

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、通常の分離直後の 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、通常の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晚培養し、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.

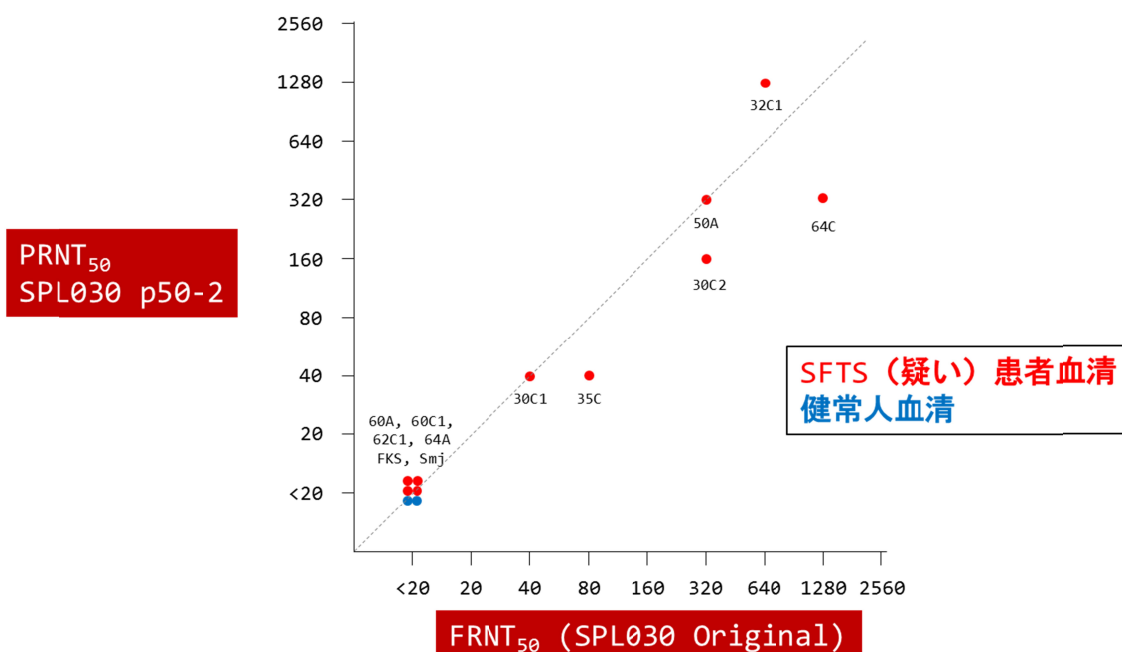


図 1: 2 つの中和抗体価測定法によるヒト血清の中和抗体価の比較

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

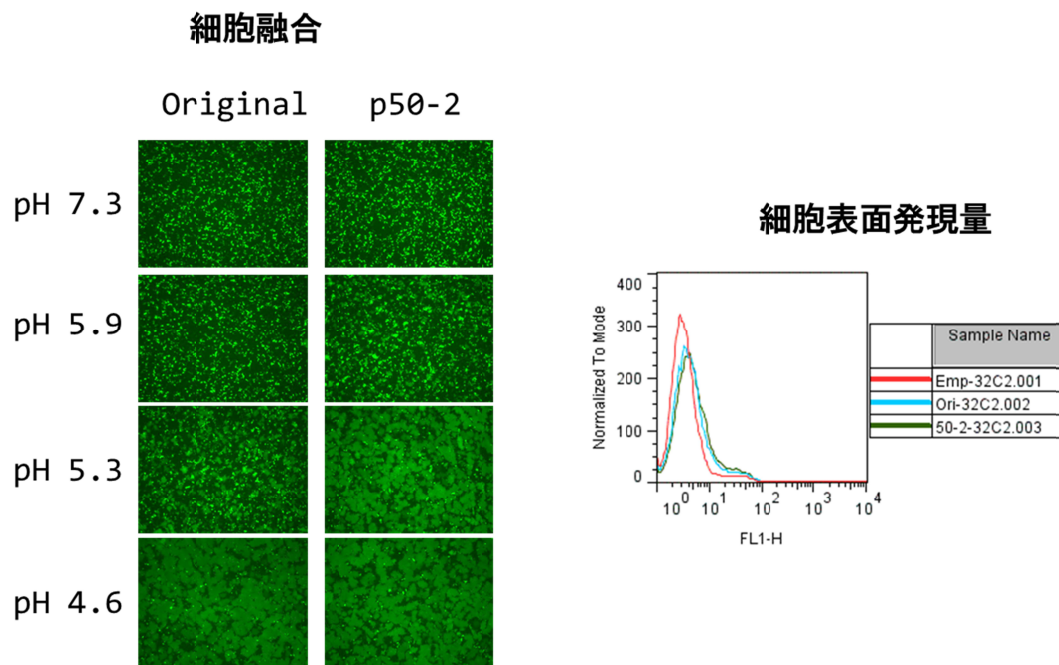


図 3: SFTS ウイルス GP 蛋白質による細胞融合と細胞表面発現量