

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つた．これについては類似ウイルス存在も視野にい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に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のハイブリドームを得た。N蛋白との反応性をウエスタンブロット法、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Ni<sup>2+</sup>とCo<sup>2+</sup>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  $\text{Co}^{2+}$  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。 $\text{Co}^{2+}$ 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  $\text{Co}^{2+}$ 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 ( $\pm 14.0$  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思えた回答者は、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%が病院に行くとは回答したが、「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 方が確立でき、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。Co<sup>2+</sup>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考えられる。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れ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性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、その三分の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: リケッ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, 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)
- 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<sup>a</sup>: 100%    Sensitivity<sup>b</sup>: 100%    Specificity<sup>c</sup>: 100%

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

<sup>b</sup>True positive/(true positive + false negative) x 100.

<sup>c</sup>True 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<sup>a</sup>: 100%    Sensitivity<sup>b</sup>: 100%    Specificity<sup>c</sup>: 100%

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

<sup>b</sup>True positive/(true positive + false negative) x 100.

<sup>c</sup>True negative/(true negative + false positive) x 100

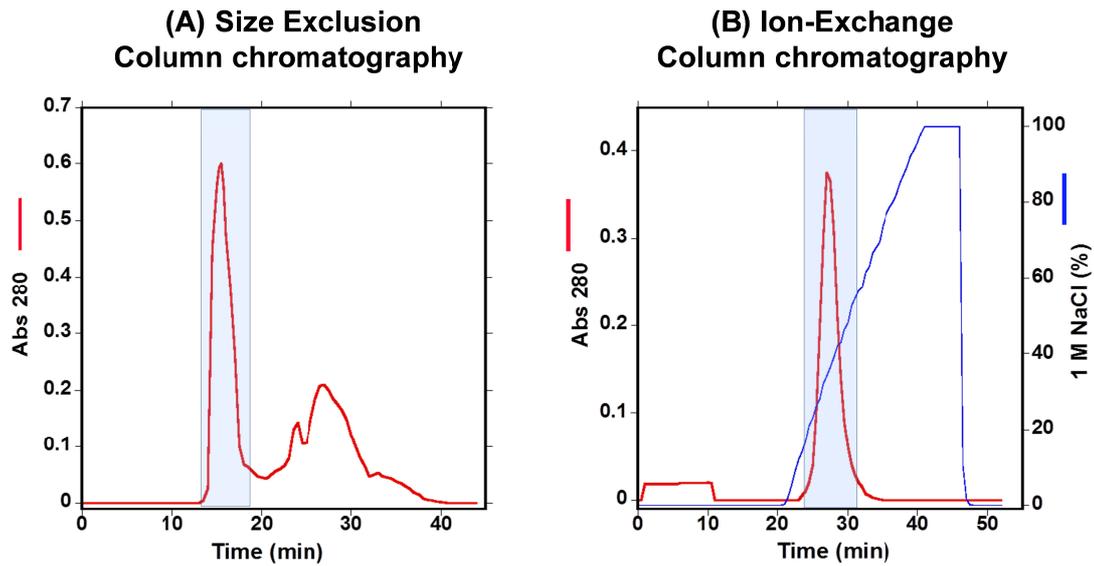


図 1. カラムクロマトグラフィーによる SFTSV N タンパク質の精製

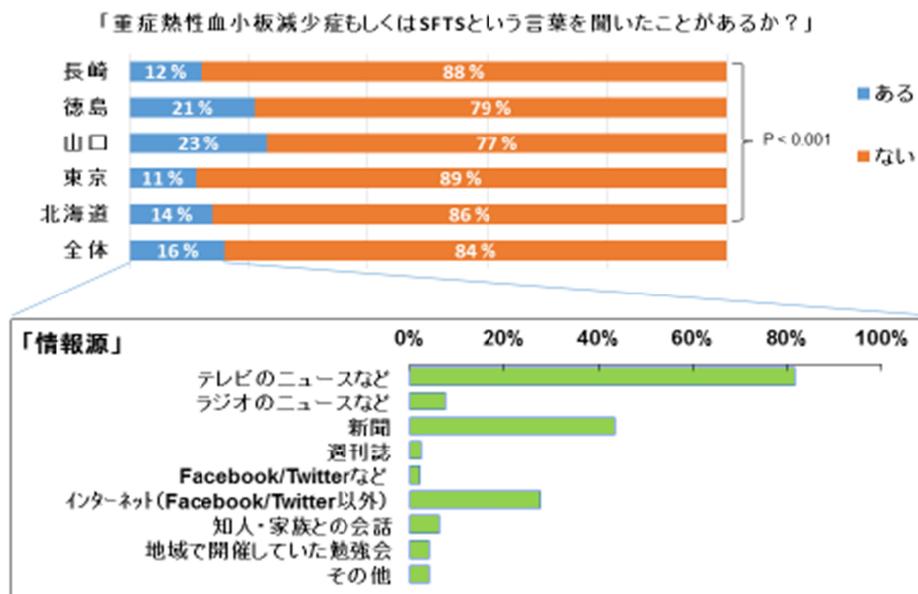


図 2 地域別 SFTS 認知度と情報源