

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、大型リンパ球の浸潤が目立つ壊死性リンパ節炎、節外臓器への大型リンパ球浸潤、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、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 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、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 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、大型リンパ球の浸潤が目立つ壊死性リンパ節炎、節外臓器への大型リンパ球浸潤、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.

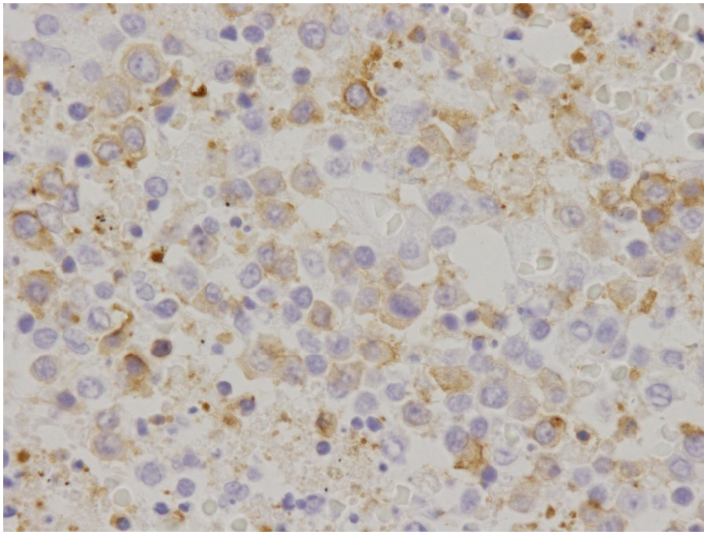


図 1 . 壊死性リンパ節炎を伴うリンパ節の抗 SFTSV NP 抗体による免疫組織化学 . 多数の大型リンパ球浸潤が見られ , 同細胞の細胞質と壊死した細胞残屑に抗原陽性となる .

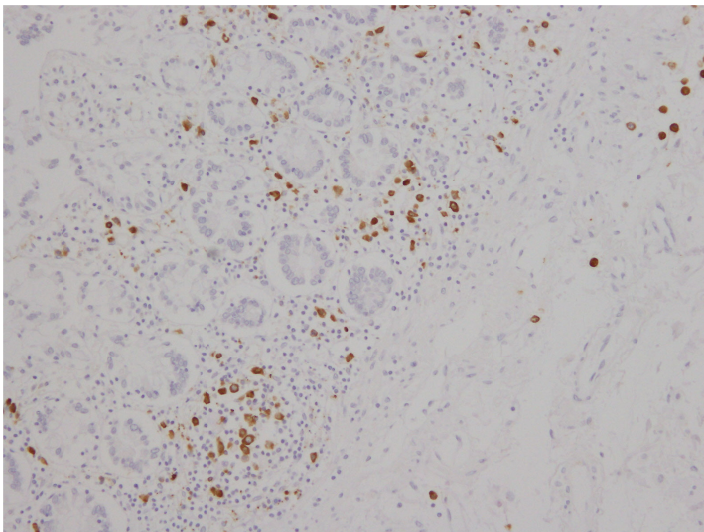


図 2 . 全身諸臓器に抗原陽性細胞が見られた症例の回腸粘膜組織 . 粘膜固有層にウイルス抗原陽性となる大型リンパ球の浸潤を認める . 腸管上皮細胞にウイルス抗原は検出されない .