

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(RVFLV,

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5pg/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、10⁵copies/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、10⁵copies/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(10⁵copies/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10⁵⁻⁶copies/mlに達し、死亡患者では10⁷copies/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, 福土秀悦, 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。

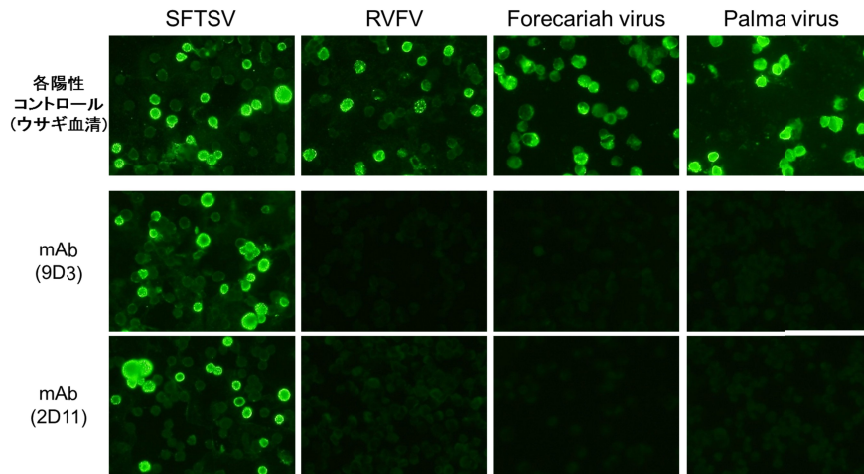


図 1. 間接蛍光抗体法による単クローン抗体の特性

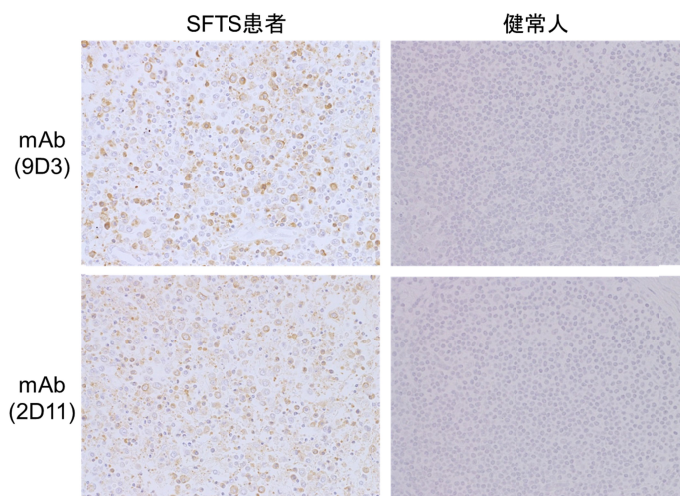


図 2. モノクローナル抗体を用いたリンパ節組織の免疫組織染色による SFTSV 抗原検出

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)
	陽性(+)	陰性(-)	
	Virus RNA (copies/ml)		
	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)