

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 の調査研究における国内ネットワークのあり方に関する研究:
リアルタイム PCR による SFTS 診断法の開発

研究分担者 調恒明(山口県環境保健センター)
研究協力者 岸本壽男, 濱野雅子(岡山県環境保健センター),
研究協力者 四宮博人, 菅美樹(愛媛県立衛生環境研究所)
研究協力者 竹井正行, 町野太朗(宮崎県衛生環境研究所)
研究協力者 福盛順子, 御供田睦代(鹿児島県環境保健センター)
研究協力者 戸田昌一, 岡本玲子, 村田祥子, 本永恭子(山口県環境保健センター)
研究協力者 福士秀悦, 下島昌幸, 吉河智城, 谷英樹, 福間藍子, 西條政幸(国立感染症
研究所)

研究要旨：リアルタイム PCR による重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の診断法を確立し，これを全国の地方衛生研究所等でルーチン検査として実施できるかどうか検討するため，岡山県環境保健センター，愛媛県立衛生環境研究所，宮崎県衛生環境研究所，鹿児島県環境保健センター，山口県環境保健センターの各研究施設において，リアルタイム PCR による SFTSV 検出法の感度および，従来のコンベンショナル PCR との比較検討を行った．スタンダード RNA を用いた検討では，いずれの研究施設においても 10 コピー/reaction 以上の RNA を検出し，高感度に SFTSV を検出できた．また，リアルタイム PCR 法によりコンベンショナル PCR と同等あるいは，それ以上の高い感度でウイルス RNA を検出可能であった．臨床検体を用いた比較検討では，尿検体等，RNA コピー数の少ない検体を用いた場合に，コンベンショナル PCR の結果との相違がみられたが，血清を用いた場合は結果がほぼ一致した．これらの結果から，リアルタイム PCR 法は SFTSV 検出のルーチン検査として有用であると考えられた．M セグメントをターゲットにしたリアルタイム PCR ではコンタミネーションチェック用 probe のシグナルが非特異的に検出されることがあった．今後，この probe の配列の改良等が必要である．

A. 研究目的 fever with thrombocytopenia syndrome ,
重症熱性血小板減少症候群 (severe SFTS) はブニヤウイルス科の新規ウイル

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、致死率の高い重篤な疾患である。2013年1月、国内で初めて SFTS が存在することが明らかにされたことから、SFTS の実験室診断法を確立し、国内の本感染症の病態解明、疫学調査、感染リスク評価を進める必要がある。2013年3月以降、全国の地方衛生研究所等においてコンベンショナルPCRにより SFTSV 検出が実施されてきた。一方、リアルタイムPCR法を用いたSFTSV遺伝子検出は、SFTSV の感染の有無のみならずウイルスRNAを定量できるため、SFTS患者の重症度、予後などの指標となりうることが指摘されている。本研究は、リアルタイムPCRによるSFTSの診断法を確立し、これを全国の地方衛生研究所等でルーチン検査として実施可能かどうか検討することを目的とした。各地方衛生研究所間でリアルタイムPCRにより一定の検出結果が得られるかどうか検証するため、岡山県環境保健センター、愛媛県立衛生環境研究所、宮崎県衛生環境研究所、鹿児島県環境保健センター、山口県環境保健センターの5研究施設において、リアルタイムPCRを実施し、SFTSV検出法の感度および、従来のコンベンショナルPCRとの比較検討を行った。

B. 研究方法

- 1) リアルタイムPCRは国立感染症研究所ウイルス第一部で開発された、SセグメントおよびMセグメントをターゲットにした

TaqMan probe法を用いた。

- 2) スタンダードRNAにはSあるいは、MセグメントのPCR増幅領域に、コンタミネーションチェック用(PC Check用配列)を挿入したRNAをスタンダードとして用いた(図1)。これを用いることにより、検査結果が陽性であった場合、スタンダードRNAのコンタミネーションの有無を判定することができる(図2)。
- 3) SFTSVの中国株の一つであるSFTSV HB29の培養上清からウイルスRNAを抽出し、これを試験サンプルとしてリアルタイムPCRとコンベンショナルPCRの感度の比較検討に用いた。
- 4) 各地方衛生研究所において、これまで検査実施されてきたSFTS疑いの検体について、リアルタイムPCRによるSFTSV検出を実施した。コンベンショナルPCRによる検出と比較検討した。

C. 研究結果

- 1) スタンダードRNAを用いた検討では、いずれの研究施設においても10コピー/reaction以上のRNAを検出し、高感度にSFTSVを検出できた(図3)。
- 2) ウイルスから抽出したRNAを試験サンプルとして用いたところ、リアルタイムPCR法によりコンベンショナルPCRと同等あるいは、それ以上の高い感度でウイルスRNAを検出可能であった(図4)。
- 3) 臨床検体を用いた比較検討では、尿検体、拭い液等、RNAコピー数の少ない検体を用いた場合に、リアルタイムPCRとコン

ベンショナル PCR の結果の相違がみられたが、血清を用いた場合は、両者の結果がほぼ一致した(図5および6)。これらの結果から、リアルタイム PCR 法は SFTSV 検出のルーチン検査として有用であると考えられた。

- 4) M セグメントをターゲットにしたリアルタイム PCR ではウイルス RNA および臨床検体を用いた場合に PC Check 用 probe のシグナルが PCR サイクル後半(35 サイクル以上)に非特異的に検出されることがあった(図7)。

D. 考察

リアルタイム PCR 法を用いた SFTSV 遺伝子検出は、SFTSV の感染の有無のみならずウイルス RNA を定量できるため、SFTS 患者の重症度、予後などの指標となりうることが指摘されている。本研究で、岡山県環境保健センター、愛媛県立衛生環境研究所、宮崎県衛生環境研究所、鹿児島県環境保健センター、山口県環境保健センターの5研究施設において行われた検討から、リアルタイム PCR 法により従来のコンベンショナル PCR と同等あるいは、それ以上の感度で SFTSV を検出できることが明らかになった(図3および4)。臨床検体を用いた検討でも SFTSV を従来と同様に検出可能であることが示された(図5)。これらの結果から、リアルタイム PCR は SFTS の診断に有用であり、従来のコンベンショナル PCR に置き換わるルーチン検査として、各地方衛生研究所等で実施可能

であると考えられた。

M セグメントをターゲットにしたリアルタイム PCR で非特異的に PC Check 用 probe シグナルが検出されることがあった(図7)。今後、コンタミネーション検出用 probe の塩基配列を変更し、非特異的シグナルが検出されないように改良する必要がある。

E. 結論

- 1) リアルタイム PCR 法による SFTSV 検出の評価を5か所の研究施設で行った。
- 2) いずれの研究施設においても、スタンダード RNA およびウイルスから抽出した RNA を高感度に検出可能であった。
- 3) 臨床検体を用いた検討でも SFTSV を従来のコンベンショナル PCR と同様に検出可能であることが示された。
- 4) PC Check 用 probe の塩基配列の変更が必要であるものの、リアルタイム PCR は SFTS の診断に有用であり、従来のコンベンショナル PCR に置き換わるルーチン検査として、各地方衛生研究所等で実施可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

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(9):3325-3333, 2014.

2. 学会発表

- 1) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 鈴木忠樹, 谷英樹, 谷口怜, 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)

- 2) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11)
- 3) Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Tani H, Yoshikawa T, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Shimojima M. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

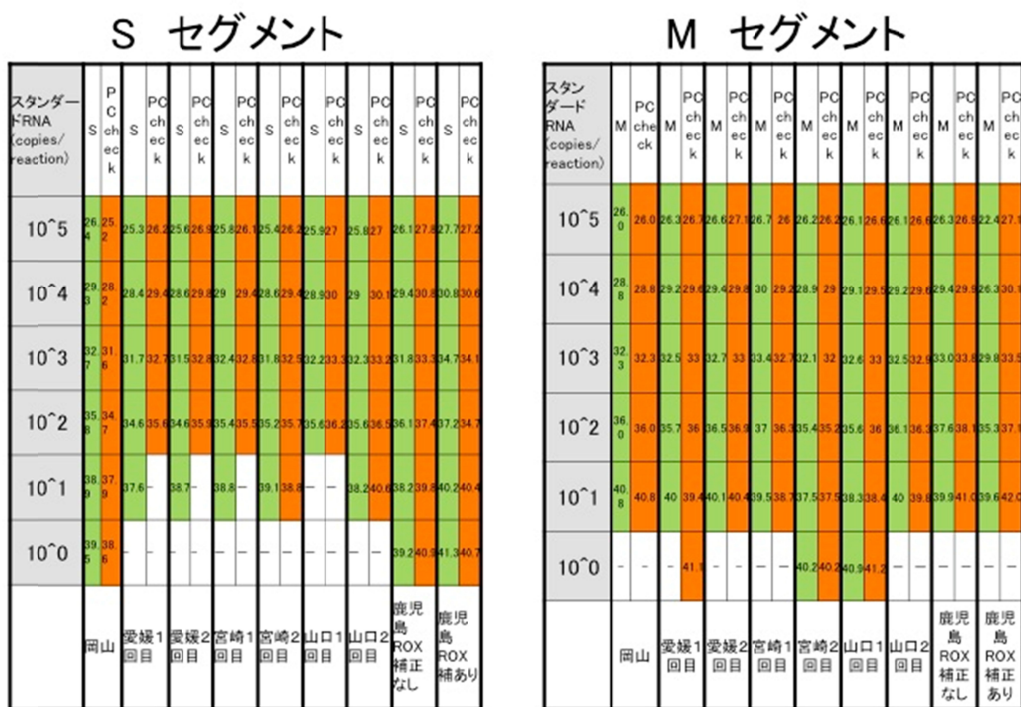


図 3. Standard RNA を用いた検討

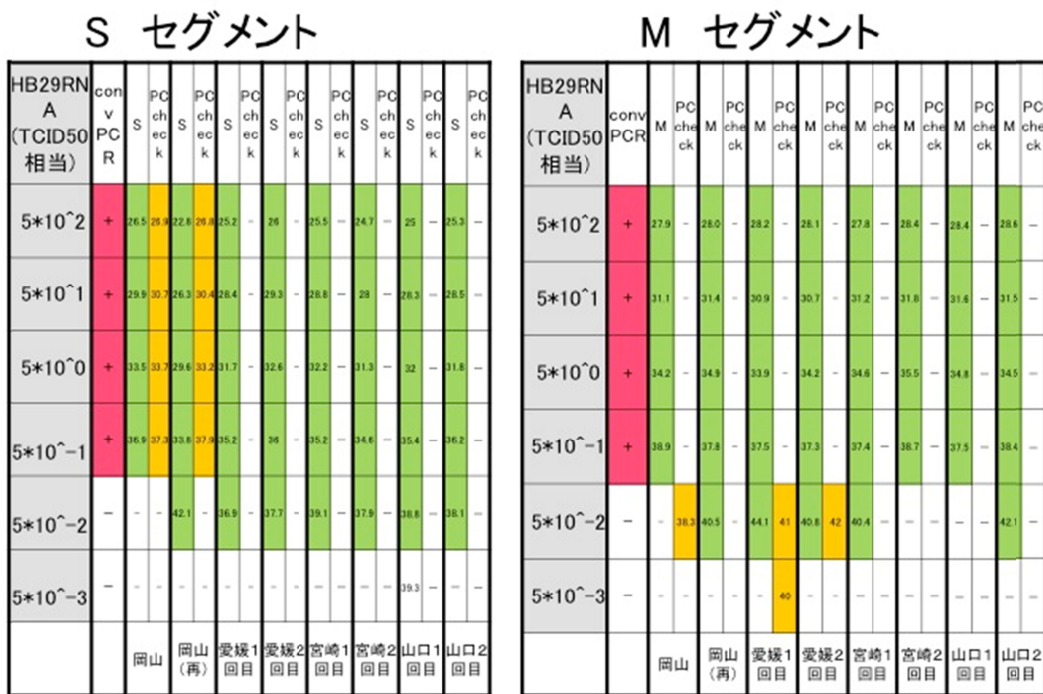


図 4. ウイルス RNA を用いた検討

検体情報							Conv. PCR		S-TaMn (RealTime)		M-TaMn (RealTime)			
検体番号	事例番号	疾患名	年齢	性別	検体	発病日	検体採取日	Primer set 1	Primer set 2	C _T	Quantity	C _T	Quantity	
1	H25-01	SFTS疑い	83	99	M	全血	H25.3.28	H25.4.2	(-)	(-)	-	-	-	-
2	H25-02	SFTS疑い、肺炎、DIC	69	99	F	全血	H25.4.1	H25.4.4	(+)	(+)	28.2	13668.3	28.5	14638.2
3	H25-03	SFTS疑い	63	99	F	全血	H25.4.4	H25.4.11	(+)	(+)	23.6	399008.8	26.0	83139.4
4	H25-04	SFTS疑い	91	6	F	拭い液	H25.7.9	H25.7.9	(-)	(-)	-	-	-	-
5						尿	H25.7.6	H25.7.9	(+)	(-)	-	-	39.1	8.6
6						血漿	H25.7.9	H25.7.9	(+)	(+)	24.8	167921.0	24.7	208283.4
7	H26-02	播種性血管内凝固症候群、SFTS疑い	70	4	F	血清	H26.5.29	H26.6.5	(-)	(-)	-	-	-	-
8	H26-03	SFTS疑い	86	5	F	血清	H26.5.14	H26.5.16	(+)	(+)	29.0	7856.3	28.9	10457.6
9						血清	H26.6.6	H26.6.6	(-)	(-)	-	-	-	-
10	H26-04	SFTS疑い	87	10	F	拭い液	H26.7.2	H26.7.7	(+)	(+)	27.5	22419.8	26.6	51764.8
11						尿	H26.7.2	H26.7.7	(-)	(-)	36.2	43.1	35.9	80.9
12						血漿	H26.7.7	H26.7.7	(+)	(+)	20.0	5429805.5	19.8	6166791.5
13	H26-05	SFTS疑い	83	99	F	血清	H26.7.9	H26.7.11	(-)	(-)	-	-	-	-
14	H26-06	SFTS疑い	70	5	M	血液	H26.8.12	H26.8.20	(+)	(+)	29.6	5205.2	29.9	5297.2
15						尿	H26.8.12	H26.8.20	(-)	(-)	-	-	-	-
16	H26-07	敗血症、SFTS疑い	94	9	F	血液	H26.8.13	H26.8.14	(-)	(-)	-	-	-	-

(山口県)

図 5. 臨床検体を用いた感度, 特異度の比較検討の結果(一部)

検体名	総検体数	不一致検体内訳				
		検体数	ConventionalPCR		リアルタイム PCR	
			Primer 1	Primer 2	Sseg	Mseg
血清	19	1	+	-	+	+
尿	9	1	+	-	-	-
		2	-	-	+	+
咽頭ぬぐい液	8	1	-	-	-	+

(宮崎県)

図 6. 臨床検体を用いた感度, 特異度の比較検討の結果(一部)

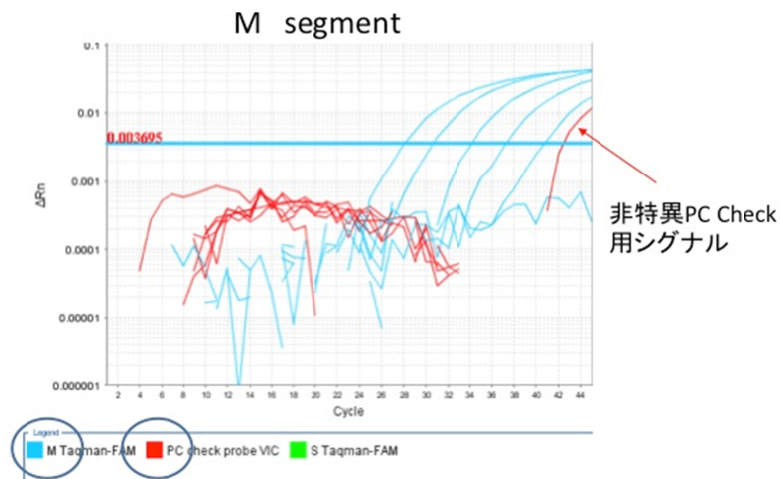


図 7. M segment の増幅曲線