

厚生労働科学研究委託費（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）
委託業務成果報告（業務項目）

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の
強化に関する研究（H26 - 新興実用化—一般—011）

業務項目：「出血熱の解析：SFTS」

担当責任者 森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）

研究要旨：2009年に中国で発生した重症発熱性血小板減少症(SFTS)は、2011年にブニヤウイルス科フレボウイルス属の SFTS ウイルスによる急性感染症であることが判明した新興ウイルス感染症である。その後、日本、韓国でも SFTS 患者が発生している。中国では20省で患者が報告されており、日本では15自治体で患者が発生している。SFTS ウイルスはマダニ媒介性ウイルスであることから、野生動物や家畜とマダニの間でウイルスの感染環が形成されていると考えられる。このため、SFTS ウイルスの分布を調べるためには動物の血清疫学調査を行うのが重要となる。これまでに、組換え SFTS ウイルス抗原を用いた抗体検出法を作製したが動物検体からの抗体検出には感度が低いことが判明した。そこで、SFTS ウイルス感染細胞由来抗原を用いた ELISA 及び SFTS ウイルス感染細胞を抗原とする間接蛍光抗体法を動物血清に適用したところ、十分な感度で抗体が検出された。また、比較的近縁な Bhanja virus との交差反応の有無は血清疫学上大きな問題となるため、両ウイルスの抗原性の交差についても検討した結果、非常に弱い交差反応性はあるものの疫学上問題とならないことが判明した。本試験法により、国内外の動物の SFTS ウイルスの血清疫学が可能となった。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名
及び所属研究機関における職名：森川茂・国立感染症研究所・獣医科学部・部長

業務項目の担当協力者：宇田晶彦、木村昌伸、朴ウンシル、加来義浩、野口章、今岡浩一（同、獣医科学部）、福土秀悦、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸（同、ウイルス第1部）

A. 研究目的

重症発熱性血小板減少症(SFTS)ウイルスは2009年に新興した感染症で、2011年

に中国で原因ウイルスが同定された新規ブニヤウイルスである。SFTS患者の症状は、発熱、消化器症状、血小板減少、白血球数減少等を特徴とし、高齢者で重症例と死亡率が高い傾向がある。これまでに、中国では20省で患者が報告されており、日本では15自治体で患者が発生している。韓国でも数十人の患者が報告されている。国内のこれまでの確定患者数は100症例以上となり致死率は30%と極めて高い。

SFTS ウイルスはマダニ媒介性ウイルスであることから、野生動物や家畜とマダニ

の間でウイルスの感染環が形成されていると考えられる。中国では流行地において反芻獣である山羊、羊、牛が特にウイルスの感染環において重要な役割を果たしていると考えられている。国内の流行地では、これらの家畜がそれほど多く飼育されていないことから野生動物がウイルスの感染環において重要な役割を果たしていると考えられる。このため、SFTS ウイルスの分布を調べるためには野生動物等の血清疫学調査を行うのが重要である。

中国では、各種動物の血清疫学には、ELISA プレートに固相化したウイルス抗原と反応した被験血清中の抗体を、標識ウイルス抗原で検出するサンドイッチ ELISA を用いている。これまでに、同様の ELISA を試みたが十分な感度、特異度が得られなかった。また、組換え SFTS ウイルス抗原を用いた抗体検出法を作製したが動物検体からの抗体検出には感度が低いことが判明した。そこで、SFTS ウイルス感染細胞を用いた抗体検出法を検討し、動物の血清疫学を可能とする必要がある。これまでに、シカ、イヌ、イノシシからの抗体検出が可能であることが明らかになっている。これら以外の動物からの抗体検出の可能性を検討した。さらに、遺伝的に比較的近縁な Bhanja ウイルスとの血清学的な交差性の程度を明らかにし、血清疫学上問題となる交差があるかを明らかにする必要がある。本研究では、これらにより正確な血清疫学を行う体制を整備することを目的とした。

B. 研究方法

これまで、組換え SFTS ウイルス蛋白を用いた血清診断系を開発したが、動物の血

清疫学に用いるには十分な感度が得られなかった。そこで、ELISA 抗原には SFTS ウイルス感染 Huh7 細胞ライセート及び非感染細胞ライセートを用いた。Huh7 細胞に SFTS ウイルスを感染後 3 日目に細胞を PBS で洗浄し、1% NP40/PBS で 10 分間可溶化したライセートを、短波長 UV トランスイルミネータ上で 10 分間 UV 照射してウイルス抗原を可溶化し不活化した。その後 12,000rpm, 10 分間遠心した上清を ELISA 抗原とした。ELISA 抗原は、抗 SFTS ウイルス NP ウサギ血清を用いた ELISA で最大抗原価を示す最大希釈の 4 倍低い希釈である 800 倍希釈して ELISA プレートに固相化した。二次血清には protein A/G-HRPD を用い、基質には ABTS を用いた。間接蛍光抗体法 (IF 法)は、SFTS ウイルス感染 HeLa W229 細胞を用いた。SFTS ウイルス持続感染 HeLa 細胞を作製し、トリプシン処理、PBS 洗浄により浮遊化させた SFTS ウイルス感染 HeLa W229 細胞と非感染 HeLa W229 細胞を 1:2 の比率で混合し、IF スライドグラスに塗抹し、UV 照射下で乾燥しアセトン固定して IF 法の抗原とした。

Bhanja ウイルス血清群の Forecariah と Palma ウイルスを米国から入手し、SFTS 抗原と同様に ELISA 抗原と IF 抗原を作製した。また、Bhanja ウイルス血清群の Forecariah と Palma ウイルスをウサギに実験感染させて特異抗体を作製し、SFTS ウイルスとの交差性を調べた。また、SFTS ウイルス抗体陽性シカ血清を用いて、Forecariah と Palma ウイルス抗原との交差性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、人に由来する材料は用いていない。また、野生動物等の材料は、害獣駆除あるいは狩猟期に捕獲された動物に由来するため、国立感染症研究所の動物実験委員会の定める動物実験に該当しない。Forecariah ウイルスと Palma ウイルスのウサギ感染実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を得て ABSL2 レベルで実施された。

C. 研究結果

1) 動物からの SFTS ウイルス抗体検出法:

これまでにシカ、イノシシ、イヌなどから SFTS ウイルス抗体を検出している。より多くの動物種に対応可能とするため ELISA の二次血清には Protein A/G-HRPD (Invitrogen) を用いた。ウサギ免疫血清、シカ、イノシシ、イヌの陽性血清を用いて検討した結果、Protein A/G-HRPD を 20,000 倍希釈するのが指摘であった。この条件で、シカ、イヌはそれぞれに特異的な二次血清と同等以上の感度で抗体が検出された。この条件で他の動物の血清中の SFTS 特異抗体を検出すると、ニホンザル、タヌキ、アライグマ、ハクビシン、ウサギ、アナグマから抗体陽性動物が見いだされることがわかった。これらの一部の血清は IF でも陽性が確認されていることから、本 ELISA は、各種動物からの SFTS ウイルス抗体を検出することが出来ると判断された。

2) Bhanja ウイルス血清群の Forecariah と Palma ウイルス抗体検出系の開発と SFTS ウイルスとの血清学的交差性:

Forecariah ウイルスと Palma ウイルス

は、Dr. Robert B. Tesh, M.D. (University of Texas Medical Branch, USA) から供与された。国立感染症研究所のバイオリスク管理委員会で両ウイルスのバイオセーフティレベルの申請を行った結果、BSL2 の承認を受けた。このため、両ウイルスの培養、動物感染実験は BSL2 で実施された。ウイルスの N 蛋白質のアミノ酸配列に基づく分子系統樹 (図 1) から、フレボウイルス属のウイルスの中で Forecariah ウイルスと Palma ウイルスは、SFTS ウイルスにより近縁である。なお、リフトベレー熱ウイルスは、遺伝的に距離があり血清学的にも交差しないことを既に確認している。

Forecariah ウイルスと Palma ウイルスを Vero 細胞、Vero E6 細胞、Huh7 細胞に感染するといずれの細胞でも増殖したが、Huh7 細胞で最も増殖効率が高く、感染力価はそれぞれ 2×10^7 TCID₅₀/mL, 6.3×10^5 TCID₅₀/mL であった。Forecariah ウイルスと Palma ウイルス (10^6 TCID₅₀) をウサギ (日本白色種) 2 羽ずつに皮下接種した。感染後 6 週間観察したが、臨床的には全く症状を示さず両ウイルスともウサギには病原性がないと考えられた。感染後 1 週で非常に低力価の抗体が検出され、抗体価は上昇し 6 週でピークに達した。これらの血清及び SFTS ウイルスの N 蛋白質特異的抗血清を用いて ELISA と IF で交差反応性を検討した。その結果、ELISA では Forecariah ウイルス感染ウサギ #2 が SFTS ウイルスに弱い交差反応性を示したが、他の血清は交差反応性を示さなかった (図 2)。また、IF ではいずれの血清も交差反応性を示さなかった (図 3)。

D. 考察

SFTS は、その高い致死率と患者からの二次感染を起こすこともあることから、公衆衛生上極めて重要な新興ウイルス感染症である。国内では SFTS ウイルスを媒介するのはフタトゲチマダニとタカサゴキラマダニとかがえられるが、これらは多くの野外動物、家畜を宿主とすることから、ウイルスの感染感はマダニと動物で維持されていると考えられる。SFTS 患者の発生地域は近畿以西に限局しているが、その原因は不明である。中国、日本でウイルス感染間に重要な動物を明らかにし、それらのモニタリングを継続することは患者発生リスクを評価するためにも重要である。

本研究では、各種動物からの血清抗体を効率よく検出する系を確立した。また、遺伝的に近縁な Bhanja ウイルスとの血清学的交差性に関してウイルス感染ウサギ血清等を用いて解析した結果、非常に弱い交差性はあるものの、容易に鑑別可能で血清疫学上問題ないことが明らかになった。なお、SFTS ウイルスとより近縁なウイルスがアジア、北米で見ついていることから（図 4）近隣アジア諸国での SFTS 近縁ウイルスの調査も検討する必要がある。また、Bhanja ウイルスの国内浸淫度を動物血清を用いて調査することも必要と考えている。

中国 CDC の Porf. Mifang Liang、Porf. Li-Dexin らとの協議から、中国では主に反芻獣家畜が SFTS ウイルス感染環に重要な役割を果たしているとのことであるが、国内ではむしろ野生動物が重要かもしれない。

E. 結論

種々の動物血清から SFTS ウイルス特異抗体を検出する方法が確立された。この方法により、多くの動物種の血清疫学調査を行うことが可能となった。また、本法により SFTS ウイルス特異抗体と遺伝的に近縁な Bhanja ウイルス血清群に対する抗体とを容易に鑑別できることが明らかになった。

F. 健康危険情報

SFTS は、2013 年に国内で患者が確認され、その後さかのぼり調査で、2005 年から患者発生が国内で確認されている。2013 年 1 月 1 日以降に発症した SFTS 症例は 110 名（本年 2 月 4 日時点）で、致死率 30% である。患者は近畿、中国、四国、九州地方で発生しているが、SFTS ウイルスの分布はより広範囲に亘る。

1. 論文発表

- 1) 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.* 2014;67(6):423-7.
- 2) Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro

- Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto, Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, and Masayuki Shimojima. 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.*, 2014 Sep;52(9):3325-33.
- 3) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al., Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Inf Dis.*, 2014 ;209(6):816-27.
2. 学会発表
1. 堀田明豊,木村昌伸,中村幸子,片山敦司,中下留美子,坪田敏男,猪島康雄,鈴木道雄,今岡浩一,棚林清,藤田修,山本美江,宇田晶彦,森川茂. 2007年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)に対する抗体調査. 第157回日本獣医学会学術集会,北海道,2014年9月.
2. 堀田明豊、木村昌伸、坪田敏男、中村幸子、片山敦司、中下留美子、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂. 「2007年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)に対する抗体調査」第157回日本獣医学会学術集会、北海道、2014年9月9日-12日
3. 藤田修、宇田晶彦、木村昌伸、藤田博己、今岡浩一、森川茂. 「ニホンジカから採取したマダニ類のウイルス遺伝子保有状況からみた自然界におけるSFTSウイルス維持様式の検討」第157回日本獣医学会学術集会、北海道、2014年9月9日-12日
4. 森川茂、木村昌伸、堀田明豊、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、野口章、井上智、今岡浩一、前田健. 「野生のシカにおけるSFTSウイルス抗体調査」第157回日本獣医学会学術集会、北海道、2014年9月9日-12日
5. 浜崎千菜美、鍬田龍星、野口慧多、寺田豊、下田宙、高野愛、鈴木和男、森川茂、前田健. 「野生動物におけるSFTSウイルス感染の疫学調査」第157回日本獣医学会学術集会、北海道、2014年9月9日-12日
6. 森川茂、朴ウンシル、今岡浩一、前田健、宇田晶彦. 「SFTSウイルスの生活環における野生のシカの役割」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
7. 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、神奈川、2014年11月10-12日
8. 前田健、濱崎千菜美、下田宙、鋤田龍星、野口慧多、米満研三、高野愛、鈴木和男、森川茂. 「SFTS ウイルスの生活環における動物の重要性」 第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
 9. 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染阻害効果」 第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
 10. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma¹ Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani¹ Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
 11. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojim¹, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
 12. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
 13. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushi, Yoshiharu Kaku, Masayuki Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda, Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
 14. Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10th China-Japan International Conference of Virology, Changchun,

China, Aug25-28 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. NPのアミノ酸配列に基づくフレボウイルスの分子系統樹

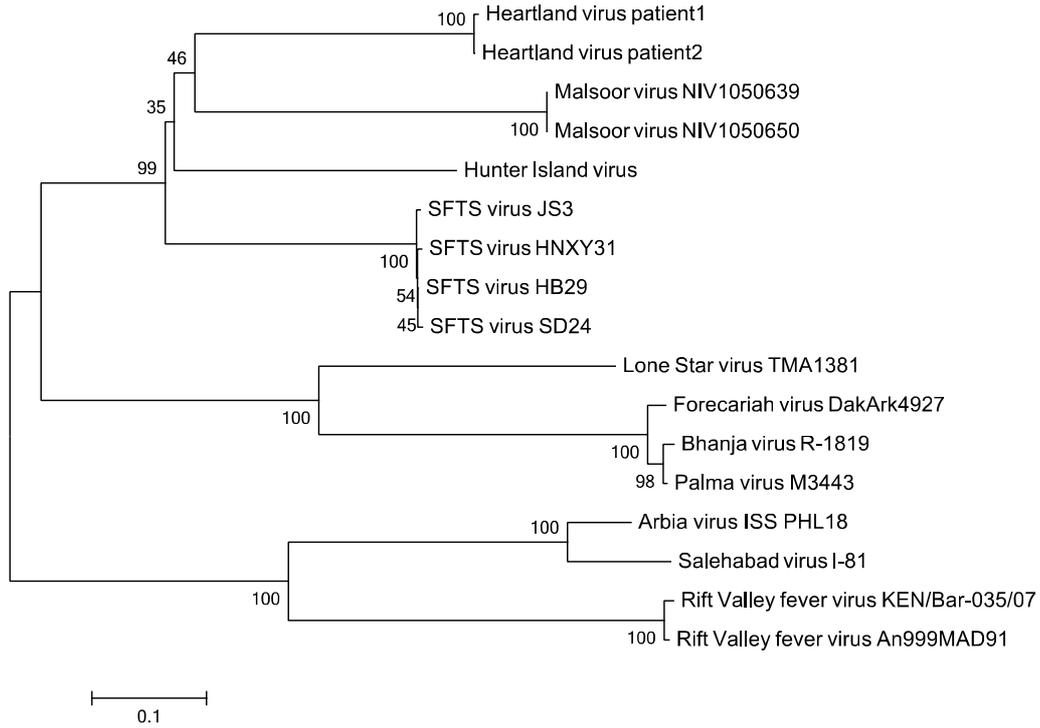


図2. SFTS ウイルスと Bhanja ウイルスとの ELISA による交差反応性

IgG-ELISA

Titers to	Forecariah	SFTS	Homo/hetero
Forecariah #1-6wpi	204,800	800	256
Forecariah #1-4wpi	3,200	< 100	> 32
Forecariah #1-2wpi	1,600	< 100	> 16
Forecariah #1-1wpi	100	< 100	> 1
Forecariah #2-6wpi	51,200	6,400	8
Palma #3-6wpi	204,800	< 100	> 2048
Palma #4-6wpi	25,600	< 100	> 256
anti-SFTSV	< 100	512,000	> 5120

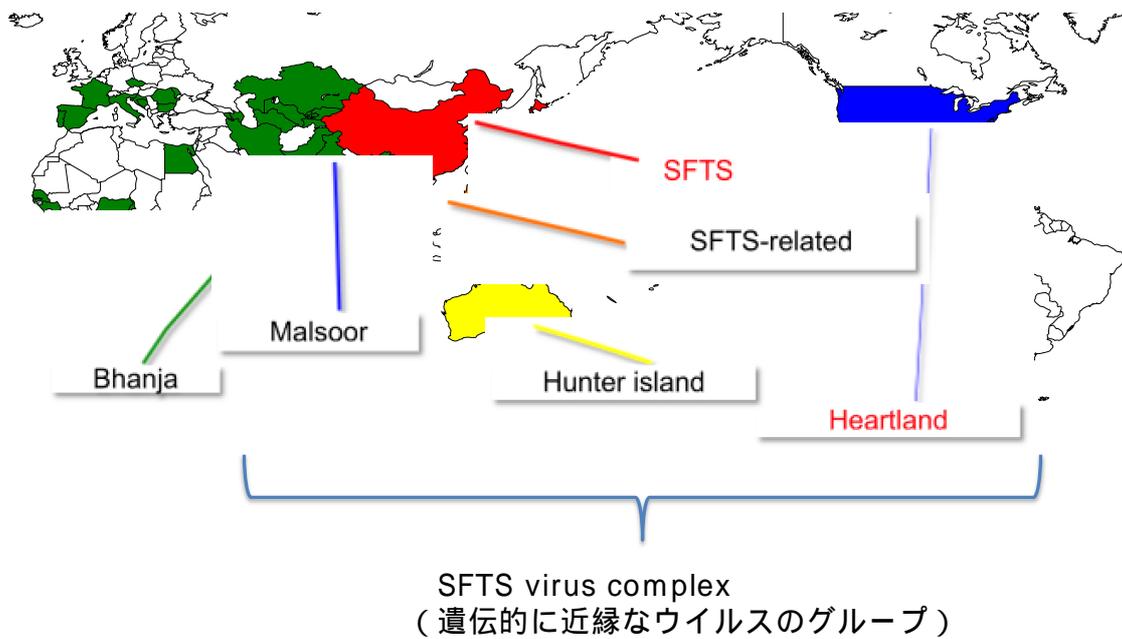
weak cross reaction, if any, was observed in Forecariah #2 rabbit serum

図3 . SFTS ウイルスと Bhanja ウイルスとの IF による交差反応性

Titers to	Forecariah	SFTS	Homo/hetero
Forecariah #1-6wpi	5,120	<10	>512
Forecariah #1-4wpi	160	ND	
Forecariah #1-2wpi	ND	ND	
Forecariah #1-1wpi	ND	ND	
Forecariah #2-6wpi	5,120	<10	>512
Palma #3-6wpi	1,280	<10	>128
Palma #4-6wpi	1,280	<10	>128
anti-SFTSV	<10	>6400	>640

No cross reaction observed in IF test

図4 . SFTS ウイルスに近縁なウイルスの分布



研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto, Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, and Masayuki Shimojima	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)	3325-33	2014