2 日間培養後に細胞を回収し、ウェスタンブロット解析に供試した。TF の検出にはウサギポリクローナル抗体 (bs-4690R, Bios 社)を使用した。

5) 抗 GP マウス血清による SFTSV の Raw264.7 細胞における ADE の検討

DNA 免疫法により作製した GP (Gn, Gc もしくは Gn/Gc) に対するマウス抗血清 (H25 年度本報告書) を用いた。また、陰性コントロールとして同様に DNA 免疫法により作製した抗 NP マウス血清を使用した。いずれの抗 GP 血清は Vero 細胞を用いた中和試験

(50% focus reduction) で 1:160~ \geq 1:320 の抗体価を示し、抗 NP 血清の中和抗体価は 1:10 であった。ADE の検証は次のように行った。培養液で希釈した YG1 株と培養液で段階希釈した各抗血清を等量で混合し、37°C で 1 時間の中和反応を行った。その後、混合液を 96 穴プレートに培養した Raw264.7 細胞に添加し、3 日間培養した。培養後、細胞をパラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定し、0.2% Triton X-100 による透過処理後、抗マウス IgG ヤギ血清 (Mouse-to-Mouse, ScyTek 社) によるブロッキング処理を行った。その後、抗 NP マウス血清および AlexaFluor488 標識抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies 社) による間接蛍光抗体法により、感染細胞の検出を行った。一方で、ウェスタンブロット解析用にも細胞ライセートを作製し、NP 蛋白質、 β -actin およびマウス IgG 抗体の検出も行った。

6) SFTSV (中国株および日本株) を感染させた細胞での GP の細胞内局在

SFTSV (中国株および日本株) を感染させた細胞での GP の細胞内局在を、複数の抗 GP 抗体を用いて間接蛍光抗体法にて確認した。局在の確認後、感染細胞を低 pH バッファーを用いて細胞融合による巨細胞 (シンシチウム) 形成の有無を確認した。また、シンシチウム形成までの時間およびウイルス株間での違いについても検証した。次に、この細胞融合を阻害する候補分子として近年複数のウイルス種において報告されている 25-hydroxycholesterol (25-HC) の抗 SFTSV 活性について評価した。

- 7) 96 穴プレートで培養した Vero 細胞に 10 倍階段希釈した SFTSV を感染させ、上記と同様に細胞融合を起こさせた後、メタノールで固定し、その後メイギムザ染色液を加えた。水洗することによってはがれた細胞は洗い流された。残った細胞は細胞融合の有無を判定し、さらに抗 NP ウサギ血清用いたを蛍光抗体法によって抗原の有無を確認した。これらの解析はすべて 6 穴ずつ実施した。解析結果をもとに細胞融合の有無およびウイルス抗原の有無を指標とした 50%感染価を算出した。
- 8) SFTSV YG1 株の GP のアミノ酸情報をもとに6つの部位を選び、大腸菌ベクターで発現させて抗原とした。6つの部位をコードする cDNA を PCR で増幅し、pET43.1 ベクターに組み込んだ。このプラスミドを大腸菌株 BL-21 に導入し、組換えタンパクの産生を誘導した後、大腸菌を破碎した。得られた分画から6ヒスチジンタグを用いて組換えタンパクを精製した。これらの抗原を titer max アジュバントと混合しマウスに免疫した。また、対照としてマウスに SFTS ウイルスを感染させ、抗血清と免疫細胞を得て常法にしたがって単クローン抗体の作成を試みた。

(倫理面からの配慮について)

マウス抗血清作製は大分大学動物実験委員会の承認(承認番号P01001)および北海道大学動物実験委員会の承認(承認番号14-0123)を得て行われた。

C. 研究成果

- 1) 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。
- 2) 単独投与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 \sim 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。
- 3) SRD12B 細胞からの感染性 SFTSV の産生量は CHO-K1 細胞に比べ 10%以下であった。マウス個体レベルでは、コントロール群とリバビリン投与群で血小板および白血球減少に差は認められず、また、ウイルス増殖にも差は認められなかった。
- 4) SFTSV の Raw264.7 細胞への感染性。図 2 に示すように SFTSV-YG1 株は、Raw264.7 細胞に感染性を示し、その感染効率は、高感受性である Huh-7 細胞や Vero 細胞と比べて約 1/10 であった。また、感染 3 日目においても感染細胞の拡がりは確認されなかった。
- 5) SFTSV 感染 Raw264.7 細胞の貪食能。YG1 株感染・非感染 Raw264.7 細胞においてビーズの効率的な蛍光標識ビーズの取り込みが認められたが、両者の間で顕著な差は認められなかった。
- 6) SFTSV 感染 Raw264.7 細胞における凝固因

子 TF の発現: ウェスタンブロット解析により YG1 株感染・非感染 Raw264.7 細胞において共に TF の発現は確認されたが、感染による発現の亢進は認められなかった。

- 7) 抗 GP マウス血清による SFTSV の Raw264.7 細胞における ADE 現象: 抗 NP 血清では認められなかったが、いずれの抗 GP 血清において ADE 現象が認められた(図 3)。すなわち、図 3A においてはマウス血清非添加や抗 NP 血清の場合に比べて、抗 GP 血清の場合では感染細胞数の増加が確認され、図 3B においては、ウイルス NP 蛋白質のシグナル増加が確認された。抗 Gn 血清については、低希釈ではウイルス感染抑制が認められ、高希釈では感染増強が認められたが、抗 Gc 血清および抗 Gn/Gc 血清については低希釈でも感染増強が認められた。
- 8) SFTSV の GP は、感染 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ているものと考えられた(図 4)。この感染細胞を低 pH バッファーに2分間曝露させた後、培養を続けると pH6.0 のバッファーで処理した細胞ではシンシチウムの形成が認められ、pH5.0 のバッファーで処理した場合、ほぼ全ての細胞が融合した(図 5)。このシンシチウムの形成は、pH5.0 のバッファーで処理した場合は、処理後 1 時間で既に細胞融合が認められ、非常に早く融合を起こすことが明らかとなった。また、中国株および複数の日本株で株間の違いも検討したが、株間による程度の差は認められなかった。次に、25-HC の存在下での SFTSV の増殖を検討したところ、濃度依存

的に SFTSV の増殖が阻害されることが認められた(図 6)。また、25-HC 処理細胞においては、シュードタイプウイルスの感染も阻害された(図 7)。更に、感染細胞を 25-HC で処理すると、その後、低 pH のバッファーで処理してもシンシチウムの形成が認められなかった(図 8)。

- 9) 低 pH 依存性細胞融合として認められる CPE に基づいたウイルス定量法は、非常に簡便で多検体の中和試験等に有効であると考えられた。しかしながらウイルス抗原を指標とした場合の感染価に比べ約 100 倍低く算出された(図 9)。
- 10) GP の短縮抗原六種類を大腸菌ベクターにより発現させ、一部をマウスに免疫した(図 10)。さらに YG1 株をマウスに免疫した。その結果、SFTSV 感染 VeroE6 細胞を抗原とする蛍光抗体法において抗体の産生が確認された。

D. 考察

リバビリン、インターフェロン- α 、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、相加的效果が観察された(図 1)。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- α は既に C 型肝炎治療などで臨床現場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。S1P/SKI-1 活性欠損細胞においても SFTSV は増殖することから、S1P/SKI-1 による SFTSV 増殖への関与は間接的であることが示唆された。

マウス個体レベルにおいては、コントロール群とリバビリン投与群では、同程度の血小板および白血球減少が認められ、また、ウイルス増殖にも差は認められなかったことから、個体レベルにおいては、今回用いた系ではリバビリンの抗ウイルス効果は認められなかった。今後、SFTSV のチャレンジ量やリバビリン投与量を検討する予定である。

今回、SFTSV 感染 Raw264.7 細胞において、貪食能の亢進および TF 発現の亢進を認めなかったが、これらについて結論を得るには実際のマクロファージを用いて検討する必要があると考えられた。

一方、Vero 細胞では中和活性を示す抗 GP マウス血清が Raw264.7 細胞においては ADE 活性を有することが確認された。しかし、鈴木らより、SFTS 患者の病理学的解析ではマクロファージにはウイルス抗原はほとんど認められず、主として B 細胞 (post-GC B cell) に認められるとの報告があった。したがって、Fc 受容体を介した ADE の可能性よりむしろ、B 細胞はその表面に膜貫通型の抗体分子 (B 細胞受容体) を発現していることから、SFTSV 感染により誘導された GP 特異的 B 細胞に B 細胞受容体を介して SFTSV が感染する可能性、およびそのことが

SFTS の病態形成・重症化に関与している可能性が考えられた。今後、SFTSV の抗体依存性感染について抗 GP モノクローナル抗体、Fc 受容体発現低感受性細胞、および GP 特異的 B 細胞受容体発現低感受性細胞等を用いて検討することを計画している。

SFTSV の GP は、感染細胞において細胞表面に局在は確認できないものの、低 pH バッファーで処理すると細胞表面に局在する他のウイルス種と同じように速やかに細胞融合することが認められた。これは、低 pH 環境下で GP の局在が変化するのか、検出できない量の GP が細胞表面に存在していて、これで細胞融合が起きているのかなど、今後検討する必要があると思われる。25-HC によるウイルスの増殖阻害は、シュードタイプウイルスでも阻害されることから、細胞侵入の際にも影響していると考えられ、また細胞融合も阻害されることを考えると、ウイルス膜と細胞膜との膜融合の段階に作用して阻害効果を示しているものと考えられた。

細胞融合による CPE を指標とする簡便なウイルス感染価測定法はプラーク法より手技が平易で時間が短縮できるものの抗原を検出する方法より感度が低い点が問題となった。今後方法や細胞を検討する必要がある。また、単クローン抗体については現在作成を進めている。短縮抗原に対するクローンの確立、あるいは感染マウスから確立したクローンを短縮抗原でエピトープを決定する、2 種の方法で部位特異的単クローン抗体の確立を試みる。

E. 結論

リバビリン、インターフェロン- α 、S1P 阻害剤は、