

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

## **SFTS の制圧に向けた総合的研究**

**(H25-新興-指定-009)**

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 年 3 月

研究代表者 倉田 毅  
(国立感染症研究所, 国際医療福祉大学塩谷病院)

平成 25 年度厚生労働科学研究補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

SFTS の制圧に向けた総合的研究

平成 25 年度 研究組織

研究代表者

倉田 毅 国立感染症研究所・名誉所員 (国際医療福祉大学塩谷病院・教授)

研究分担者

氏名	所属
西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・部長
森川茂	国立感染症研究所獣医科学部・部長
有川二郎	北海道大学大学院医学研究科・教授
森田公一	長崎大学熱帯医学研究所・教授
調恒明	山口県環境保健センター・所長
加藤康幸	国立国際医療研究センター・医長

研究協力者(順不同)

氏名	所属
下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
谷英樹	国立感染症研究所ウイルス第一部
福土秀悦	国立感染症研究所ウイルス第一部
吉河智城	国立感染症研究所ウイルス第一部
福間藍子	国立感染症研究所ウイルス第一部
緒方もも子	国立感染症研究所ウイルス第一部
高橋徹	山口県立総合医療センター血液内科
東大地	愛媛大学医学部附属病院第一内科
坂口翔太	宮崎県立日南病院内科
泉川公一	長崎大学医歯薬学総合研究科
馬原文彦	馬原医院
長谷川秀樹	国立感染症研究所感染病理部
鈴木忠樹	国立感染症研究所感染病理部
片野晴隆	国立感染症研究所感染病理部
佐多徹太郎	富山衛生研究所
西園晃	大分大医学部
山田健太郎	大分大医学部
網康至	国立感染症研究所動物管理室
永田典代	国立感染症研究所感染病理部
大石和徳	国立感染症研究所疫学センター
山岸拓也	国立感染症研究所疫学センター
中島一敏	国立感染症研究所疫学センター
澤邊京子	国立感染症研究所昆虫医科学
安藤秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部
川端寛樹	国立感染症研究所細菌第二部
新倉綾	国立感染症研究所動物管理室
藤田修	国立感染症研究所獣医科学部
高田伸弘	福井大学医学部
藤田博己	馬原アカリ研究所
岸本寿男	岡山県環境保健センター
木田浩司	岡山県環境保健センター
今岡浩一	国立感染症研究所獣医科学部
宇田晶彦	国立感染症研究所獣医科学部

加来義浩	国立感染症研究所獣医科学部
木村昌伸	国立感染症研究所獣医科学部
藤田修	国立感染症研究所獣医科学部
野口章	国立感染症研究所獣医科学部
新井智	国立感染症研究所疫学センター
前田健	山口大学共同獣医学部
高野愛	山口大学共同獣医学部
苅和宏明	北海道大学獣医学部
吉松組子	北海道大学医学部
澤洋文	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
水谷哲也	東京農工大学農学部
吾郷昌信	長崎県環境保健研究センター
安田二郎	長崎大学熱帯医学研究所
堀尾政博	長崎大学熱帯医学研究所ミュージアム
早坂大輔	長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野
四宮博人	愛媛県衛生研究所
菅美樹	愛媛県衛生研究所
福盛順子	鹿児島県環境保健センター
御供田睦代	鹿児島県環境保健センター
柳井徳磨	岐阜大学獣医学部
戸田昌一	山口県環境保健センター
岡本玲子	山口県環境保健センター
村田祥子	山口県環境保健センター
國吉香織	山口県環境保健センター
富尾淳	東京大学医学部附属病院災害医療マネジメント部
忽那賢志	独)国立国際医療研究センター国際感染症センター
福井康雄	高知医療センター感染症科

---

## 目次

### I. 総括研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究	1
倉田毅	

### II. 分担研究報告書

1. 重症熱性血小板減少症候群の疫学的特徴の解明と診断および治療法の開発	10
西條政幸	
2. 日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明	29
森川茂	
3. SFTS ウイルスの感染機構・増殖機構・病原性の解明研究	40
有川二郎	
4. 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	54
森田公一	
5. 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	60
調恒明	
6. SFTS の臨床対応とガイドライン	65
加藤康幸	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	69
---------------------	----

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)

総括研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究

(H25-新興-指定-009)

研究代表者	倉田毅	国立感染症研究所(国際医療福祉大学塩谷病院)
研究分担者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者	森川茂	国立感染症研究所獣医科学部
研究分担者	有川二郎	北海道大学大学院医学研究科
研究分担者	森田公一	長崎大学熱帯医学研究所
研究分担者	調恒明	山口県環境保健センター
研究分担者	加藤康幸	独)国立国際医療研究センター

研究要旨:2011年に中国で流行している致死率の高い,ブニヤウイルス科フラビウイルス属に分離される新規ウイルスによる全身感染症,severe fever with thrombocytopenia syndrome(SFTS,重症熱性血小板減少症候群)が報告された.その報告によるとマダニが媒介する感染症で,発熱,消化管症状を発症し,末梢血液検査で白血球減少と血小板減少が認められることが多い.2013年1月に日本でもSFTS患者発生が確認された.日本におけるSFTS対策目的に以下の研究がなされた.1)SFTSの診断・疫学・予防・治療法の開発,2)日本の自然界におけるSFTSウイルスの存在様式の解明,3)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,4)SFTSウイルスの感染機構・増殖機構・病原性の解明,5)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,6)SFTSの臨床対応とガイドライン,等である.後方視的にSFTSの流行について調査したところ,2005年から2012年までにSFTSにより死亡または重症な経過をとって回復していた患者11名が確認された.また,2013年には西日本を中心に40名のSFTS患者が報告された.動物におけるSFTS抗体保有状況を調べ,また,高感度SFTSウイルス(SFTSV)ゲノム検出システムを開発してマダニにおけるSFTSV遺伝子の検出等の調査により,SFTSVは日本全国に広く分布している可能性が示唆された.SFTSに関する調査研究が開始されたばかりであり,今後も日本におけるSFTSの流行状況,ヒトのSFTSV感染経路・感染リスク,診断・治療・予防法の開発,基礎的研究,予防啓発に関する研究,診療の手引き,等の研究がなされる必要がある.

## A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は 2011 年に報告されたダニ媒介性の新興ブニヤウイルス (SFTS ウイルス, SFTSV) による新興ウイルス感染症である。致死率が比較的高い。重篤な新興ウイルス感染症である SFTS が国内に存在することが明らかにされた。日本において生活している限り SFTSV に感染する危険性から逃れることはできない。そこで、日本における SFTS の疫学、SFTSV への感染リスクを明らかにすることは、重要でかつ緊急を要する課題である。早急な SFTS 対策の整備・構築が求められる。日本国内での SFTS の診断体制を整備し、正確に SFTS をウイルス学的に診断することにより、疫学・病態・感染リスクを明らかにする。日本で分離された SFTSV に関するデータに基づいて、より高感度な遺伝子検出法、SFTSV 抗原・抗体検出のための診断システムを開発する。国内の SFTS の疫学や臨床的特徴・発症病理を明らかにする。診断、疫学調査に必須となる超高感度 SFTSV 検出系を開発する。治療や予防法の評価に必要な感染動物モデルを開発する。それは SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性機構を明らかにするための基盤整備に重要である。診断・治療 (抗ウイルス薬)・予防法 (ワクチン開発を含む) の開発基盤を整備する。

SFTSV は動物由来感染症・ダニ媒介性感染症であることから、日本における SFTSV の自然界における存在様式を明らかにしてヒトへの感染リスクを明らかにしなければならない。そのためには、宿主となるマダニの種類、保有状況、地域性と季節性等を調査研究する必要がある。哺乳動物やマダニと SFTSV の存在様式における関連を科学的に解明する。さらに宿主マダニの忌避や殺ダニ効果のある薬剤に関する研究も行う。

地方自治体や地域住民の協力を得ながら、SFTS 患者発生地域における SFTSV 感染リスクを評価し、感染予防を実践するための基盤も整備する。

臨床面では、患者の臨床対策として院内感染予防対策、診断・治療ガイドライン、患者搬送ガイドラインを作成する。

SFTS は中国、韓国、そして、日本に存在することが確認されている。日本において SFTS 対策を講じることができれば、それは他の感染症の対策や日本以外の国々における SFTS 対策に貢献することに繋がる。SFTS 流行地域での安全・安心につながる対策を有効に行うための科学的知見を得ることが本研究の目的である。

## B. 研究方法

### 1) 重症熱性血小板減少症候群の疫学的特徴の解明と診断および治療法の開発

日本における SFTS の疫学的特徴の解明と実験室診断法の整備に取り組んだ。診断法の開発においては RT-PCR 法、定量的リアルタイム RT-PCR 法を、抗体検出法として感染性 SFTSV を抗原とした間接蛍光抗体法、ELISA 法、中和抗体測定法を整備した。さらに組換え SFTSV-核蛋白質 (SFTSV-rN) を抗原とした抗体検出法を開発し、診断における有用性を評価した。ウイルス学的検査システムを開発した上で、後方視的に SFTS に関する疫学的・臨床的調査を実施した。日本の SFTS 患者から分離された SFTSV の塩基配列を決定し、中国株のそれらと比較し、分子疫学的解析を実施した。また、急性期の SFTS 患者のウイルスゲノム量と予後との関連を解析した。さらに、亡くなられた SFTS 患者の組織標本を用いて感染病理学的解析を

行った。

2) 日本の自然界における SFTSV の存在様式の解明

SFTSV ゲノムを高感度に、かつ、特異的に検出する方法として、MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR を開発対象として選択した。日本の SFTSV 数株の塩基配列情報が得られた段階で、MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR を 10 通りデザインし、1) 遺伝子増幅効率、2) ダニ由来 RNA に対する非特異的増幅の有無、3) ダニ由来 RNA による増幅効率への影響を解析した。各地で捕獲されたマダニのダニ種を同定した。マダニから RNA を抽出し、その 1/10 を用いて、リアルタイム RT-PCR で SFTSV 遺伝子の検出を試みた。蛍光抗体法および ELISA 法を用いて各種動物からの SFTSV 特異的抗体の検出法を開発した。抗原調整には SFTSV 中国株である HB29 株を用いた。

3) SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性の解明研究

SFTSV (中国株 HB29) の GP をまとった VSV シールドタイプ (SFTSVpv) を作製した。シールドタイプウイルスを用いて各種哺乳動物細胞株への感染性を比較した。また、SFTSVpv および SFTSV の pH 依存的な細胞侵入機構を解析した。さらに、これらのウイルスを用いて SFTSV 感染患者血清中の SFTSVpv に対する中和活性価を検討した。C 型レクチ発現細胞での SFTSVpv の感染性および SFTSV の増殖についても検討した。

病理学的解析においては、パラフィン包埋切片を脱パラフィン後、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を用いて免疫組織化学染色を実施した。また、パラフィン切片から RNA を抽出し、SFTSV N gene を特異的に検出するプローブ、プライマーをデザインし、それらを利用して SFTSV の遺伝子断片を定量的に増幅させた。

SW13 細胞 (ヒト副腎皮質腺癌由来)、293T 細胞 (ヒト胎児腎由来)、Huh-7 細胞 (ヒト肝癌由来) における、リバビリン (100mM)、インターフェロン- $\gamma$  ( $1 \times 10^3$  unit/ml)、S1P 阻害剤 (30mM)、またはそれぞれの組み合わせ SFTSV (YG1 株) に対する増殖抑制効果を評価した。

SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性について、SFTSV をヒト肝細胞癌由来 Huh-7 細胞に感染させ、経時的に培養上清および細胞を回収し、その上清中の SFTSV 感染価を測定し、また、感染させた細胞における各種蛋白質の発現についてウェスタンブロット法により確認して解析した。

SFTSV ゲノム遺伝子を定量的に、しかも、高感度に検出するための real-time RT-PCR 法を確立し、北海道等の地域で採取されたマダニ中の SFTSV ゲノム検出を試みた。また、乳のみマウスへの SFTSV の脳内接種により SFTSV 増殖、症状の有無等を解析した。

組換え SFTSV エンベロープ蛋白質のうち、保存的な領域 2ヶ所、アジア型に固有の領域 1カ所を選択し、大腸菌ベクターを用いて発現させるための遺伝子をクローニングした。また、その抗原性を調べるとともに、それを抗原として単クローン抗体の作製を試みる。

4) 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

SFTSV-rN を、大腸菌発現ベクターを用いて発現させ、それを抗原としてヒト、イノシシ、

イヌ,シカにおける SFTSV に対する IgG および IgM 抗体を検出する ELISA 法を開発した.

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血清疫学調査を実施した.また県内で発生した 5 名の患者については血清を Vero 細胞に接種しウイルス分離を実施した.分離されたウイルスは遺伝子塩基配列を解析した.

長崎県で捕獲されたイノシシの血清 276 検体,および,2013 年に長崎県福祉保健部が採取したイヌ血清 114 検体を上記組み換え抗原を用いた ELISA 法,およびウイルス中和法により解析した.

長崎県各地でマダニを採集し,それらの検体から Vero E6 細胞に接種しウイルス分離を試み,また,そこから RNA を抽出し,SFTSV L セグメントゲノムのポリメラーゼ蛋白領域を増幅するように設計した Real-time RT-PCR 反応により遺伝子検出を試みた.

#### 5) 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

国立感染症研究所で分離された SFTSV を鋳型として conventional PCR 法により増幅し,マルチナ(島津株式会社)をもちいて電気泳動を行いバンドが検出される最低濃度を求めた.SFTSV の GP 遺伝子, NP 遺伝子を同時に検出する multiplex PCR 法と conventional PCR 法の検出感度を評価した.

#### 6) SFTS 診療の手引きの作成に関する研究

SFTS 患者の診療に役立つ SFTS 診療マニュアルを作成した.平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金「我が国における一類感染症の患者発生時に備えた診断・治療・予防等の臨床的対応及び積極的疫学調査に関する

研究(H23-新興-一般-006)」において作成した「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)診療の手引き」を基に内容の充実,改訂することを図った.

### C. 研究結果

#### 1. 重症熱性血小板減少症候群の疫学的特徴の解明と診断および治療法の開発

後方視的研究を通じて 2012 年以前に SFTS 患者が初めて SFTS と診断された患者を含めて 11 名いたことを見出した.臨床症状や検査数値,年齢,居住地,季節性には特徴が認められ,高致死率(11 人中 6 人が死亡)であった.2013 年以降の患者も含め分離された SFTSV 遺伝子の塩基配列を決定し,中国株のそれらと比較したところ,SFTSV 日本株は中国株とは独立して位置し,更に日本株内でも遺伝子型が複数あることが明らかにされた.日本株の塩基配列に基づく定量 RT-PCR 法を確立し,血中ウイルス量と予後に関連があることを見出した.抗体検出法として ELISA 法,中和抗体法,間接蛍光抗体法を開発し,それらの診断および血清疫学研究における有用性が確認された.SFTS の回復者の血清が高い(中和)抗体価を示すことが証明された.SFTS 患者の病理学的解析がなされ,SFTS の病態解明に重要な所見が得られた.

#### 2. 日本の自然界における SFTSV の存在様式の解明

九州から北海道の 26 自治体において,植生マダニとシカ付着マダニ(18 種約 5,000 匹)を調査したところ,タカサゴキラマダニ,フタトゲチマダニ,キチマダニ,オオトゲチマダニ,ヒゲナガチマダニ等から,SFTSV 遺伝子が検出されたが,保有率は 5-20%程度とマダ

この種類により違いがあった。一方、シカについては、調査した 27 自治体のうち 17 自治体で抗体陽性シカが確認され、SFTS 患者発生自治体では陽性率が高い傾向が見られた。イヌ(主に猟犬)は、調査した 19 自治体のうち 10 自治体で抗体陽性動物が確認され、イノシシは、調査した 15 自治体のうち 7 自治体で抗体陽性動物が確認された。また、ノウサギ(2004-2007 年に収集)は、調査した 4 自治体のうち 2 自治体で抗体陽性動物が確認された。北海道では、358 頭のエゾシカ、71 頭のイヌ、431 頭の齧歯類の全てが抗体陰性であった。大分県では、568 頭の飼育犬と 40 頭の放浪犬の抗体陽性率は、それぞれ 0.53、2.5%であった。近畿では多くの野生動物に抗体が検出された。

### 3. SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性の解明研究

SFTSV の GP は、小胞体もしくはゴルジ装置内、および、その周辺に局在した。また、比較的多くの細胞株に感受性を示したが、リンパ球系細胞にはほとんど感染性を示さなかった。SFTS 回復患者血清によって SFTSVpv および SFTSV の感染は阻害された。C 型レクチン発現細胞では、DC-SIGN、DC-SIGNR、LSECtin を発現する細胞全てにおいて、SFTSVpv の感受性および SFTSV の増殖がコントロールの細胞に比べて倍以上増強した。

SFTS 患者の病理学的解析により、以下の事項が明らかにされた。右腋窩リンパ節は腫大し、肝臓には脂肪変性が見られた。抗 SFTSV NP 抗体を用いた免疫組織化学では、右腋窩リンパ節と右頸部リンパ節に細胞質が明瞭に染色される芽球様の抗原陽性細胞が多数見られた。骨髄、脾臓、肝臓、副腎に

はリンパ節と同様の抗原陽性細胞がわずかに見られたが、それぞれの臓器実質細胞の感染は明らかではなかった。

リバビリン、インターフェロン-a とともに強い抗ウイルス効果を示した。S1P 阻害剤も全ての細胞において感染性ウイルス産生を 15-30%程度に減少させた。全ての細胞において、どの 2 剤併用もウイルス産生を劇的に減少させた。

SFTSV は Huh-7 細胞に効率的に感染し、その培養上清中に、細胞変性効果を起こすことなく非常に多くの (Vero E6 細胞での測定で  $10^7$  FFU/ml 以上) 感染性ウイルス粒子を産生した。

北海道各地 (273 検体)、和歌山 (13 検体)、山形 (19 検体) から採集した 305 検体を用いて、上述した real-time RT-PCR を用いて検索したが、これらの検体からは SFTSV ゲノムは検出されなかった。SFTSV を脳内接種した乳のみマウスの各臓器の SFTSV RNA の検出を試み、脳において SFTSV RNA は強く検出された。また、脳以外の肺、肝、脾、腎からも脳よりは弱いシグナルが検出された。

目的とした SFTSV-GP の部分ペプチドの遺伝子が RT-PCR で得られた。これらの増幅断片をプラスミド pGEM-T にクローニングし塩基配列を決定した。現在この断片の大腸菌ベクターでの発現を試みている。SFTSV-GP に対する単クローン抗体の作製を試みている。

### 4. 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

抗体検出系の安価な診断用抗原と血清診断系を開発し、それを利用して、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、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開

始した。SFTSV の Nタンパク質を大腸菌で発現させた安価で大量生産に適する診断用抗原を開発し、また、LAMP 法を用いた迅速遺伝子検出系を完成させた。また、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例も発見されなかった。患者急性期血清からは5例すべてウイルスが分離され、その遺伝子解析から県内においてウイルスは地域に土着し変化を続けていることが示唆された。動物の調査では野生のイノシシや患者発生地域で飼育されているイヌに抗体陽性(ELISA 抗体、中和抗体価ともに陽性)が確認された。またダニの調査では今のところ、ウイルスは分離されなかった。

5. 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

SFTSV ゲノム検出において高感度のリアルタイム PCR 法が開発され、地方衛生研究所においても導入が可能であることが示された。

6. SFTS の診療の手引き作成に関する研究

「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の診療の手引き」を作成した。内容は、疾患概要、SFTSV の国内および国際分布、臨床経過、国内症例の疫学、SFTS の臨床的特徴、診断確定に必要な検査、行政検査の流れ、適切な検体と梱包、診断・治療・感染防止のアルゴリズム、家族内・職業感染事例、患者血液・体液曝露時の対応、参考資料である。

D. 考察

SFTS が日本で流行していることが明らかにされてから、約1年が経過した。SFTS の日本における流行状況の概要が明らかにされた。また、後方視的に SFTS と診断された患者11名(日本で初めて SFTS と診断され

た患者を含む)の臨床症状を詳細に解析し、予後不良の原因として血球貪食症候群、血液凝固系の異常、多臓器不全が関わっていることが示唆された。SFTS に関する病理所見を詳細に解析し、それを報告した。所属リンパ節で SFTSV が強く増殖し、また、肝臓、脾臓、骨髄においても SFTSV 抗原が検出された。世界で初めての報告となる。日本の患者から分離された SFTSV は、系統樹解析上中国株とは独立したクラスターを形成した。日本株は独立して進化を遂げている。

ウイルス分離および同定、ウイルスゲノムの高感度検出システムを開発した。また、抗体検出システムにおいて、組換え N 蛋白質を抗原とした場合においても診断に有用であることが明らかにされている。抗体検出法が広く行われる体制整備が求められる。

マダニにおける SFTSV ゲノム陽性率を日本全国で採取されたマダニを用いて評価した。また、シカ、イノシシ、イヌ(猟犬)における SFTSV 抗体保有状況を明らかにし、本研究班では SFTSV の自然界における存在様式を明らかにしつつある。SFTS 患者が報告されている西日本だけでなく、その他の地域に生息しているマダニからも SFTSV ゲノムが検出されていること、抗体陽性動物が存在することから、今後詳細にかつ前向きに SFTS に関する疫学調査がなされれば、現在患者が報告されていない中部日本、東日本の地域からも SFTS 患者が発生する可能性がある。中部日本、東日本の地域でも、SFTSV に感染する可能性があることが明らかにされた。

SFTS の治療法の開発の一端として、抗ウイルス剤の SFTSV の増殖抑制効果について評価した。インターフェロン、リバビリン

等に強い効果が認められた。また、SFTSV の細胞侵入機構、肝細胞への病原性、乳飲みマウスでの SFTSV の病原性と増殖性について詳細な研究がなされた。SFTS の治療法や予防法の開発には、このような基礎的研究が欠かせない。

SFTS が流行している長崎県をモデル地域として、SFTS の発生状況、分離ウイルスの分子疫学、マダニに咬まれるリスクの高い人々における血清疫学、SFTS 予防のためのリスクコミュニケーションのあり方等について研究が開始された。今後もさらなる研究の推進が必要である。

SFTS の国内における診断体制を維持・改良していくためには、現時点では地方衛生研究所を中心とする公衆衛生当局の協力が不可欠である。感染研と地方衛生研究所が連携をとりながら、診断法の開発とその有用性の評価がなされる必要がある。現在、conventional RT-PCR 法だけが地方衛生研究所において整備されている。本研究成果を踏まえて、定量的リアルタイム RT-PCR 法や抗体検出システムを整備する必要性を評価して、日本国内における SFTS 診断体制のさらなる改善が図られる必要がある。

SFTS はヒトからヒトへ感染する。その経路は接触感染考えられているが、SFTS 患者の気管内挿管を実施した医師が患者から SFTSV に感染した事例が報告されている。SFTS 患者の診察・診療・治療に関わる医療従事者に対する診療手引きを開発して、それを多くの医療従事者に提供することが重要である。本研究班で開発された「重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の診療の手引き」は国立国際医療研究センターのホームページ (<http://www.dcc-ncgm.info/topic->

sfts/) でダウンロードできるようにした。

SFTS に対する感染症対策、基礎研究、疫学的臨床的研究は開始されたばかりである。今後も継続した研究を続け、より詳細に SFTS の特徴を明らかにする必要がある。

## E. 結論

SFTS 感染症対策に関する研究が開始された。SFTS の疫学、臨床的、病理学的特徴が明らかにされつつある。また、日本における SFTSV の自然界における存在様式、分布について知見が蓄積されつつある。SFTS に関する継続した調査研究を前向きに実施し、少しでも患者数を減らし、予後を改善させることが望まれる。

## F. 健康危険情報

長崎県内では野生動物(イノシシ)、および飼育動物(イヌ)で SFTS 感染個体が確認され、生活の場にちかく SFTSV が生息している可能性が高い。同様の調査研究が日本国内のその他の地域でも実施され、SFTS 患者が報告されている西日本だけでなく、中部日本、東日本にも SFTSV ゲノム陽性のマダニが生息していることが明らかにされた。西日本だけでなく、その他の地域でも SFTS 患者が発生する危険性がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T,

- Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J Infect Dis* 209:816-827, 2014
- 2) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 森川茂, 西條政幸. 日本における重症熱性血小板減少症候群, *ウイルス* 63: 7-12, 2013
  - 3) 下島昌幸, 西條政幸. ダニ媒介性新興感染症 SFTS. *実験医学* 31:3047-3053, 2013
  - 4) 西條政幸. Severe fever with thrombocytopenia syndrome. *感染症* 43:210-216, 2013
  - 5) 西條政幸. 血小板減少をきたす新しいダニ媒介性ウイルス感染症: SFTS. *Medical Practice* 30:1810-1812, 2013
  - 6) 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. *皮膚病診療* 35:822-826, 2013
  - 7) 西條政幸. 日本で流行するダニ媒介性ウイルス感染症 SFTS とダニ媒介性脳炎. *医学のあゆみ* 247:701-702, 2013
  - 8) 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. *Medical Technology* 41:1275-1277, 2013
  - 9) 谷英樹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS). *検査と技術* 41: 1164-1167, 2013
  - 10) 森川茂. 重症熱性血小板減少症候群, *獣疫学雑誌* 17:142-143, 2014
  - 11) 森田公一. デング熱と vector-borne diseases (SFTS を含む), *化学療法の領域* 29:25-32, 2013
- ## 2. 学会発表
- 1) 西條政幸, 高橋徹, 前田健, 水谷哲也, 大松勉, 吉河智城, 谷英樹, 福士秀悦, 下島昌幸, 福間藍子, 緒方もも子, 鈴木忠樹, 中島典子, 片野晴隆, 永田典代, 長谷川秀樹, 山岸拓也, 倉根一郎, 森川茂, 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
  - 2) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 宇田晶彦, 谷口怜, 福間藍子, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸, 西條政幸, 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の確定診断に使用されているコンベンショナル PCR の評価, 及びリアルタイム定量 PCR との比較, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
  - 3) 福間藍子, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 下島昌幸, 森川茂, 前田健, 西條政幸, 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の血清学的診断法の開発, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
  - 4) 長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋徹, 鈴木忠樹, 片野晴隆, 中島典子, 福士秀悦, 下島昌幸, 前田健, 水谷哲也, 森川茂, 西條政幸. 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
  - 5) 森川茂, 木村昌伸, 福士秀悦, 福間藍子, 加来義浩, 朴ウンシル, 谷英樹, 吉河智城, 井上智, 今岡浩一, 下島昌幸, 西條政幸, 前田健. SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)

- 6) 谷口怜, 福士秀悦, Masangkay Joseoh, 渡辺俊平, 大松勉, 下田宙, 前田健, 福間藍子, 吉河智城, 谷英樹, 下島昌幸, 西條政幸, 明石博臣, 吉川泰弘, 久和茂, 森川茂. フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 7) 宇田晶彦, 福士秀悦, 加来義浩, 吉河智城, 下島昌幸, 新倉綾, 井上智, 安藤秀二, 前田健, 西條政幸, 森川茂. マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 8) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 福間藍子, 谷口怜, 前田健, 高橋徹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 9) 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 福間藍子, 緒方もも子, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ナイジェリアにおけるリフトバレー熱の血清疫学. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 10) 谷英樹, 下島昌幸, 福間藍子, 谷口怜, 吉河智城, 福士秀悦, 森川茂, 前田健, 高橋徹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 11) 高橋徹, 前田健, 亀井敏昭, 水谷哲也, 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 森川茂, 長谷川秀樹, 中島典子, 鈴木忠樹, 永田典代, 片野晴隆, 山岸拓也, 大石和徳, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の日本における初症例. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 12) Shimojima M, Takahashi T, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Morikawa S, Saijo M. Severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. XV International Conference on Negative Strand Viruses, Granada, Spain (2013. 6)
- 13) 高橋徹, 石堂亜希, 重岡徹, 富永貴元, 亀井敏昭, 前田健, 西條政幸, 森川茂, 長谷川秀樹, 水谷哲也. 本法における重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の初発例. 第 108 回日本内科学会中国地方会例会, 岡山 (2013.6)
- 14) 坂口翔太, 平塚雄聡, 西條政幸, 岡山昭彦. 保存血清により診断された重症熱性血小板減少症候群 (SFTS). 第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 大阪 (2013.11)
- 15) 末盛浩一郎, 東太地, 村上雄一, 長谷川均, 四宮博人, 西條政幸, 安川正貴. 救命しえた重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の 1 例. 第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 大阪 (2013.11)
- 16) 谷岡大輔, 西條政幸, 守分正. 日本で初めて患者に付着していたタカサゴキラマダニおよび血清から SFTS ウイルスが分離された SFTS の 1 例. 第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 大阪 (2013.11)
- 17) 前田健, 高橋徹, 奥田優, 水谷哲也, 山岸拓也, 森川茂, 下島昌幸, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの分離・同定. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013. 9)
- 18) 森川茂, 木村昌伸, 福士秀悦, 加来義浩, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 井上智, 今岡浩一, 柳井徳磨, 下島昌幸, 西條政幸, 前田健.

- 動物の SFTS ウイルス抗体調査. 第 156 回  
日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013. 9)
- 19) Nguyen Dung, 下田宙, 濱崎千菜美, 寺田  
農, 野口慧多, 鎌田流星, 高野愛, 森川茂,  
前田健. 飼育犬から重症熱性血小板減少  
症候群(SFTS)ウイルスと交差する抗体の  
検出. 第 156 回日本獣医学会学術集会,  
岐阜 (2013. 9)
- 20) 谷口怜, 福士秀悦, Joseph Masangkay, 渡  
辺俊平, 大松勉, 下田宙, 前田健, 下島昌  
幸, 西條政幸, 明石博臣, 吉川泰弘, 久和  
茂, 森川茂. フィリピンのコウモリからの  
SFTS ウイルスと交差する抗体の検出. 第  
156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013.  
9)
- 21) 宇田晶彦, 福士秀悦, 加来義浩, 吉河智城,  
下島昌幸, 新倉綾, 安藤秀二, 川端寛樹,  
高野愛, 前田健, 藤田博己, 澤邊京子, 西  
條政幸, 森川茂. マダニからの SFTS ウイ  
ルス遺伝子の検出. 第 156 回日本獣医学  
会学術集会, 岐阜 (2013. 9)
- 22) 前田健, 濱崎千菜美, 久保翔太郎, 遠藤泰  
之, 寺田農, 鎌田流星, 高野愛, 下田宙,  
森川茂. 国内飼育犬から重症熱性血小板  
減少症候群(SFTS)ウイルスに対する抗体  
の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集  
会, 神戸 (2013.11)
- 23) 余福勲, Ferdinard Adungo, 内田玲麻, 井  
上真吾, 森田公一, Preparation of  
genetically- engineered antigen of RVF  
virus for development of antibody-  
detecting test kit. 第 61 回日本ウイルス学  
会学術集会. 神戸 (2013.11)
- 24) 早坂大輔, 森田公一, 重症熱性血小板減  
少症候群(SFTS)の血清診断法の確立およ  
び媒介マダニ調査. 九州微生物研究会, 福  
岡 (2013.12)
- 25) 泉川公一 他, 「SFTS の臨床像」, 第 9 回  
市中病院でみる世界の感染症, 東京  
(2013.10)
- 26) 泉川公一 他, 「我が国で発生した SFTS の  
臨床と疫学研究」第 13 回人と動物の共通  
感染症研究会学術集会, 東京, (2013.11)
- 27) 泉川公一 他, 「救命し得た SFTS virus に  
よる重症熱性血小板減少症候群の一例」,  
第 61 回化療・56 回感染症中西日本合同学  
会, 大阪 (2013.11)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
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.

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)  
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)  
重症熱性血小板減少症候群の疫学的特徴の解明と診断および治療法の開発

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	下島昌幸	(国立感染症研究所ウイルス第一部・第一室長)
	福士秀悦	(国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官)
	谷英樹	(国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官)
	吉河智城	(国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官)
	福間藍子	(国立感染症研究所ウイルス第一部・流動研究員)
	緒方もも子	(国立感染症研究所ウイルス第一部第一室・研究員)
	高橋徹	(山口県立総合医療センター血液内科・部長)
	山岸拓也	(国立感染症研究所感染症疫学センター・主任研究官)

研究要旨:重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)は数年前より中国で発生していたウイルス性感染症であるが、日本においても本感染症の患者がいることが2013年初めに報告された。病原ウイルス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)、であり、マダニが媒介する。そこで日本における SFTS の疫学的特徴の解明と実験室診断法の整備に取り組んだ。SFTS ウイルスの中国分離株(およびその遺伝子配列)を用いた RT-PCR 法および間接蛍光抗体法による抗体検出法により、後方視的研究を通じて2012年以前に SFTS 患者が初めて SFTS と診断された患者を含めて11名いたことを見出した。臨床症状や検査数値、年齢、居住地、季節性には特徴が認められ、高致死率(11人中6人が死亡)であった。2013年以降の患者も含め分離された SFTSV 遺伝子の塩基配列を決定し、中国株のそれらと比較したところ、SFTSV 日本株は中国株とは独立して位置し、更に日本株内でも遺伝子型が複数あることが明らかにされた。日本株の塩基配列に基づく定量 RT-PCR 法を確立し、血中ウイルス量と予後に関連があることを見出した。抗体検出法として ELISA 法、中和抗体法、間接蛍光抗体法を開発し、それらの診断および血清疫学研究における有用性を評価した。SFTS の回復者の血清が高い(中和)抗体価を示すことを見出した。SFTS 患者の病理学的解析がなされ、SFTS の病態解明に重要な所見が得られた。これらの成果は今後の治療法開発や感染予防対策、診断法の向上(感度、精度、迅速化等)に資すると考えられる。

A. 研究目的  
重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)は  
2006年には中国で発生が確認されていた疾患

で、新規ブニヤウイルス SFTS ウイルス(SFTS virus, SFTSV)による全身性感染症であることが2011年に報告された。中国以外での発生は認められていなかったが、海外渡航歴のない日本人が本感染症で死亡していたことが2013年1月に報告された。このことは日本国内でのSFTS発生状況を明らかにする必要があること、流行している場合には疫学状況の把握と診断法の整備、予防法・治療法の開発が必要であること、等を示している。本年度は過去も含め日本におけるSFTSの疫学的特徴の解明と実験室診断法の整備に取り組んだ。

また、本研究では日本国内で確認されたSFTS剖検例の病理組織検体を用いてSFTSの病理学的解析法の確立を目的とした。ウイルス感染症の病理学的検索方法としては、光学顕微鏡による観察、免疫組織化学、ISH(In situ hybridization)法、電子顕微鏡、遺伝子検査などが挙げられるが、これらのうち、国立感染症研究所感染病理部ではSFTS剖検例の病理診断のルーチン検査として光学顕微鏡による観察、免疫組織化学、遺伝子検査の3つの検査系を組み合わせることをし、それらの検査系を確立した。

## B. 研究方法

### 1) 後方視的調査

SFTSの症例定義を表1のように定め、厚生労働省結核感染症課長通知で全国の医療機関に情報提供及び協力の依頼を行い、患者情報と患者検体(血清、血漿、血液、咽頭拭い液、脳脊髄液、尿)を国立感染症研究所ウイルス第一部に送付され、届けられた検体についてウイルス学的検査が実施された。急性期血清については、ウイルス分離検査、RT-PCR法による遺伝子増幅法、そして、回

復期血清については中和抗体法および間接蛍光抗体法による抗体検査が実施された。

### 2) RT-PCR

SFTSV中国株(HB29)の遺伝子配列をもとに準備されていたOne-step RT-PCR法により、SFTS疑い患者由来の血液・脳脊髄液・尿検体からSFTSVゲノム検出を試みた。また、日本のSFTSV株の遺伝子配列を基にプライマー、プローブを設計し、SFTSVゲノム量を1ステップリアルタイム定量RT-PCR法を開発した。SFTS患者の急性期の血中SFTSVゲノム量と予後との関連を解析した。

### 3) 塩基配列決定

SFTSV遺伝子が検出されたSFTS疑い患者の血液より精製されたRNAを、ランダムヘキサマーを用いて逆転写反応によりcDNAを調整した。これを鋳型として、SFTSV(YG1株)の配列をもとに設計したプライマーを用いてオーバーラッピングPCRを行いウイルスゲノムL、M、Sセグメント全てをカバーするPCR産物を用意し、これらの遺伝子配列を次世代シーケンシングの技術を用いて決定した。

### 4) ウイルス分離

RT-PCRで遺伝子陽性と判断された血清をVero細胞に接種しウイルス分離を試みた。分離の確認は、接種細胞におけるSFTSVの存在を抗SFTSV-N蛋白質ウサギ血清を用いた間接蛍光抗体法によった。

### 5) 間接蛍光抗体法

SFTSV中国株HB29を感染させたVero細胞と非感染細胞との混合物、あるいは組換えSFTSV-N蛋白質を恒常的に発現するHeLaと非発現HeLa細胞を混合したものをスライドガラスに乾燥固定させ、アセトンとUV照射により固定・不活化したものを抗原とした。患者検体(血液、血清、血漿)を反応後、

FITC 標識抗ヒト IgG 抗体(もしくは IgM 抗体)と反応させ、蛍光顕微鏡下で観察した。

#### 6) ELISA

SFTSV 中国株 HB29 を感染させた Huh7 細胞もしくは SFTSV-N 蛋白質発現バキュロウイルスを感染させた Sf9 細胞を 1% NP40 で溶解し、UV 不活化後、その上清を抗原とした。ELISA 用マイクロプレートに吸着後、患者検体(血液、血清、血漿)を反応させ、更に HRP 標識抗ヒト IgG 抗体と反応させた。基質である ABTS 液で発色させ、OD<sub>405</sub> の吸光度を測定した(図 1)。バックグラウンドの測定に非感染 Huh7 細胞もしくはコントロールバキュロウイルス感染 Sf9 細胞を用いた。

#### 7) 中和抗体測定

ウイルスとしては SFTSV 中国株 HB29 あるいは同 GP 蛋白質外套シュードタイプを用いた。SFTSV を用いた場合、ウイルスを患者検体と混合し一定時間培養後、Vero 細胞に感染させ、3 日後に間接蛍光抗体法によりウイルス抗原の有無を観察した。シュードタイプを用いた場合、ウイルスを患者検体と混合し一定時間培養後、Vero 細胞に感染させ、1 日後にレポーター(ルシフェラーゼ)の発現量を測定した。

#### 8) SFTS の病理学的解析

##### a) 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。

##### b) 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 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害を室温 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)を用いてプロトコル通り免疫染色を実施した。

##### c) 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、プライマーセットを用いて、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。

用いたプライマー・プローブセットは、

SFTSV(CHN)

Forward and RT-primer: 5'-CCCTG

ATGCCTTGACGATCT-3',

Reverse primer:

5'-TGATTGGGTGAAGGATACGAAGTT-3',

Probe:

5'-(FAM)TTGCCTCGAGTCAGGGCAAAGACAA(BHQ1)-3']

SFTSV(JPN1)

Forward and RT-primer:

5'-CCCTGATGCCTTGACGATCT-3',

Reverse primer:

5'-GGGTGAGRGACACAAAGTTCA-3',  
Probe:  
5'-(FAM)CATTGTCTTTGCCCTGACTCG  
AGGCA(BHQ1)-3'],  
  
SFTSV(JPN2)  
Forward and RT-primer:  
5'-CCCTGATGCCTTGACGATCT-3',  
Reverse primer:  
5'-TGATTGGGTGAGGGACACA  
AAGTT-3', Probe:  
5'-(FAM)TTGCCTCGAGTCAG  
GGCAAAGACAA(BHQ1)-3'

を使用した。

(倫理面からの配慮について)

書面によるインフォームドコンセントや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。動物実験も同動物実験委員会の承認を得て実施された。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) 日本における SFTSV に関する後方視的な臨床的・疫学的調査

後方視的調査として厚生労働省結核感染症課より全国の医療機関に情報提供及び協力の依頼を行い(厚生労働省結核感染症課長健感発 0130 第 1 号, 表 1), SFTSV を疑った患者の情報および検体収集を行った。検体については SFTSV 中国株(HB29)の検出用に準備されていた RT-PCR 法による遺伝

子検出, HB29 株感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法による抗体検出, Vero 細胞を用いたウイルス分離等のウイルス学的検査が実施された。送付された SFTS 疑い患者 23 名の検体を解析したところ, うち 10 名(男 8 名, 女 2 名, うち 5 名死亡)が SFTSV 感染に罹患していたことが判明した。7 名は遺伝子陽性かつウイルス分離陽性により, 1 名は遺伝子陽性かつ抗 SFTSV に対する IgM 陽性により, 残る 2 名は抗 SFTSV に対する IgG 陽性により SFTS と診断された。SFTS 患者はいずれも 50 歳以上(図 2A), 発症時期は 2005 年(2 名)・2011 年(2 名)・2012 年(6 名)であり(図 2B), 発症月別では 4 月から 12 月(図 2C), 居住地は西日本の 6 県(長崎県, 宮崎県, 佐賀県, 山口県, 愛媛県, 高知県)であった(図 2D)。初めて SFTS と診断された患者を含めた 11 名の臨床症状を解析した(表 2)。発熱, 全身倦怠感, 消化器症状が全例で認められ, 末梢血液検査では白血球減少および血小板減少が, 生化学検査によって血中 AST・ALT・LDH・CK の上昇が全例で認められた。BUN および CRE の上昇も約半数で認められ腎不全を伴う患者が多かった。血液凝固系の異常も全ての患者で認められた。11 例中 9 人で出血症状が認められた。蛋白尿および血尿も全ての患者で認められた。11 人中 5 人の患者で骨髄検査が実施され, 全ての患者で骨髄血球貪食像が認められた(図 3)。11 人中 9 人の患者で神経症状が認められた(表 2)。

### 2) 血清, 脳脊髄液, 尿からの SFTSV ゲノム検出

血中で SFTSV ゲノムが検出されても, 同時期に採取された脳脊髄液, 尿からは検出されてもその量は少なかった。急性期の血中

SFTSVゲノム量は、死亡した患者は生存している患者と比較して約10倍以上高く、その差は統計学的に有意であった(図4)。

3) 日本分離株の中国株と比較した系統樹解析

日本で分離された株は中国株と比較して新たに独立したクラスターを形成しており、この日本株が形成するクラスターには既存の中国株は一つも含まれていないことが明らかとなった(図5)。この結果はS, M, Lセグメントすべてで共通であった。更に日本株のうち1株は他の株が形成するクラスターから外れたものであった(図5)。

4) SFTSV に対する抗体検出システム開発

SFTSV に対する抗体検出法として、ELISA法および中和抗体測定法の確立と前述の間接蛍光抗体法の抗体検出における有用性を評価した。ELISA法では、SFTSV中国分離株HB29を感染させたHuh7細胞の溶解液を抗原とした場合に良好な反応性が認められ、回復患者の経時的血中抗体価は有意に上昇した[図6、バックグラウンドとして非感染Huh7細胞の溶解液を用い、OD値を差し引く(図1)]。SFTSVの組換えN蛋白質(SFTSV-rNP)を発現させる組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫 Sf9 細胞の溶解液を抗原としたELISAでは、検出感度が感染性SFTSVを抗原にした場合に比較して低い傾向があった。しかし、回復期に採取された血清が全てそれで陽性を呈し、診断における有用性が認められた(図6)。中和抗体測定法では、SFTSVを用いた方法とSFTSVのGP蛋白質(SFTSV-GP)をまとったシュードタイプウイルスを用いた2つの方法を確立し、中和活性を明確に測れることを確認した(シュードタイプウイルスのデータ等は研究分担者有川より報告)。間接蛍光抗体法では、抗原として

SFTSV 感染 Vero 細胞もしくはウイルスの N 蛋白質発現 HeLa 細胞のいずれを用いた場合でも、Huh7-ELISA での結果と一致する反応性が認められた(図7,表3)。

5) SFTS の病理学的解析

a) SFTS 症例の病理組織像

平成25年末までに国立感染症研究所感染病理部に検査依頼されたSFTS剖検症例は6例であった。これら6例には、いずれもリンパ節や脾臓などのリンパ系組織にリンパ芽球様細胞、組織球、リンパ球などの浸潤と広範な壊死が見られた。また、壊死部にはghost cellと核崩壊産物が目立つが、好中球などの顆粒球浸潤が目立たず、肉芽腫の形成も見られなかった(図8)。ダニ咬傷側に近いリンパ節に腫大を認める症例では、同リンパ節に上記のような所見が見られ、壊死性リンパ節炎の所見であった。さらに、これらのリンパ節や脾臓、骨髄には著明な血球貪食像(図3)が見られた。その他の臓器の変化は真菌感染症や肝小葉壊死などが見られる症例もあったが、症例により多様性に富み、共通して見られる所見としては、リンパ系組織の壊死と血球貪食像であった。

b) 免疫組織化学による SFTSV 検索

抗SFTSV NP抗体を用いた免疫組織化学では、壊死を伴うリンパ節や脾臓などのリンパ系組織に細胞質が明瞭に染色されるリンパ芽球様の抗原陽性細胞が多数見られた(図9)。骨髄、肝臓、副腎、腎臓、心臓、肺などの実質臓器には抗原陽性の芽球様細胞の浸潤が見られたが、壊死を伴うリンパ節や脾臓などに比べると、陽性細胞数は少なく、それぞれの臓器実質細胞の感染も明らかではなかった。

c) ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた SFTSV 遺伝子検索

一般的に剖検例では死後、時間が経過するとともに組織中の DNase, RNase の働きにより、DNA, RNA の分解が進む。さらにホルマリン固定により DNA は通常 200bp 以下に断片化される。RNA に至っては剖検例では 100bp 以下になることも少なくなく、ホルマリン固定した剖検例のサンプルは、遺伝子検出にとっては条件の悪いサンプルである。しかしながら、免疫組織化学で用いた切片と同じ検体を用いて遺伝子検査を行うことにより、抗体の非特異反応という問題を常に抱える免疫組織化学の結果を補完することができ、感染症の病理診断においては非常に有用である。また、Real-time PCR では目的遺伝子のコピー数が検出されることで、病原体と疾患との関連を考える上で大きな参考となる。特に、SFTS の病理に関しては不明な点が多く、さらに抗体の特異性について完全に保証されていないことから、このような遺伝子検査と免疫組織化学を組み合わせる必要がある。ホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) から抽出した核酸は断片化しているため、amplicon が 200bp 以上の通常の PCR では極端に感度が落ちる。そこで、FFPE サンプルから抽出した核酸の遺伝子検査には、amplicon が 200bp 以下の real-time RT-PCR が有用である。感染病理部では日本国内で症例が発見される前に、中国で分離された株の遺伝子配列を参考に病理組織検体に至適化した real-time RT-PCR の系を立ち上げていた (SFTSV(CHN)プライマー・プローブセット)。当初の SFTS 病理検査では、その系を用い

て診断を行っていたが、その後、日本の株の遺伝子配列が明らかになり、SFTSV(CHN)プライマー・プローブセットでは、検出感度が低い可能性が考えられたことから、山口県で分離された株の遺伝子配列を参考に SFTSV(JPN1)プライマー・プローブセットを作製した。この系では、日本の株の検出感度が 100 倍程度高くなっており、より詳細にウイルスの組織分布を評価することができるようになった (表 4)。この遺伝子検査の結果は、免疫組織化学の結果と非常に良く相関しており、検体の保管状況が良い場合は、標本中に存在する 1 つの陽性細胞を確実に検出できた。また、免疫組織化学では陽性所見が見られなかった組織においても低コピーながらウイルス RNA が検出された。これは、免疫組織化学の感度以下の少数のウイルス感染細胞が組織内に存在することが考えられるが、SFTSV は血中に大量のウイルスが存在していることから、組織内の血液中に存在するウイルスを検出している可能性も考えられ、必ずしも当該組織内でウイルスが増殖していることを意味しないと考えられた。その後、日本で分離された他の株で SFTSV(JPN1)プライマー・プローブセットに対するミスマッチが見つかったので、SFTSV(JPN2)プライマー・プローブセットを作製し、現在は、そちらを病理診断に用いている。

D. 考察

SFTS が国内で既に 2005 年には発生していたこと、および SFTSV の日本株が系統樹上で中国株と独立のクラスターを形成したことを考慮すると、SFTSV は、最近になって中国等から日本に侵入したのではなく、かつ、中国の流行が日本

から輸出されて発生していることではないことを示している。2005 年よりもっと以前から両国に分布しそれぞれの場所では変異を蓄積してきたと言える。

後方視的調査で用いられた症例定義(表 1)では重症例または死亡例であることが定義の 1 つとなっており、致死率(10 名中 5 名死亡, 50%)が中国における致死率(約 10%)と比較し明らかに高い。このことは表 2 に示す日本の SFTS の臨床データには軽症例は含まれていないことを意味し、SFTS の臨床症状や疫学の全体的な把握は未だできておらず、今後の情報収集の方法を検討する必要がある。SFTS と日本で初めて診断された患者を含めた 11 人の SFTS 患者の臨床的解析によると、出血傾向、神経症状、腎不全等の多臓器不全が認められた。11 人中 5 人の患者で骨髓検査がなされていた。その 5 人全てで血球貪食症候群の所見が認められた。SFTS の病態には血球貪食症候群、凝固異常(播種性血管内凝固症候群等)、多臓器不全が関わっており、それが予後不良の原因ではないかと考えられる。現時点では、SFTS に対する特異的な治療法はない。しかし、病態を明らかにすることで、それらに対する対症療法を実施することが可能となり、それが予後の改善に結びつく可能性がある。今後の研究が待たれる。

今回測定に使用した血液、血脳脊髄液、尿では血液が最も SFTSV ゲノム量が高く、ウイルスゲノムの検出という観点からも適したサンプルである。脳脊髄液に含まれる SFTSV ゲノムは、直接中枢神経組織で SFTSV が増幅した結果とは考えられず、血液の混入による可能性がある。

SFTSV は日本、中国で株間に明確な塩基配列の違いがあり、分離された SFTSV の解析の範囲で遺伝子交雑(か遺伝子再集合)は起きていないことが示唆された。日本株は、2 つの遺伝

子型に分類されることも明らかにされた。今後の詳細な解析が待たれる。

SFTS 患者の予後とウイルスゲノム量の関係が明らかにされつつある。今回の検討では、死亡例では回復例に比べてウイルスゲノム量(濃度)が高い傾向が示された。発症日時を合わせてウイルスゲノム量を死亡例と回復例で比較検討することで、より確実な結論を導くことが可能となる。更なる研究が必要である。

抗体検出系について、Huh7 細胞の溶解液を抗原とした ELISA は SFTSV に対する抗体を高感度に検出する検出系と考えられ、有用な実験室診断の 1 つが確立された。またこの ELISA は SFTS 軽症例の検出や無症候感染者の検出にも役立つものと考えられる。中和抗体価測定系は中和活性を明確に測定するのに有用であることが明らかにされた。現時点では、地方衛生研究所においてはいわゆる一般的な RT-PCR 法しか導入されていない。今後は地方衛生研究所においても抗体検査が実施できる体制を整備することが求められる。

病理学的解析を行った全ての症例においてリンパ節や脾臓などのリンパ系組織において SFTSV 抗原陽性細胞が見られ、それらの組織では芽球様細胞の浸潤と核崩壊産物を伴う壊死が見られ、SFTSV 感染との関連が強く示唆される。また、リンパ節や脾臓、骨髓には著明な血球貪食像が見られたが、血球貪食細胞が SFTSV 抗原陽性となることは少なく、ヒト体内における主なウイルスの増殖部位はリンパ節や脾臓などリンパ系組織に存在する芽球様細胞であると考えられた。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。

#### E. 結論

2012年以前のSFTS発生状況の把握と臨床データの収集を行った。

SFTSV感染患者は、その血中ウイルスゲノム量(濃度)が高い程予後不良であることが明らかとなった。

日本には土着のSFTSVが存在し、また中国株同様、日本株でも少なくともクラスターの異なる2系統が存在する可能性が示唆された。

遺伝子検出系および抗体検出系を複数構築した。

日本国内のSFTS剖検症例の検体を用いて形態学的検査と免疫組織化学法、パラフィン切片を用いた遺伝子検査を組み合わせたSFTSの病理学的検査法を確立した。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 論文発表

- 1) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. J

Infect Dis 209:816-827, 2014

- 2) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 森川茂, 西條政幸. 日本における重症熱性血小板減少症候群, ウイルス 63: 7-12, 2013
- 3) 下島昌幸, 西條政幸. ダニ媒介性新興感染症 SFTS. 実験医学 31:3047-3053, 2013
- 4) 西條政幸. Severe fever with thrombocytopenia syndrome. 感染症 43:210-216, 2013
- 5) 西條政幸. 血小板減少をきたす新しいダニ媒介性ウイルス感染症: SFTS. Medical Practice 30:1810-1812, 2013
- 6) 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. 皮膚病診療 35:822-826, 2013
- 7) 西條政幸. 日本で流行するダニ媒介性ウイルス感染症 SFTS とダニ媒介性脳炎. 医学のあゆみ 247:701-702, 2013
- 8) 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. Medical Technology 41:1275-1277, 2013
- 9) 谷英樹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS). 検査と技術 41: 1164-1167, 2013

#### 学会発表

- 1) 西條政幸, 高橋徹, 前田健, 水谷哲也, 大松勉, 吉河智城, 谷英樹, 福士秀悦, 下島昌幸, 福間藍子, 緒方もも子, 鈴木忠樹, 中島典子, 片野晴隆, 永田典代, 長谷川秀樹, 山岸拓也, 倉根一郎, 森川茂, 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された11名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸(2013,11)
- 2) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 宇田晶彦, 谷口怜, 福間藍子, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸, 西條政幸, 重症熱性血小板

- 減少症候群 (SFTS) の確定診断に使用されているコンベンショナル PCR の評価, 及びリアルタイム定量 PCR との比較, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013,11)
- 3) 福間藍子, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 下島昌幸, 森川茂, 前田健, 西條政幸, 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の血清学的診断法の開発, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013,11)
  - 4) 長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋徹, 鈴木忠樹, 片野晴隆, 中島典子, 福士秀悦, 下島昌幸, 前田健, 水谷哲也, 森川茂, 西條政幸. 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 5) 森川茂, 木村昌伸, 福士秀悦, 福間藍子, 加来義浩, 朴ウンシル, 谷英樹, 吉河智城, 井上智, 今岡浩一, 下島昌幸, 西條政幸, 前田健. SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 6) 谷口怜, 福士秀悦, Masangkay Joseoh, 渡辺俊平, 大松勉, 下田宙, 前田健, 福間藍子, 吉河智城, 谷英樹, 下島昌幸, 西條政幸, 明石博臣, 吉川泰弘, 久和茂, 森川茂. フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 7) 宇田晶彦, 福士秀悦, 加来義浩, 吉河智城, 下島昌幸, 新倉綾, 井上智, 安藤秀二, 前田健, 西條政幸, 森川茂. マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 8) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 福間藍子, 谷口怜, 前田健, 高橋徹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 9) 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 福間藍子, 緒方もも子, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ナイジェリアにおけるリフトバレー熱の血清疫学. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 10) 谷英樹, 下島昌幸, 福間藍子, 谷口怜, 吉河智城, 福士秀悦, 森川茂, 前田健, 高橋徹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 11) 高橋徹, 前田健, 亀井敏昭, 水谷哲也, 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 森川茂, 長谷川秀樹, 中島典子, 鈴木忠樹, 永田典代, 片野晴隆, 山岸拓也, 大石和徳, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の日本における初症例. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
  - 12) Shimojima M, Takahashi T, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Morikawa S, Saijo M. Severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. XV International Conference on Negative Strand Viruses, Granada, Spain, June 16-21, 2013
  - 13) 高橋徹, 石堂亜希, 重岡徹, 富永貴元, 亀井敏昭, 前田健, 西條政幸, 森川茂, 長谷川秀樹, 水谷哲也. 本法における重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の初発例. 第 108 回日本内科学会中国地方会例会, 2013 年 6 月, 岡山

- 14) 坂口翔太, 平塚雄聡, 西條政幸, 岡山昭彦. 保存血清により診断された重症熱性血小板減少症候群(SFTS). 第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 2013 年 11 月, 大阪
- 15) 末盛浩一郎, 東太地, 村上雄一, 長谷川均, 四宮博人, 西條政幸, 安川正貴. 救命しえた重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の 1 例. 第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 2013 年 11 月, 大阪
- 16) 谷岡大輔, 西條政幸, 守分正. 日本で初めて患者に付着していたタカサゴキラマダニおよび血清から SFTS ウイルスが分離された SFTS の 1 例. 第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 2013 年 11 月, 大阪
- 17) 前田健, 高橋徹, 奥田優, 水谷哲也, 山岸拓也, 森川茂, 下島昌幸, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS) ウイルスの分離・同定. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013.9.20~22, 岐阜大学
- 18) 森川茂, 木村昌伸, 福士秀悦, 加来義浩, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 井上智, 今岡浩一, 柳井徳磨, 下島昌幸, 西條政幸, 前田健. 動物の SFTS ウイルス抗体調査. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013.9.20~22, 岐阜大学
- 19) Nguyen Dung, 下田宙, 濱崎千菜美, 寺田農, 野口慧多, 鋤田流星, 高野愛, 森川茂, 前田健. 飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスと交差する抗体の検出. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013.9.20~22, 岐阜大学
- 20) 谷口怜, 福士秀悦, Joseph Masangkay, 渡辺俊平, 大松勉, 下田宙, 前田健, 下島昌幸, 西條政幸, 明石博臣, 吉川泰弘, 久和茂, 森川茂. フィリピンのコウモリからの SFTS ウイルスと交差する抗体の検出. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013.9.20~22, 岐阜大学
- 21) 宇田晶彦, 福士秀悦, 加来義浩, 吉河智城, 下島昌幸, 新倉綾, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 前田健, 藤田博己, 澤邊京子, 西條政幸, 森川茂. マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013.9.20~22, 岐阜大学

表 1. SFTS の症例定義(H25.1.30 厚生労働省健康局結核感染症課長通知より)

- 
1. 38 度以上の発熱
  2. 消化器症状(嘔気, 嘔吐, 腹痛, 下痢, 下血のいずれか)
  3. 血小板減少(10 万 / mm<sup>3</sup> 未満)
  4. 白血球減少(4000 / mm<sup>3</sup> 未満)
  5. 血清酵素(AST, ALT, LDH のいずれも)の上昇
  6. 他の感染症によること又は他の病因が明らか場合を除く
  7. 集中治療を要する, 若しくは要した, 又は死亡した
-

表 2. 後方視的に SFTS と診断された患者の臨床症状と検査成績

カテゴリー	臨床症状および検査指標	各臨床症状カテゴリーの中の分類	陽性/陰性/不明(n=11)	
臨床症状	発熱		11/0/0	
	全身症状	全身倦怠感	11/0/0	
		筋肉痛	2/5/4	
		関節痛	1/6/4	
		頭痛	6/4/1	
	消化管症状		11/0/0	
		吐気	9/2/0	
		嘔吐	6/5/0	
		腹痛	6/5/0	
		下痢	7/4/0	
		食欲不振・低下	11/0/0	
	呼吸器症状		3/8/0	
		咽頭痛	2/9/0	
		咳	1/10/0	
	神経症状		10/1/0	
		失語	3/8/0	
		意識障害	8/3/0	
	出血症状	けいれん	6/5/0	
			9/2/0	
		吐血	1/10/0	
紫斑		3/8/0		
血性下痢		4/7/0		
歯肉出血		5/6/0		
鼻出血		0/11/0		
生殖器出血		0/11/0		
リンパ節腫脹		5/6/0		
検査所見	末梢血液検査	白血球減少	Number (%)	
		血小板減少	11 (100%)	
	生化学検査	総蛋白質濃度(低蛋白濃度< 6.0 mg/dL)	3 (27%)	
		アルブミン低下 (低アルブミン血症 < 3.0 mg/dL)	9%	
		AST (>30 IU/L)	11 (100%)	
		ALT (>30 IU/L)	11 (100%)	
		LDH (>250 IU/L)	11 (100%)	
		CK (>200 IU/L)	11 (100%)	
		BUN (>20 mg/dL)	7 (64%)	
		CRE (>1 mg/dL)	7 (64%)	
		炎症性パラメーター	CRP (>1 mg/dL)	3 (27%)
		尿検査	血尿	9 (90%)*
	蛋白尿		10 (100%)*	
	凝固系		凝固系検査†	11 (100%)
	血球貪食症候群 関連検査	骨髓検査	血球貪食像	5 (100%)‡
		フェリチン値の異常高値	8 (100%) §	
発症 2 週間前ま でのマダニ咬傷 の有無			2 (18%)	

\*:10 人の解析

†: DIC の指標として , Prothrombin time , activated partial thromboplastin time , antithrombin-3, fibrinogen, D-dimer, and fibrinogen degradation products のこれらの濃度を測定した .

‡: 患者 5 人における解析

§ : 患者 8 人における解析

表 3. 間接蛍光抗体法 (IFA) により陽性を呈した SFTS 疑い患者血清とその抗体価 . 数値は IFA で陽性を呈していた血清の希釈限界 (抗体価) を示す . SFTSV 感染細胞と SFTSV NP 発現細胞を用いた IFA は , ほぼ同程度検出可能であった . また一部の検体では IgM 抗体も検出された .

検体	IgG		IgM	
	感染細胞	NP 発現細胞	感染細胞	NP 発現細胞
A	10,240	>5,120	-	-
B	>5,120	1,280	>80	ND
C	2,560	1,280	-	-
D	2,560	2,560	40	20
E	2,560	320	-	-
F	2,560	-	40	ND
G	1,280	1,280	-	-
H	1,280	1,280	-	-
I	640	160	-	-
J	640	640	-	-
K	320	160	-	-
L	320	160	-	-
M	160	160	-	-
N	160	320	-	-
O	160	40	80	40
P	80	ND	20	ND
Q	80	80	-	-

表 4. 剖検がなされた患者 (ID 番号: NIID13-05) の各組織における SFTSV 遺伝子の定量的検査. 2 種類のパライマー・プローブセットを比較した。

検体の種類	組織	RNA 濃度 (ng/ul)	OD260/280	SFTSV(CHN)*	SFTSV(JPN1)**	Beta-actin	SFTSV/cell (Copy / cell***)	IHC
FFPE	右腋窩リンパ節	55.82	1.77	1.89E+03	2.22E+06	2.01E+05	1.66E+04	+
FFPE	骨髄	66.79	1.4	UDL	2.23E+02	1.01E+03	3.30E+02	+
FFPE	脾臓	149	1.57	UDL	4.66E+02	3.46E+04	2.02E+01	+
FFPE	大腸	17.16	1.71	UDL	8.40E+01	3.68E+04	3.42E+00	-
FFPE	腎臓	84.71	1.64	UDL	5.62E+01	5.83E+04	1.45E+00	-
FFPE	肝臓	61.09	1.58	UDL	3.31E+02	3.92E+04	1.27E+01	+
FFPE	肺	110.36	1.61	UDL	6.18E+01	5.49E+04	1.69E+00	-
FFPE	小腸	30.23	1.7	UDL	2.84E+02	4.75E+04	8.96E+00	-
FFPE	心臓	32.73	1.36	UDL	3.82E+01	9.07E+03	6.32E+00	-
FFPE	大動脈	22.97	1.28	UDL	2.83E+01	3.26E+04	1.30E+00	-
FFPE	腸筋	11.24	1.56	1.09E+00	2.93E+02	7.64E+05	5.75E-01	-
FFPE	副腎	29.98	1.78	3.46E+00	5.30E+02	6.28E+05	1.27E+00	+
FFPE	右頸部リンパ節	127.19	1.74	2.67E+03	9.98E+05	1.78E+05	8.41E+03	+
FFPE	小腸	22.09	1.6	1.18E+00	1.88E+02	2.84E+05	9.92E-01	-
FFPE	肝門部リンパ節1	72.12	1.83	2.06E+00	3.14E+02	3.13E+05	1.50E+00	-
FFPE	肝門部リンパ節2	54.37	1.83	1.54E+00	1.63E+02	6.88E+05	3.56E-01	-
FFPE	胸骨	47	1.47	2.52E-02	7.14E+01	9.02E+03	1.19E+01	+
FFPE	肋骨	10.52	1.56	4.36E-02	7.20E+00	6.20E+03	1.74E+00	+
FFPE	右腋窩リンパ節	72.91	1.55	3.20E+02	1.25E+05	2.98E+04	6.29E+03	+
FFPE	肝門部リンパ節	91.19	1.62	UDL	5.25E+01	2.69E+04	2.92E+00	-
FFPE	右心室	12.44	1.1	UDL	1.05E+01	1.25E+03	1.26E+01	-
FFPE	左心室、左心耳	26.52	1.25	UDL	5.94E+00	1.91E+03	4.67E+00	-
FFPE	肝臓	46.23	1.27	UDL	2.40E+02	1.97E+03	1.83E+02	+
FFPE	腎盂	53.3	1.38	UDL	3.28E+01	4.81E+03	1.02E+01	-
FFPE	腎臓	71.15	1.43	UDL	8.48E+01	2.77E+03	4.59E+01	-
FFPE	気管 分岐部リンパ節	97.63	1.53	UDL	2.11E+01	2.56E+04	1.24E+00	-
FFPE	気管支肺門部リンパ節	107.87	1.54	UDL	3.25E+01	3.01E+04	1.62E+00	-
FFPE	胃体部	25.23	1.33	UDL	4.22E+00	5.63E+03	1.13E+00	-
FFPE	胃幽門部 潰瘍	34.8	1.43	UDL	1.28E+01	1.00E+04	1.91E+00	-
FFPE	大腸、小腸	35.77	1.44	UDL	1.39E+01	9.81E+03	2.12E+00	-
FFPE	腸間膜	92.04	1.5	UDL	1.40E+01	1.38E+04	1.52E+00	-
FFPE	脾臓	78.79	1.41	UDL	5.93E+02	1.86E+03	4.79E+02	+
FFPE	左肺下葉 (鬱血部位)	87.68	1.49	UDL	1.14E+01	3.05E+04	5.63E-01	-
FFPE	右肺下葉	124.94	1.49	UDL	1.09E+01	2.30E+04	7.09E-01	-

\*中国株に至適化したプライマー、プローブセット

\*\*日本株に至適化したプライマー、プローブセット

\*\*\*b-actin が 1.5 x10<sup>3</sup> copies/cell としたときの、細胞あたりのウイルスコピー数

UDL: Under detection limit

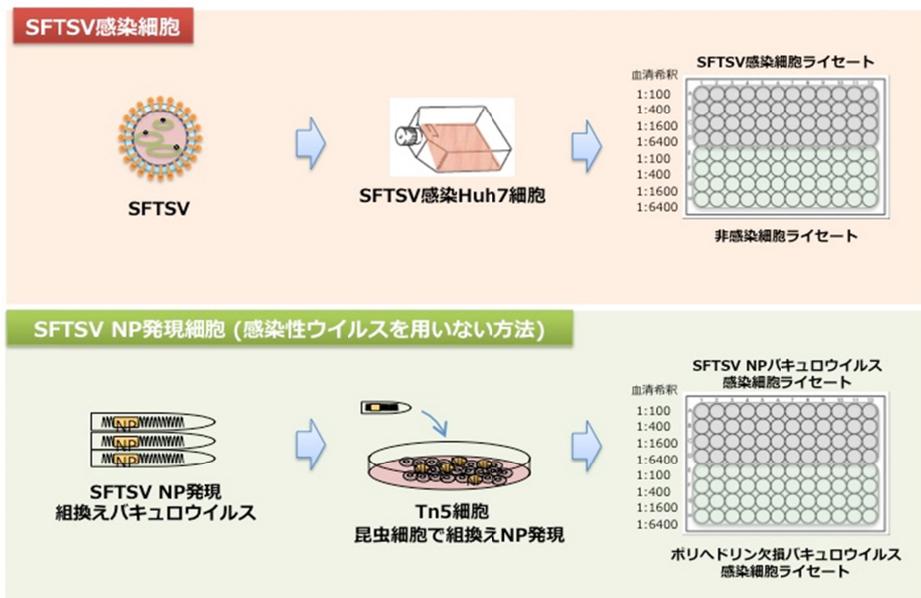


図 1. SFTSV 感染細胞 (上段) および組換え SFTSV 各蛋白質抗原 (下段) としての ELISA 法の概要 .

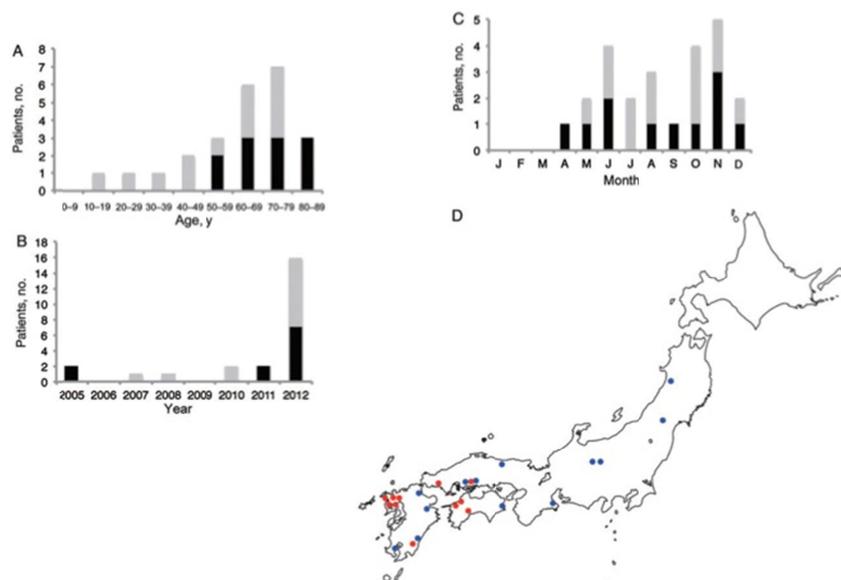


図 2. 後方視的に SFTS と診断された患者 11 名の年齢 (A) , 発症年 (B) , 発症月 (C) , および , 患者発生地 (D, 赤点が SFTS 患者を , 青点が非 SFTS 患者を示す) .

【骨髓穿刺検査（腸骨）】

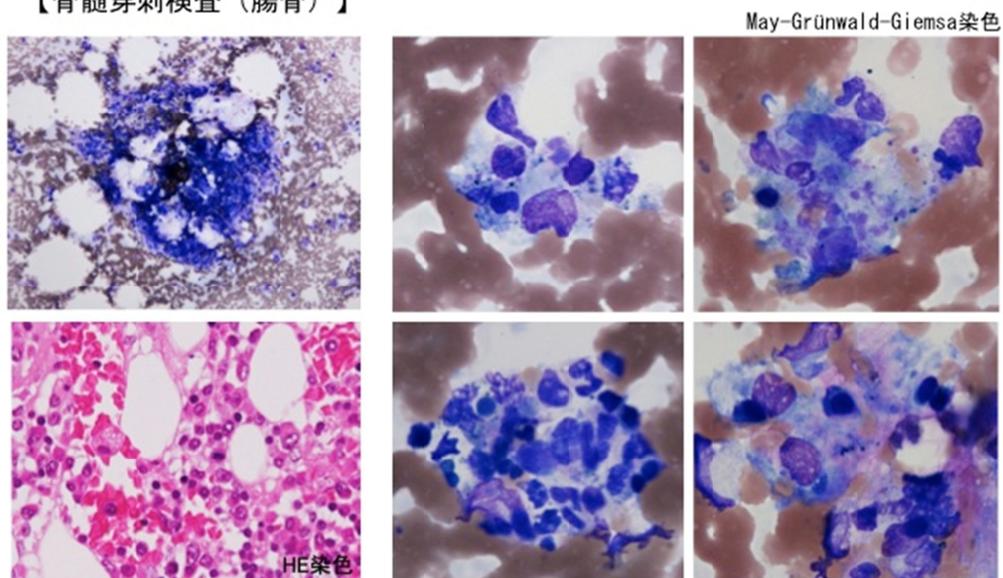


図3. 骨髓穿刺検査(腸骨)所見(May-Grünwald-Giemsa 染色). 骨髓は軽度低形成で, 芽球や異型細胞の骨髓浸潤はなかった. 巨核球も数的に保たれていた. 活性化した組織球と血球貪食細胞が明らかに増加し, 血球貪食像は顕著にみられ, 1個の組織球内に貪食された血球成分が極めて多いものも散見された.

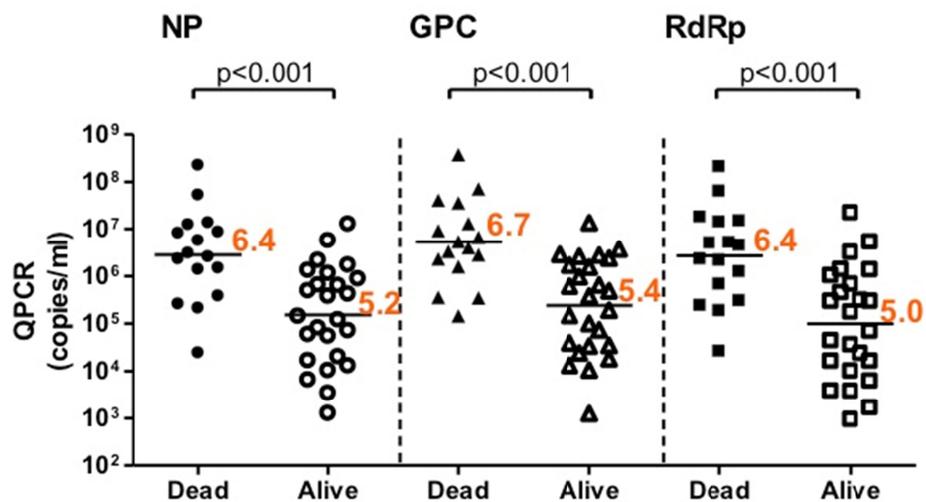


図4. SFTS 患者検体中のウイルスゲノム量の死亡例および回復例における比較. S-遺伝子(NP), M-遺伝子(GPC), L-遺伝子(RdRp)を標的とした定量的 RT-PCR により. 死亡例では回復例に比較してウイルスゲノム量が有意に高い.

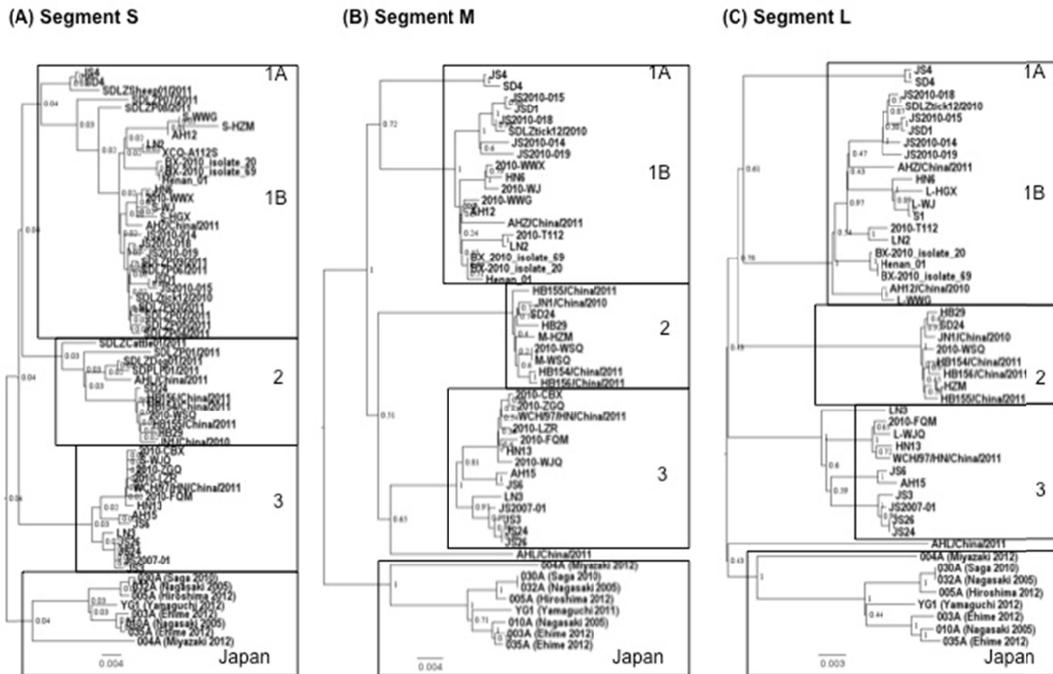


図5. SFTS ウイルスの系統樹解析. 中国株は遺伝子型1~3の3つの遺伝子型に、そして、日本株は1つのクラスターを形成する. 日本株の系統樹解析を詳しく解析すると、日本株は2つの遺伝子型(サブクラスター)を形成する.

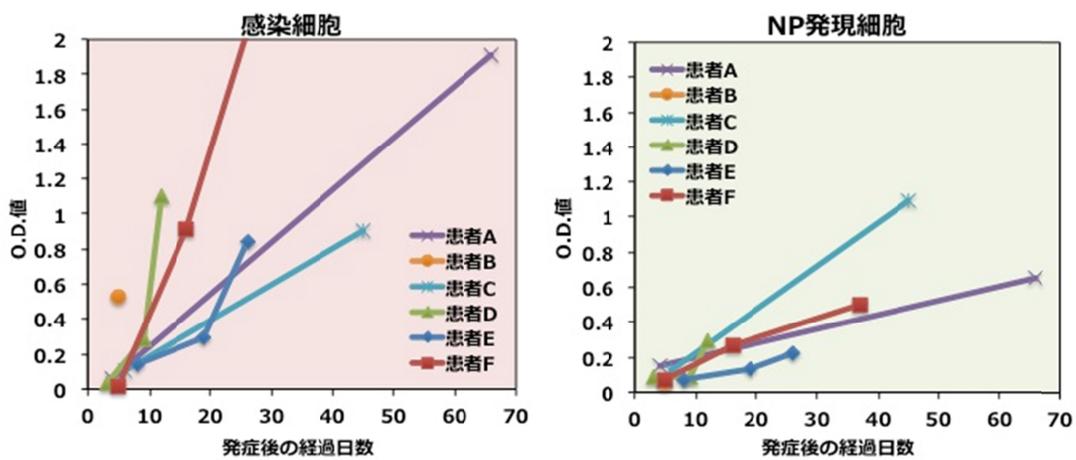


図6. 患者血清中のIgG抗体価の推移

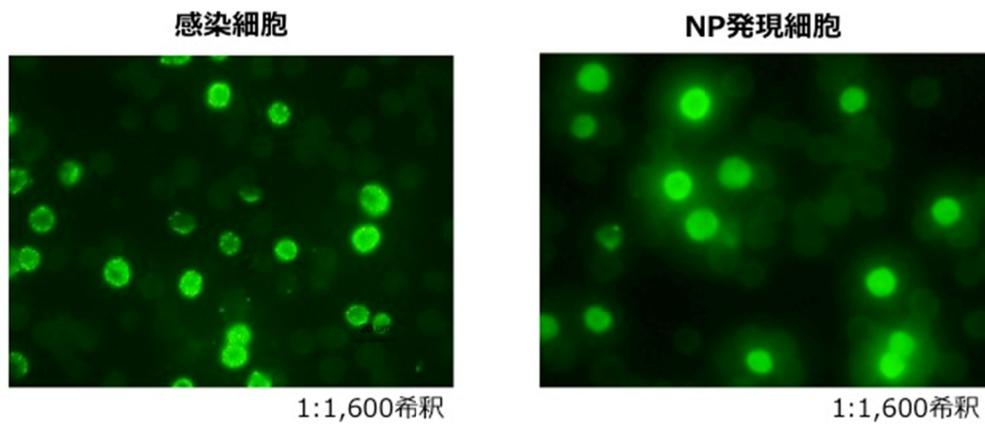


図7. 抗 SFTSV NP ウサギ血清を用いた NP 抗原の確認

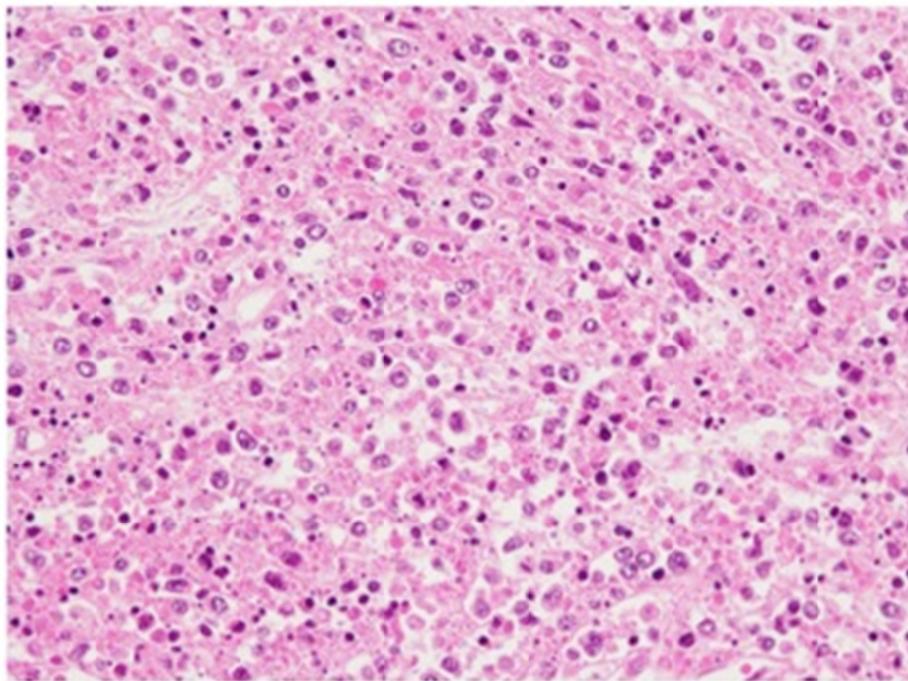


図8. SFTS 剖検症例リンパ節(NIID13-05). 核崩壊産物が目立つ壊死性リンパ節炎の所見.

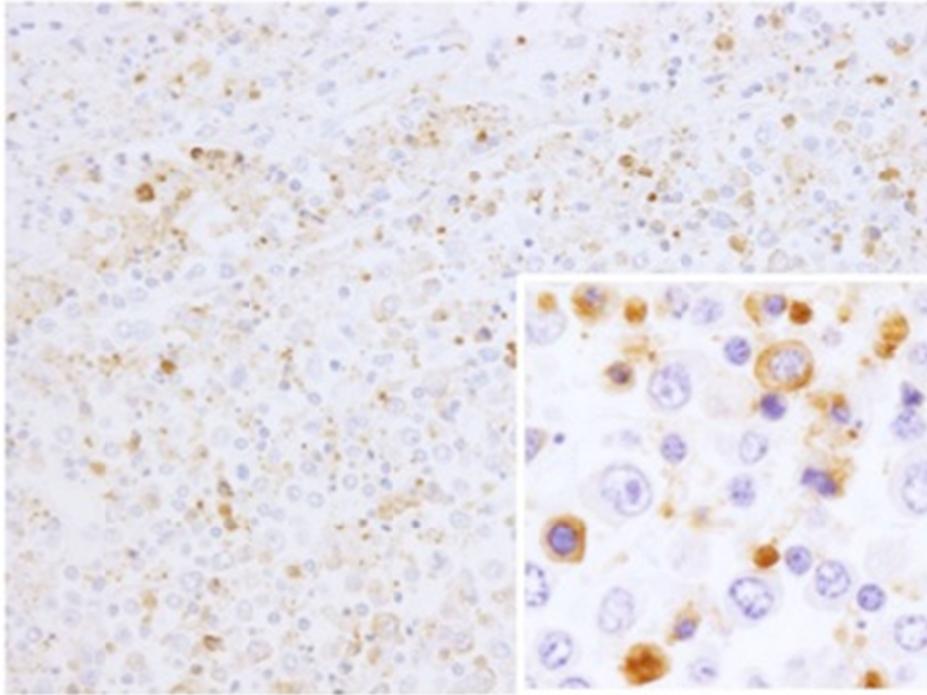


図 9 . SFTS 剖検症例リンパ節 (NIID13-05) の免疫組織化学 .  
リンパ芽球様細胞の細胞質に抗原が陽性となる .

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)

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)

日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明

研究分担者	森川茂	(国立感染症研究所獣医科学部)
研究協力者	澤邊京子	(国立感染症研究所獣医科学部)
	安藤秀二	(国立感染症研究所獣医科学部)
	川端寛樹	(国立感染症研究所獣医科学部)
	新倉綾	(国立感染症研究所獣医科学部)
	木村昌伸, 藤田修, 今岡浩一, 宇田晶彦, 加来義浩, 野口章	(国立感染症研究所獣医科学部)
	新井智	(国立感染症研究所感染症疫学センター)
	高田伸弘	(福井大学医学部)
	藤田博己	(馬原アカリ医学研究所)
	高野愛, 前田健	(山口大学共同獣医学部)
	岸本寿男	(岡山県環境保健センター)
	四宮博人	(愛媛県立衛生環境研究所)
	苅和宏明	(北海道大学獣医学部)
	有川二郎	(北海道大学医学部)
	澤洋文	(北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター)
	水谷哲也	(東京農工大学農学部)
	柳井徳磨	(岐阜大学獣医学部)
西園 晃	(大分大学医学部)	

研究要旨: SFTSV はマダニ媒介性であるため、ウイルスの生活環には吸血される動物が重要な役割を果たしている。そこで、日本の自然界における SFTSV の存在様式の解明とヒトへの感染リスクの評価を行うために、初年度は、1) 国内のマダニの調査を行い SFTSV の宿主・媒介マダニ種の同定とその分布を調査し、2) 各種動物の血清疫学を実施した。その結果、九州から北海道の 26 自治体において、植生マダニとシカ付着マダニ(18 種約 5,000 匹)を調査したところ、タカサゴキララマダニ、フタトゲチマダニ、キチマダニ、オオトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ等から、SFTSV 遺伝子が検出されたが、保有率は 5-20%程度とマダニの種類により違いがあった。調査したほとんどの自治体で SFTSV 遺伝子陽性マダニが見つかったことから、国内に広く分布していると考えられる。一方、シカは、調査した 27 自治体のうち 17 自治体で抗体陽性シカが確認され、SFTS 患者発生自治体では陽性率が高い傾向が見られた。イヌ(主に猟犬)は、調査した 19 自治体のうち 10 自治体で抗体陽性動物が確認され、イノシシは、調査した 15 自治体のうち 7 自治体で抗体陽性動物が確認された。また、ノウサギ(2004-2007 年に収集)は、調査した 4 自治体のうち 2 自治体で抗体陽性動物が確認された。北海道では、358 頭のエゾシカ、71 頭のイヌ、431 頭の齧歯類の全てが抗体陰性であった。大分県では、568 頭の飼育犬と 40 頭の放浪犬の抗体陽性率は、それぞれ 0.53、2.5%であった。近畿では多くの野生動物に抗体が検出された。

#### A. 研究目的

SFTS は、中国で 2009 年から中国で発熱、消化器症状、リンパ節腫脹、出血症状を主徴とする原因不明の感染症の流行があり、2011 年にブニヤウイルス科の SFTS ウイルス(SFTSV)が原因であることが明らかになった。中国では年間 1,000 症例以上の患者が発生している。SFTS はダニ媒介性ウイルス感染症で、致死率の高い新興ウイルス感染症であるが、2013 年 1 月に国内の SFTS 患者が確定診断されたのが初めてで、その後さかのぼり調査で 12 名、2013 年の 3 月以降の患者が 40 名確認されている。これらの患者は、九州、四国、中国、近畿地域の 13 県に集中している。一方、SFTSV はダニ媒介性であることから、自然界では、ダニと動物間で生活環を形成していると考えられるが、日本の自然界に

おける SFTSV の存在様式は、その分布、生活環に關与する動物など全く不明である。このため、ウイルス保有マダニの調査、各種動物での血清疫学等を実施して、自然界におけるダニと動物間での SFTSV の生活環を解明することを目的とする。初年度は、マダニからの高感度 SFTSV 遺伝子検出法の開発と全国のマダニからのウイルス遺伝子検出を行うこと、動物からの SFTSV 特異的抗体検出法の開発と野生動物や愛玩動物の調査を行った。

#### B. 研究方法

1) MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR の開発とマダニからの SFTS ウイルス遺伝子検出: 日本の SFTSV は分子系統学的に中国の SFTSV と異なり、中国で開発さ

れたリアルタイム RT-PCR は、使用するプライマー配列が日本のウイルス株と一致しないため、日本の SFTSV 株を効率よく検出できないと考えられた。そこで、日本の SFTSV 数株の塩基配列情報が得られた段階で、MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR を 10 通りデザインした。これらを、1) 遺伝子増幅効率、2) ダニ由来 RNA に対する非特異的増幅の有無、3) ダニ由来 RNA による増幅効率への影響を解析した。その結果、S-RNA の NP 遺伝子を標的とする MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR の 1 つが選択された。各地で捕獲されたマダニを、まずダニ種を同定した。成ダニは 1 匹毎、若ダニ、幼ダニは 5 匹ずつプールして IsogenII を用いて RNA を抽出した。これらの RNA の 1/10 を用いて、リアルタイム RT-PCR で SFTSV 遺伝子の検出を試みた。

- 2) 各種動物からの SFTSV 特異的抗体の検出法の確立と国内の野生動物、愛玩動物の血清疫学調査：SFTSV HB29(中国 CDC より分与)と YG1 株(国内初症例から分離された日本株)を各種細胞に感染させたところ、HB29 株の増殖が優っていたため、抗原調整には HB29 株を用いた。HB29 株感染細胞ライセート中の SFTSV 抗原価は抗 SFTSV-NP ウサギ血清を用いた ELISA で比較した(図 1)。その結果、Huh7 細胞ライセートが最も高い抗原価を示した(図 1)。そこで、ELISA 抗原には HB29 株感染 Huh7 細胞ライセートを用いた。Huh7 細胞に HB29 株を感染 3 日後に細胞を PBS で洗浄し、1% NP40/PBS で 10 分間可溶化したライセートを、チューブに移して短

波長 UV トランスイルミネータ上で 10 分間 UV 照射による不活化を行った。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 SFTSV 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 倍低い希釈で用いた。

間接蛍光抗体法(IF 法)は、HeLa W229 細胞を用いた。HeLa W229 細胞は SFTSV 感受性が低いため、感染後、細胞を 2 代継代した。2 代継代するとほぼ全細胞がウイルス抗原陽性となった。そこで、トリプシン処理、PBS 洗浄により浮遊化させた感染 HeLa W229 細胞と非感染 HeLa W229 細胞を 1:2 の比率で混合し、IF 法の抗原とした(図 2)。

(倫理面からの配慮について)

抗 SFTSV-NP ウサギ血清は、大臣確認実験として承認された遺伝子組み換え実験により作製された組換え精製 SFTSV-NP を、動物実験委員会により承認された実験によりウサギに免疫して作製した。その他の実験は該当しない。飼育犬においては飼育者の同意を得た上で採取された血清を用いた。

### C. 研究結果

- 1) MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR の開発：デザインした 10 種のリアルタイム RT-PCR のうち 1 つのリアルタイム RT-PCR が、1) 遺伝子検出が 10 コピー(1FFU)と高い、2) ダニ由来 RNA に対する非特異的増幅がない、3) ダニ由来 RNA による増幅効率への影響がなかった(図 3)。
- 2) 国内における SFTSV 保有マダニ種とウイル

ス保有率：九州から北海道にかけて、19 自治体において旗ざり法で採取した植生マダニとシカに付着しているマダニを調査した。調査したマダニは 18 種 1,645 検体 (3,802 匹) であった。その結果、複数のマダニ種 (タカサゴキラマダニ, フタトゲチマダニ, キチマダニ, オオトゲチマダニ, ヒゲナガチマダニ等) から、SFTSV 遺伝子が検出され、その保有率はマダニの種類により異なり 5~20% 程度であった (表 1)。このうち、SFTS 患者との関連が確認されているのは、タカサゴキラマダニ、フタトゲチマダニの 2 種である。

- 3) 国内における SFTSV 保有マダニの分布：九州から北海道にかけて、26 自治体において植生マダニとシカに付着しているマダニを調査した。調査したマダニは 18 種であった。その結果、SFTSV 保有マダニは、これまでに SFTS 患者が確認されている自治体 (宮崎, 鹿児島, 徳島, 愛媛, 高知, 岡山, 島根, 山口, 兵庫県) に加えて、SFTS 患者が報告されていない自治体 (三重, 滋賀, 京都, 和歌山, 福井, 山梨, 長野, 岐阜, 静岡, 栃木, 群馬, 岩手, 宮城県, 北海道) でも確認された (図 4)。一方、澤 (北大人獣共通感染症リサーチセンター) の調査では、北海道各地から採取した 273 匹、和歌山県からの 13 匹、山形県からの 19 匹の計 305 匹のマダニが全て SFTSV 遺伝子陰性であった。
- 4) ダニ中の SFTSV RNA の量：植生マダニにおける SFTSV RNA のコピー数は、 $10^2 \sim 10^3$  コピー/tick と低コピー数であった。一方、シカ付着マダニは、2013 年 12 月から 2014 年 1 月に捕獲されたシカに付着していた 1,001 匹

のマダニを調べた結果、438 匹が SFTSV 遺伝子陽性 (陽性率 43.9%) であった。また、最大で  $6 \times 10^6$  コピー/tick と高コピー数のマダニが認められた (表 2)。また、シカ付着マダニでは、同一動物に付着しているマダニの 70% が SFTSV 陽性と陽性率が非常に高いケースがあった (表 3)。

- 5) 国内の動物における SFTSV 抗体保有状況：2007 年から 2014 年に採取されたシカ血清中の SFTSV 抗体保有状況を調査した。その結果、調査した 27 自治体のうち、17 自治体 (福岡, 熊本, 宮崎, 鹿児島, 島根, 広島, 山口, 徳島, 愛媛, 三重, 京都, 兵庫, 滋賀, 和歌山, 長野, 静岡, 宮城県) で抗体陽性のシカが確認されたが、その他の 10 自治体 (大分, 高知, 岐阜, 山梨, 栃木, 群馬, 千葉, 岩手, 福島県, 北海道) では抗体陽性のシカは確認されなかった。ただし大分, 高知, 千葉, 福島県の 4 自治体では、それぞれ 3, 1, 5, 4 頭しか調査されていないため、現時点で抗体陽性シカの有無は判断できない。シカにおける SFTSV 抗体陽性率は、陽性シカが認められた自治体の平均は 31% であったが、自治体により陽性率は 0.9% から 90% と地域差が大きかった。SFTS 患者発生自治体では、平均で 39.2% のシカが抗体陽性あったのに対し、患者が発生していないが陽性シカが認められた自治体では、平均で 17.0% のシカが抗体陽性あり、患者発生自治体で抗体陽性率が高い傾向が認められた。なお、北海道のエゾシカは、研究協力者の苅和 (北大獣医) による調査でも、調査したエゾシカ 315 頭 (斜里町ウトロ 139 頭, 標津町 139 頭, 札幌 18 頭, 静内

19 頭を調査した結果、全てが抗体陰性であった。

イノシシは、2005年から2013年に採取された血清を調査した結果、調査した15自治体のうち、7自治(熊本、鹿児島、高知、愛媛、徳島、香川、広島県)で抗体陽性のイノシシが確認された。8自治体(宮崎、大分、島根、兵庫、三重、長野、静岡県、千葉県)では抗体陽性のイノシシは確認されなかった。ただし宮崎、大分、島根、兵庫、三重県では調査等数が少ないため、現時点で抗体陽性イノシシの有無は判断できない。

イヌは、2009年から2013年に採取された血清を調査した結果、調査した19自治体のうち、10自治(熊本、鹿児島、宮崎、高知、愛媛、徳島、香川、三重、岐阜、富山県)で抗体陽性のイヌが確認された。9自治体(沖縄、長崎、広島、滋賀、愛知、静岡県、長野、新潟県、北海道)では抗体陽性のイヌは確認されなかった。西園(大分大医学部)による大分県のイヌ(飼育犬568頭、放浪犬40頭)の調査では、飼育犬が3頭(0.53%)、放浪犬が1頭(2.5%)抗体陽性であった。

その他の動物では、四国、九州で2005年から2007年に採取されたノウサギで抗体陽性(陽性地域では17%)が確認された。前田(山口大学共同獣医学部)の調査では、近畿のアライグマ(103/1414, 7.3%)、タヌキ(24/434, 5.5%)、アナグマ(6/74, 8.0%)、ハクビシン(1/6, 17%)、ニホンザル(3/15, 20%)から抗体が検出された。また、有川(北大医学部)による北海道の齧歯類の調査では、調査した斜里、南富良野のエゾヤチネズミ、ミ

カドネズミ、ムクゲネズミ、ヒメネズミ、アカネズミ、トガリネズミ合計555匹の全てが抗体陰性であった。

#### D. 考察

日本のSFTS患者や患者に付着していたマダニから分離、検出されたSFTSVの遺伝子型は、中国の3遺伝子型と異なるため、中国で開発されたリアルタイムRT-PCRは適用できない。このため、マダニから効率よくSFTSV遺伝子を検出出来るリアルタイムRT-PCR法を開発した。本リアルタイムRT-PCR法ではMGBプローブを用いた。これにより、多くの自治体のマダニを調査した結果、調査した多くの自治体でSFTSV遺伝子陽性マダニが検出された。中国では媒介・宿主マダニは、フタトゲチマダニと言われているが、日本では少なくとも患者との関連が強く疑われるマダニはフタトゲチマダニとタカサゴキララマダニである。一方、SFTSV遺伝子保有マダニ種は、タカサゴキララマダニ、フタトゲチマダニ、キチマダニ、オオトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ等と少なくとも複数種のマダニがSFTSVを保有していることが強く示唆された。また、植生ダニと比較してシカ付着ダニでは、ウイルス遺伝子保有率が高く、遺伝子コピー数も非常に高いマダニがいることがわかった。このことから、シカなどの動物に多くのマダニが吸血することにより水平感染する可能性がある。また、吸血することによりマダニでSFTSVが増殖してSFTSV遺伝子コピー数が増加する可能性がある。これらの証明にはより詳細な解析が必要である。一方、動物の抗体保有状況を調査した結果、シカなどではSFTS患者発生地域で抗体陽性率が高い傾向

があったことから、動物の血清疫学調査の成績は患者発生のリスクを評価するのに有用である可能性がある。ただし、患者発生県でもシカなどの抗体陽性率が非常に低い県があったことから、複数種の動物の血清疫学的調査が重要である。北海道では、SFTSV 遺伝子陽性マダニが検出されたが、多くの動物種で抗体が全て陰性であったことから、SFTSV 保有マダニが稀にしかいないか、限局した地域にのみ分布する可能性がある。いずれにしても SFTS 患者発生自治体と比較すると患者発生リスクは低いと考えられる。一方、多くの野生動物が抗体を保有していたことから、SFTSV は多くの動物に感染することがわかった。今後、マダニと動物の調査を継続することにより、ある自治体での患者発生リスクが上昇するのかなどを明らかにしたい。

謝辞: 本研究には、研究協力者以外にも多くの自治体、大学、大日本猟友会、結核感染症課の皆様にご多大な御協力をいただくことにより実施できました。ここに謝意を表します。

#### E. 結論

SFTSV はマダニ媒介性であるため、ウイルスの生活環には吸血される動物が重要な役割を果たしている。そこで国内の SFTS ウイルスの宿主・媒介マダニ種の同定とその分布と各種動物での抗体保有状況を調べた。その結果、九州から北海道の 26 自治体において、タカサゴキラマダニ、フタトゲチマダニ、キチマダニ、オオトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ等から、SFTSV 遺伝子が検出された。調査したほとんどの自治体で SFTSV 遺伝子陽性マダニが見つかったことから、

国内にウイルスが広く分布していると考えられる。一方、動物ではシカが抗体陽性率が高く、SFTS 患者発生自治体では陽性率が高い傾向が見られた。その他、イヌや多くの野生動物で抗体が検出されたことから、SFTS ウイルスは自然界でシカやその他の多くの動物とマダニで生活環を形成していると考えられた。

#### F. 健康危険情報

中国で罔動物を於いた実験や、動物への感染実験から感染はしても発症する動物は確認されていない。また、動物や動物の血液などとの接触で感染し発症した例は報告されていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis* 209(6):816-27, 2014

- 2) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 森川茂, 西條政幸. 日本における重症熱性血小板減少症候群, ウイルス 63: 7-12, 2013
- 3) 森川茂: 重症熱性血小板減少症候群, 獣疫学雑誌 17(2)142-143, 2014
2. 学会発表
- 1) 前田健, 高橋徹, 奥田優, 水谷哲也, 山岸拓也, 森川茂, 下島昌幸, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの分離・同定. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013.9)
- 2) 森川茂, 木村昌伸, 福士秀悦, 加来義浩, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 井上智, 今岡浩一, 柳井徳磨, 下島昌幸, 西條政幸, 前田健. 動物の SFTS ウイルス抗体調査. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013.9)
- 3) Nguyen Dung, 下田宙, 濱崎千菜美, 寺田農, 野口慧多, 鎌田流星, 高野愛, 森川茂, 前田健. 飼育犬から重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスと交差する抗体の検出. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013.9)
- 4) 谷口怜, 福士秀悦, Joseph Masangkay, 渡辺俊平, 大松勉, 下田宙, 前田健, 下島昌幸, 西條政幸, 明石博臣, 吉川泰弘, 久和茂, 森川茂. フィリピンのコウモリからの SFTS ウイルスと交差する抗体の検出. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013.9)
- 5) 宇田晶彦, 福士秀悦, 加来義浩, 吉河智城, 下島昌幸, 新倉綾, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 前田健, 藤田博己, 澤邊京子, 西條政幸, 森川茂. マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013.9)
- 6) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 宇田晶彦, 谷口怜, 福間藍子, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の確定診断に使用されているコンベンショナル PCR の評価, 及びリアルタイム定量 PCR との比較. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 7) 福間藍子, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 下島昌幸, 森川茂, 前田健, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の血清学的診断法の開発. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 8) 西條政幸, 高橋徹, 前田健, 水谷哲也, 大松勉, 吉河智城, 谷英樹, 福士秀悦, 下島昌幸, 福間藍子, 緒方もも子, 鈴木忠樹, 中島典子, 片野晴隆, 永田典代, 長谷川秀樹, 山岸拓也, 倉根一郎, 森川茂. 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 9) 森川茂, 木村昌伸, 福士秀悦, 福間藍子, 加来義浩, 朴ウンシル, 谷英樹, 吉河智城, 井上智, 今岡浩一, 下島昌幸, 西條政幸, 前田健. SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 10) 谷口怜, 福士秀悦, Joseph Masangkay, 渡辺俊平, 大松勉, 下田宙, 前田健, 福間藍子, 吉河智城, 谷英樹, 下島昌幸, 西條政幸, 明石博臣, 吉川泰弘, 久和茂, 森川茂. フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症

- 候群ウイルスに反応する抗体の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 11) 宇田晶彦, 福士秀悦, 加来義浩, 吉河智城, 下島昌幸, 新倉綾, 井上智, 安藤秀二, 前田健, 西條政幸, 森川茂. マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 12) 谷英樹, 下島昌幸, 福間藍子, 谷口怜, 吉河智城, 福士秀悦, 森川茂, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 13) 高橋徹, 亀井敏昭, 前田健, 水谷哲也, 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 森川茂, 長谷川秀樹, 中島典子, 鈴木忠樹, 永田典代, 片野晴隆, 山岸拓也, 大石和徳, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の日本における初症例. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 14) 前田健, 濱崎千菜美, 久保翔太郎, 遠藤泰之, 寺田農, 楢田流星, 高野愛, 下田宙, 森川茂. 国内飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスに対する抗体の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 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

表1. 国内の植生マダニにおける SFTS ウイルス陽性ダニ種

ダニ種*		検査結果			国内分布*	宿主*
学名	和名	陽性数	検体数	陽性率		
<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	85	421	20.20%	北海～奄美大島	ヒト、犬中哺乳類、鳥
<i>Haemaphysalis megapinosa</i>	オオトゲチマダニ大	72	357	20.17%	北海～奄美大島	ヒト、大型哺乳類
<i>Amblyomma testudinarium</i>	タカサゴキララマダニ	10	66	15.15%	関東～西日本	ヒト、哺乳類、鳥
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	フタトゲチマダニ島	45	350	12.86%	北海～屋久	ヒト、犬中哺乳類、鳥
<i>Haemaphysalis kitaokai</i>	ヒゲナガチマダニ南	18	170	10.60%	東北～西日	猪、犬 鹿 鹿
<i>Haemaphysalis hystricis</i>	ヤマアラシチマダニ	6	79	7.60%	西 四国～南西島	ヒト、犬中哺乳類
<i>Haemaphysalis formosensis</i>	タカサゴチマダニ	4	66	6.10%	鹿 四国～南西島	猪、犬 鹿 鹿
	小計	240	1609	15.90%		
	そ(同定含む)	7	136	5.15%		
	計	247	1645	15.00%		

\*病原ダニ図譜より

(注:成ダニは1匹ずつ,若ダニと幼ダニは5匹プールしたものを検体とした)

表 2. シカ付着マダニでの SFTS ウイルス遺伝子検出

ダニ種*		SFTSV陽性数	マダニ数	平均コピー数 /ダニ	最大コピー数 /ダニ
学名	和名				
<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	83	188	7.8E+04	5.7E+06
<i>Haemaphysalis japonica</i>	ヤマトチマダニ	2	7	1.3E+03	2.4E+03
<i>Haemaphysalis kitaokai</i>	ヒゲナガチマダニ	29	100	6.6E+03	1.1E+05
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	321	687	9.0E+03	5.1E+05
その他		4	19	1.5E+04	4.0E+04
総計		439	1001		

表 3. シカ付着マダニからの SFTS ウイルス検出例

(同一シカに付着しているマダニの SFTS ウイルス遺伝子陽性率が高い場合があった)

地域	抗体	ダニ種・学名	ダニ種・和名	ステージ	飽血	陽・陰	陽性率	コピー数/ダニ
東北	陽性	<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ			+		980
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ			+		28,100
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ			+		1,330
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		11,900
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+	6/9	767
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			-	( 67%)	
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		708
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph		-		
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			-		
東北	陽性	<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			-		
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		3,300
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		1,560
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		979
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			-		
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		1,450
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			-	10/14	
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			-	( 71%)	
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		618
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		3,360
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		1,670
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		4,530
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		12,100
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ			+		2,650		
中部	陰性	<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ			+		2,980
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ			+		2,280
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ			-		
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph		+		610
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph		-	7/10	
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph		+	( 70%)	1,220
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph		-		
		<i>Haemaphysalis megaspinosa</i>	オオトゲチマダニ	nymph		+		2,800
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ			+		1,780
		<i>Haemaphysalis flava</i>	キチマダニ	nymph		+		603

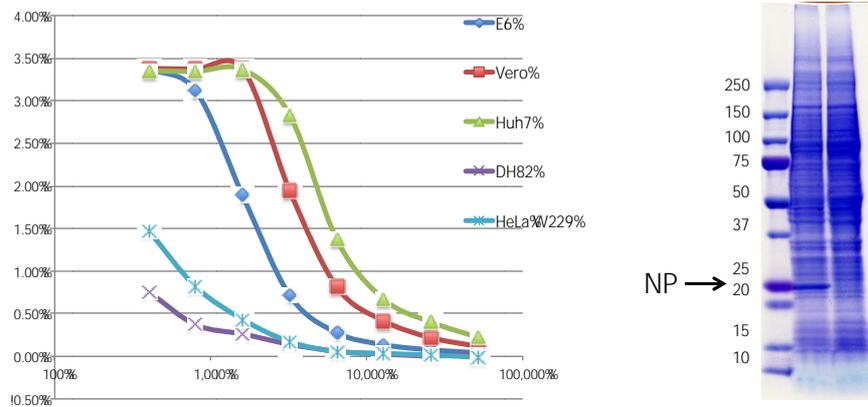


図1. 各種 SFTS ウイルス感染細胞での SFTS ウイルス抗原レベル . Huh7 細胞での SFTS ウイルス抗原量が最も高かった . SDS-PAGE ではライセート中の SFTSV-NP が CBB-R で染色されるほど高発現であった .

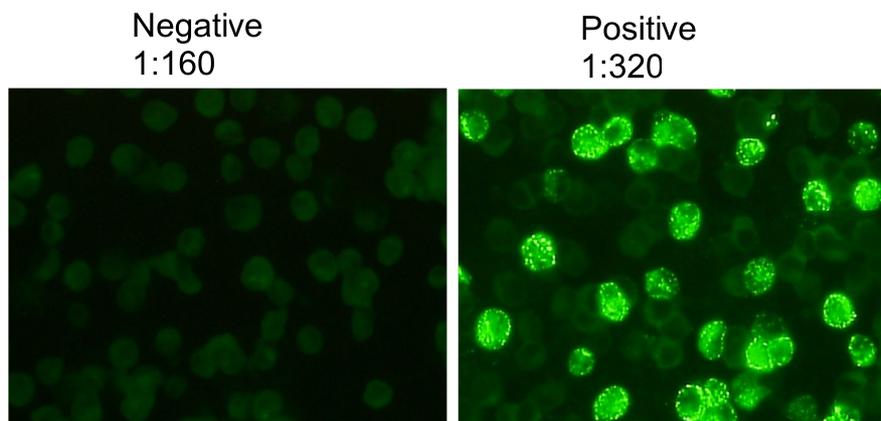
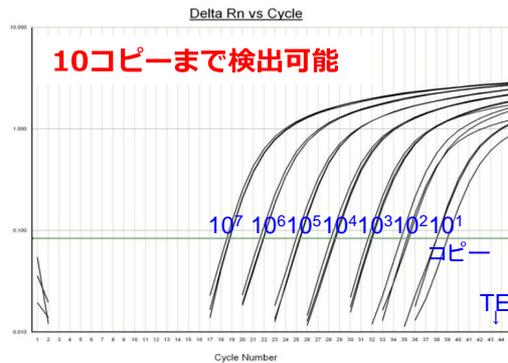


図2. 間接蛍光抗体法(IF 法) . HeLa W229 細胞を用いた IF 法 . 抗体陽性血清では , 細胞質内に顆粒状に染色される特異像が観察される .

陽性コントロール用のプラスミドを用いた検出限界の測定



リアルタイム RT-PCR 法におけるダニ RNA の影響

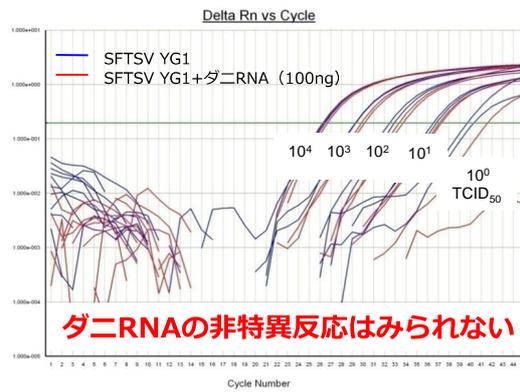


図 3. MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR の開発



図 4. SFTS ウイルス陽性マダニの国内分布。  
(陽性マダニが確認された自治体が赤, 未調査等が白)

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)

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 ウイルスの感染機構・増殖機構・病原性の解明研究

研究分担者	有川 二郎	北海道大学医学研究科微生物学講座
研究協力者	谷 英樹	国立感染症研究所ウイルス第一部
	福士 秀悦	国立感染症研究所ウイルス第一部
	下島 昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
	安田 二郎	長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野
	鈴木 忠樹	国立感染症研究所感染病理部
	西園 晃	大分大学医学部微生物学講座
	山田 健太郎	大分大学医学部微生物学講座
	澤 洋文	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
	吉松 組子	北海道大学医学研究科微生物学講座

研究要旨 SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性に関する研究の推進を目的とし、1) シュードタイプ SFTSV の作製とそれを用いた感受性細胞や吸着や侵入過程に関する研究、2) SFTS 症例の病理学的解析、3) 抗 SFTSV 薬の検討、4) SFTSV 感染の肝細胞病原性に関する研究、5) 抗 SFTSV 単クローン抗体の作製、についての研究が実施された。

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 SFTS ウイルス(SFTSV)によって引き起こされる急性のウイルス感染症で、発熱、血小板減少、白血球減少、血中肝酵素の上昇等を主徴とする。2011 年に特定されたダニ媒介性の新興ウイルス感染症である。SFTS の診断、

治療及び予防対策の整備・構築が望まれているが、それらの研究遂行に重要な SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性に関する情報は未だ限られている。

以上の背景のもと、本分担研究では、表1に示す研究協力者と研究課題に基づき、SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性に関する研究の推進を目的として実施した。

シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の

解析: SFTSV の感染機構の解析を目的として、エンベロープ蛋白質遺伝子欠損水疱性口内炎ウイルス(VSV $\Delta$ G)に SFTSV のエンベロープ蛋白質(GP)を外装したシュードタイプウイルス(SFTSVpv)を作製し、各種解析を行った。

SFTS 症例の病理学的解析:新しい感染症である SFTS の病態形成機序を理解するためには、ヒト症例の病理学的解析が必要不可欠であるが、これまで日本国内のみならず世界各国からも全く SFTS の病理学解析の報告はなく SFTS の病理像については未だ不明である。本研究では日本国内で確認された SFTS の剖検例について形態学的検査と免疫組織化学法、パラフィン切片を用いた核酸検査を組み合わせた病理学的解析を行い、SFTS の病理像の一端を明らかにすることを目的とした。

抗 SFTSV 薬の検討:SFTS に対する有効なワクチン・治療薬はなく、現時点で治療法も確立されていない。そこで、現在既に他のウイルス感染症に対して臨床使用されているリバビリン、インターフェロン-a,更に研究協力者らが注目している細胞内酵素 S1P に対する低分子酵素活性阻害剤 (S1P 阻害剤, PF-429242)の SFTSV 複製に与える影響を検討し、抗 SFTSV 薬としての有用性を検討した。

SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性: SFTS は SFTSV 感染によって引き起こされ、発熱、血小板減少、血中肝酵素の上昇等の他に、重症例では血液凝固異常等が認められるが(Gai et al, J Infect Dis, 2012; Takahashi

et al, J Infect Dis, 2013),その病態形成機構については未解明である。通常、血液凝固には12種類の凝固因子が関与し、それらのほとんどが肝臓で産生される。SFTSV の C57/BL6 マウスへの実験感染では、非致死性で明らかな臨床症状は認められないものの、ウイルス RNA および病変が脾臓、肝臓、腎臓で認められている(Jin et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2012)。乳飲みマウスにおける感染は致死的で、肝臓において広範な壊死巣が認められている(Chen et al, J Gen Virol, 2012)。したがって、SFTSV 感染によって引き起こされる肝機能障害とそれに伴う血液凝固異常が、SFTS の病態形成に関係している可能性も考えられている(Zhang et al, Clin Infect Dis), 2012)。そこで本研究では、SFTSV 感染が肝細胞機能に与える影響について、培養肝細胞で検討することを目的とした。また研究を遂行するうえで必要となる、各ウイルス蛋白質に対する抗血清の作製も併せて行った。

Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用:本施設に設置されている real time RT-PCR 機器 (Applied Biosystems 社, StepOnePlus)を用いて SFTSV RNA を検出する系を構築すること。及び、構築した系を用いて、乳のみマウス脳内接種後の SFTSV RNA の検出を試みること。

抗 SFTSV 単クローン抗体の作製:SFTSV の GP に対するモノクローナル抗体を作成し、診断および治療への応用を試みる。

## B. 研究方法

### 1) シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の

解

SFTSV(中国株 HB29)の GP を発現するプラスミドを作製し,そのプラスミドを 293T 細胞に発現させ,抗 GP1 抗体を用いた間接蛍光抗体法にて細胞内局在を確認した.発現の確認後,SFTSVpv を作製した(図 2).比較対照として,同じブニヤウイルス科のリフトバレー熱ウイルス(RVFLV)の GP を外套したシュードタイプウイルス(RVFLVpv)およびラッサウイルスの GP を外套したシュードタイプウイルス(LASVpv),レトロウイルス科のマウス白血病ウイルス(MLV)の GP を外套したシュードタイプウイルス(MLVpv)も作製した.これらのシュードタイプウイルスを用いて各種哺乳動物細胞株への感染性を比較した.また,エンドサイトーシス阻害剤を用いて,シュードタイプウイルスおよび SFTSV の pH 依存的な細胞侵入機構を解析した.さらに,これらのウイルスを用いて SFTSV 感染患者血清中の中和活性価を検討した.C 型レクチン(DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECtin)発現細胞での SFTSVpv の感染性および SFTSV の増殖についても検討した.シュードタイプウイルスの感染はレポーターであるルシフェラーゼの活性を,SFTSV の感染は抗 NP 抗体を用いたフォーカスアッセイを指標とした.

## 2) SFTS 症例の病理学的解析

### a) 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)を用いてプロトコル通り免疫染色を実施した.

### b) 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 B-actin の検出を行った.

### 3) 抗 SFTSV 薬の検討

96 穴プレートに SW13 細胞(ヒト副腎皮質腺癌由来),293T 細胞(ヒト胎児腎由来),Huh-7 細胞(ヒト肝癌由来)を播種し,SFTSV (YG1 株)を moi=0.1 で感染させた.感染 2 時間後に DMSO(コントロール),リバビリン(100mM),インターフェロン- $\gamma$  ( $1 \times 10^3$  unit/ml),S1P 阻害剤(30mM),またはそれぞれの組み合わせを含む培地に置き換え,更に 48 時間培養した.S1P 阻害剤処理に

においては最終濃度 50mM となるようコレステロールを添加したもの及びしないものを用意した。これらの培養上清を 96 穴プレートに播種しておいた VeroE6 細胞に感染させ、感染 2 時間後に培地を新たな培地と交換した。更に 14 時間培養を続け、4%パラホルムアルデヒドにて細胞を固定した。固定細胞を抗 SFTSV NP 抗体を用いて標識した。2 次抗体に FITC 標識抗体を用い、蛍光顕微鏡にて N 発現細胞数を測定した。

- 4) SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性
  - a) SFTSV の調整: SFTSV 山口株を Vero E6 細胞にて増幅させ、同細胞にて抗 NP マウス血清を用いたフォーカス法により感染価 (FFU/ml) を測定した。
  - b) SFTSV 蛋白質発現プラスミドの構築: RT-PCR 法にて各遺伝子断片 (NP, NS, Gn, Gc, Gn/Gc) の増幅を行い、それぞれ真核細胞用発現プラスミド pCI vector (プロメガ社) に挿入しクローニングした。
  - c) プラスミド免疫法による抗血清の作製: 各プラスミドをそれぞれ ICR マウス (6 週齢, 雌) に 2 週間間隔にて 1 回あたり 50 µg で大腿筋に接種した。時々、尾部より部分採血を行い、間接蛍光抗体法およびウェスタンブロット法により、抗血清としての有用性を検証した。
  - d) SFTSV の Huh-7 細胞への感染と解析: SFTSV をヒト肝細胞癌由来 Huh-7 細胞に感染させ、経時的に培養上清および細胞を回収した。上清については感染価を測定し、細胞についてはウェスタンブロット法により各種蛋白質の発現について調べ

た。

- 5) Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用
  - a) SFTSV RNA を検出する系を基にして、real-time RT-PCR 機器 (Applied Biosystems 社, StepOnePlus) を用いて、SFTSV RNA の検出条件を検討した。国立感染症研究所の primer set に関しては、Takara 社 One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) を用いた。また今回作成した primer sets に関しては、Agilent 社 Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR master Mix, Invitrogen 社 Express One-step Superscript qRT-PCR kit 等を用いて検討した。PCR の条件はそれぞれの kit に応じて設定した。
  - b) NCBI の website から入手した SFTSV YG1 strain の segment S の配列を基に以下の primer sets を選択し作成した。SFTSV-S173F:(173-192bp) GAGACAGGT GGAGATGATTG SFTSV-S357R (338-357bp) ACAGGAGTGATTGAGAGCCT. Probe は MGB probe SFTSV-S2-317 MGB CTGGTTGAGAGGGCA (森川茂研究分担者) を使用した。
  - c) 機器は Applied Biosystems 社, StepOnePlus 及び、他の機種として Roche 社, Light Cycler, Bio-Rad CFX connect を用いた。
  - d) ダニは北海道各地 (273 検体), 和歌山 (13 検体), 山形 (19 検体) から採集した 305 検体を用いた。各検体から RNA を抽出して、

本研究で作成した real time RT-PCR の系で SFTSV の RNA の発現を検索した。

e) SFTSV(山口株)を生後2日目の Balb/c マウスに脳内接種し接種後10日目に各臓器を採集し、SFTSV の RNA の発現を検索した。

#### 6) 抗 SFTSV 単クローン抗体の作製

組換え SFTSV エンペロープタンパクのうち、保存的な領域2ヶ所、アジア型に固有の領域1カ所を選択し、大腸菌ベクターを用いて発現させ、これを抗原として作成する。北米株、中国、日本(YG1 株)のエンペロープ蛋白のアミノ酸配列の比較から、以下の部位 A, B, および C を選択した:A) 保存的な領域 198-380 aa; B) アジア型に固有の領域を含む 556-743 aa; C) 保存的な領域 789-966 aa. SFTSV YG1 株を感染させた VeroE6 細胞の総 RNA を抽出し、RT-PCR によって SFTSV の M segment の上記 A, B, および C をコードする領域を増幅した。

(倫理面からの配慮について)

「シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の解析」の研究で用いられた SFTSV 患者血清は行政検査依頼がなされたものを用いた。「SFTSV 症例の病理学的解析」の研究における病理検体を用いた 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)。「SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性」に関する研究における SFTSV の取扱いについては厚労省への届出のうえ、許認可された大分大学内 BSL3 実験室内に

で行った。プラスミド構築については、大分大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認(承認番号 25-5)を得て行われた。動物実験は大分大学動物実験委員会の承認(承認番号 P01001)を得て行われた。「Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用」研究で用いた SFTSV(山口株)は三種病原体として届け出を実施している。また、本研究は、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの微生物利用実験計画、特殊空調施設利用実験計画、さらに動物実験計画を提出し承認を受けている。

#### C. 研究成果

##### 1) シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の解析

a) SFTSV の GP は、感染細胞およびプラスミドで発現させた Vero 細胞の表面にはほとんど存在せず、小胞体もしくはゴルジ装置内、およびその周辺に局在した(図 1)。

b) 細胞表面に発現しない性質の GP であるために、シュードタイプウイルスの感染性は細胞表面に発現する種の GP を外套したものに比べて低いものの、RVFVpv と同程度の感染性を示した(図 2)。

c) 様々な哺乳動物細胞株で SFTSVpv の感染性を比較したところ、多くの細胞株に感受性を示した(図 3)。一方で、リンパ球系細胞(Raji, Jurkat, Molt4)にはほとんど感染性を示さなかった(図 3)。

d) パフィロマイシン A や塩化アンモニウムなどのエンドサイトーシス関連阻害剤処理により SFTSVpv の感染性および SFTSV の増殖は低下した(図 4)。RVFVpv でも同様の結

果となった。

- e) SFTS 回復患者血清によって SFTSVpv および SFTSV の感染は阻害されたが、VSVpv の感染は阻害されなかった(図 5)。
- f) C 型レクチン発現細胞では、DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECtin を発現する細胞全てにおいて、SFTSVpv の感受性および SFTSV の増殖がコントロールの細胞に比べて 100 倍以上増強した(図 6)。

## 2) SFTS 患者の病理学的解析(患者概要と病理所見)

50 歳代女性、40 の発熱、嘔吐、下痢(黒色便)により発症。明らかなダニ咬傷はなく、入院時血液検査所見では、白血球数( $400/\text{mm}^3$ )と血小板数( $8.9 \times 10^4/\text{mm}^3$ )が著明に減少していた。また、AST、ALT、LDH、CK の高値が認められた。血液凝固系の異常、フェリチンの著明な上昇も認められた。尿検査で血尿、蛋白尿が認められた。胸腹部単純 CT では右腋窩リンパ節腫大を認めた。骨髓穿刺検査により、マクロファージによる血球貪食像を伴う低形成髄の所見が認められた。その後四肢脱力および肉眼的血尿と多量の黒色便を認め、入院 3 日目に全身状態不良となり死亡した。入院中に採取された血液からウイルスが分離され、SFTSV と同定された。血清は ELISA、IF 法による SFTSV に対する抗体検査において陰性であった。右腋窩リンパ節は  $3.5 \times 2.0\text{cm}$  大に腫大しており、肝臓には脂肪変性が見られた。組織学的には、右腋窩リンパ節および右頸部リンパ節は正常な濾胞構造は消失しており、辺縁洞、皮質領域を中心として強い壊死と組織球、免疫芽球様細胞、

リンパ球などの浸潤が認められた。脾臓と骨髄には著明な血球貪食像、肝臓には小葉中心帯の肝細胞に軽度の大滴性脂肪沈着が見られた。抗 SFTSV NP 抗体を用いた免疫組織化学では、右腋窩リンパ節と右頸部リンパ節に細胞質が明瞭に染色される芽球様の抗原陽性細胞が多数見られた。骨髄、脾臓、肝臓、副腎にはリンパ節と同様の抗原陽性細胞がわずかに見られたが、それぞれの臓器実質細胞の感染は明らかではなかった。

## 3) 抗 SFTSV 薬の検討

SW13 細胞、293T 細胞、Huh-7 細胞のいずれにおいても効率良い SFTSV 増殖が観察された。Huh-7 細胞からのウイルス産生量は 293T 細胞の約 20 倍、SW13 細胞からのウイルス産生量は 293T 細胞の約 5 倍であった。

単独使用においては全ての細胞でリバビリン、インターフェロン- $\alpha$  とともに強い抗ウイルス効果を示した(感染性ウイルス産生を $\sim 5\%$ まで減少)。

S1P 阻害剤も全ての細胞において感染性ウイルス産生を 15-30%程度に減少させた。全ての細胞において、どの 2 剤併用もウイルス産生を劇的に減少させた(感染性ウイルス量 1%以下)。S1P 阻害剤処理 SFTSV 感染細胞においてコレステロール添加の有無はウイルス増殖に影響しなかった。

## 4) SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性

- a) 作製した抗血清の有用性の検証:各ウイルス蛋白質発現プラスミドをそれぞれマウスに接種することにより、各ウイルス蛋白質に対する抗血清の作製に成功した(図 7A)。特に、NP 発現プラスミドを接種したマウスでは、他

のプラスミド接種群に比べて抗体価が効率的に上昇し、フォーカス法によるウイルス感染価測定およびウェスタンブロット法による NP 蛋白質検出(図 7B)においても有用であることが確認された。

- b) SFTSV の感染が Huh-7 細胞における血液凝固因子の発現に与える影響: SFTSV は Huh-7 細胞に効率的に感染し、その培養上清中に、細胞変性効果を起こすことなく非常に多くの (Vero E6 細胞での測定で  $10^7$  FFU/ml 以上) 感染性ウイルス粒子を産生した(図 8A)。また、Huh-7 細胞内において、血液凝固因子の一つである組織因子(第 III 因子)の発現については感染細胞と非感染細胞の間に顕著な変化は認められなかったが、第 I 因子であるフィブリノゲンの発現については、その各サブユニット( E 鎖, 鎖, 鎖および 鎖)と想定されるシグナルの低下が感染細胞で認められた(図 8B)。また同様に、プロトロンビン(第 II 因子)の発現についても検討を行ったが、今回用いた抗体(abcam 社より入手)ではシグナルが検出されなかった。

#### 5) Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用

- a) Applied Biosystems StepOnePlus Instrument を用いて、今回作成した primer sets で条件検討した結果、Invitrogen の Express One-step Superscript qRT-PCR kit を用いた際に、感度、特異度とも良好な結果が得られた(plasmid 10 copy の CT と DW の区別が可能だった)。また他の機種においても同様の感度と特異度が得られた(図 9)。

- b) 北海道各地(273 検体)、和歌山(13 検体)、山形(19 検体)から採集した 305 検体を用いて、前述した real time RT-PCR を用いて検索した結果、これらの検体からは SFTSV の RNA は確認出来なかった。

- c) 上記の実験系を用いて脳内接種した乳のみマウスの各臓器の SFTSV RNA の検出を試みた結果、脳において SFTSV RNA は強く検出された。また、脳以外の肺、肝、脾、腎からも弱いシグナルが検出された(図 10)。

#### 6) 抗 SFTSV 単クローン抗体の作製

RT-PCR で得られた増幅断片は期待された分子量であった。これらの増幅断片をプラスミド pGEM-T にクローニングし塩基配列を解析した結果、増幅とクローニングが確認された。現在この断片の大腸菌ベクターでの発現を試みている。

## D. 考察

シュードタイプ SFTSV を用いる感染機構の解析: SFTSVpv は、RVFVpv と同様に様々な哺乳動物細胞に効率良く感染できることが明らかとなった。また、この感染は pH 依存的であることから、エンドゾームでの膜融合で感染が成立すると考えられる。さらに、SFTSVpv は SFTSV と同様に SFTS 回復患者血清で特異的に中和することが明らかとなり、中和試験への応用が期待できる。C 型レクチンは SFTSV の侵入の際の増強因子になりうると考えられる。DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECtin は樹状細胞やマクロファージ、リンパ節や肝類洞の内皮細胞に発現しており、SFTSV がこれらの細胞に感染しやすい可能性がある。

SFTS 症例の病理学的解析: 多数の SFTSV 抗原陽性細胞が見られた右腋窩リンパ節には広範な壊死を伴うリンパ節炎が見られ, SFTSV 感染との関連が強く示唆される. 脾臓や骨髄には著明な血球貪食像が見られたが SFTSV 抗原陽性細胞は少なく, ヒト体内における主なウイルスの増殖部位はリンパ節や脾臓などリンパ網内系組織であると考えられた. 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.

抗 SFTSV 薬の検討: リバビリン, インターフェロン- $\alpha$ , S1P 阻害剤の何れも細胞種によって抗 SFTSV 効果に差が見られたが, 2 剤もしくは 3 剤併用すると, 相加的効果が観察された. それぞれの抗ウイルス効果が異なること, また, リバビリン, インターフェロン- $\alpha$  は既に C 型肝炎治療目的で使用されていることから SFTS 感染患者へのこの 2 剤併用療法が有効であることが示唆された. S1P は脂質・コレステロール合成を制御する細胞性因子として知られているが, 本研究において S1P 阻害剤が SFTSV 増殖を抑制するものの S1P 阻害 + コレステロール添加が SFTSV 増殖を回復しなかったことから, SFTSV は S1P によって直接制御されている, もしくは S1P によって制御されるコレステロール・脂質以外の細胞性因子によって制御されているという 2 つの可能性が考えられる (図 11).

SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性: 今回, SFTSV 山口株の Huh-7 細胞への感染が, 細胞内のフィブリノゲンの発現低下をもたらすことを示唆する結果が得られた. 肝臓のフィブリノゲン

産生量の低下は易出血性につながり, SFTS における病態と矛盾しない. しかしながら, 今回使用した抗フィブリノゲン抗体は, 精製したヒトのフィブリノゲンを免疫原にして作製されたポリクローナル抗体であるため, この抗体により検出されたそれぞれのシグナルが本当にフィブリノゲンの各サブユニットに由来するののかについては疑いが残る. これについては, 各サブユニットに対する特異的抗体を用いて再検証する必要がある. また, 他の血液凝固因子やアルブミン等でも SFTSV 感染により培養肝細胞で発現が低下するのか確認する必要がある. さらに, このような SFTSV 感染による肝細胞機能の低下は, どのウイルス蛋白質の発現によりもたらされるのかについて発現プラスミドを用いて検証する必要がある.

Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用: 本研究において, Applied Biosystems 社, StepOnePlus 機器に適した Real time RT-PCR の系を構築した. この系を用いてダニからの SFTSV RNA の検出を試みたが現在の段階では陽性結果は得られていない. SFTSV を接種した乳のみマウスの脳内では, SFTSV は接種後少なくとも 10 日間は存在することが示唆された.

抗 SFTSV 単クローン抗体の作製: 今後, 作成した抗原をマウスに免疫し, 常法によりモノクローナル抗体を作成する. スクリーニングは SFTSV 感染 Vero 細胞を抗原とした間接蛍光抗体法によって実施し, さらに中和活性の測定, 合成ペプチドによるエピトープの特定を行うことにより, 特定の部位に結合するモノクローナル抗体を樹立する.

## E. 結論

SFTSVpv は今後 SFTSV の細胞侵入を解析する上で、より簡便に評価するツールになる。また、回復患者における中和抗体検出のための中和試験にも応用できることが明らかにされた。

日本国内で確認された SFTS 患者の剖検例について形態学的検査と免疫組織化学法、パラフィン切片を用いた核酸検査を組み合わせた病理学的解析を行い、SFTS の病理像の一端を明らかにした。

ヒト培養細胞において、リバビリン、インターフェロン- $\gamma$ 、S1P 阻害剤はそれぞれ SFTSV に対して抗ウイルス効果を示し、それぞれの併用は相加的抗ウイルス効果を示した。

SFTSV の感染はヒト肝細胞癌由来 Huh-7 細胞において血液凝固因子の一つであるフィブリノゲンの発現を低下させることが示唆された。また、今回作製した SFTSV の各ウイルス蛋白質に対する抗血清は、本研究課題の遂行において非常に有用であることが確認された。

Applied Biosystems 社、StepOnePlus 機器に適した Real time RT-PCR の系を構築し、疫学

研究および動物実験を実施した。

部位特異的な抗体を用いて、中和、レセプター結合、細胞融合等のエンベロープ蛋白の機能解析およびアジア型と北米型の鑑別、診断法の構築等数多くの応用が期待される。

## F. 健康危険情報

大分県健康対策課と共に、県内の SFTSV 侵淫状況の調査を飼育犬、放浪犬、野外植生ダニなどを対象に鋭意進行中である。これまで一部のイヌに抗体を保有している陽性例が確認されている。ただし、SFTS 患者発生は報告されていない。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
特になし
2. 学会発表  
特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 研究協力者と分担課題

研究協力者	所属	役割分担
谷英樹, 福土秀悦, 下島昌幸 鈴木忠樹 安田二郎 西園晃, 山田健太郎	国立感染症研究所ウイルス第1部 国立感染症研究所感染病理部 長崎大学熱帯医学研究所 大分大学医学部	SFTSV の感染機構の解析 SFTS 症例の病理学的解析 抗 SFTSV 薬の検討 SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性
澤洋文	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	Real-time RT-PCR 法の確立とダニおよび実験感染マウスへの応用
有川二郎, 吉松組子	北海道大学医学研究科	抗 SFTSV 単クローン抗体の作製

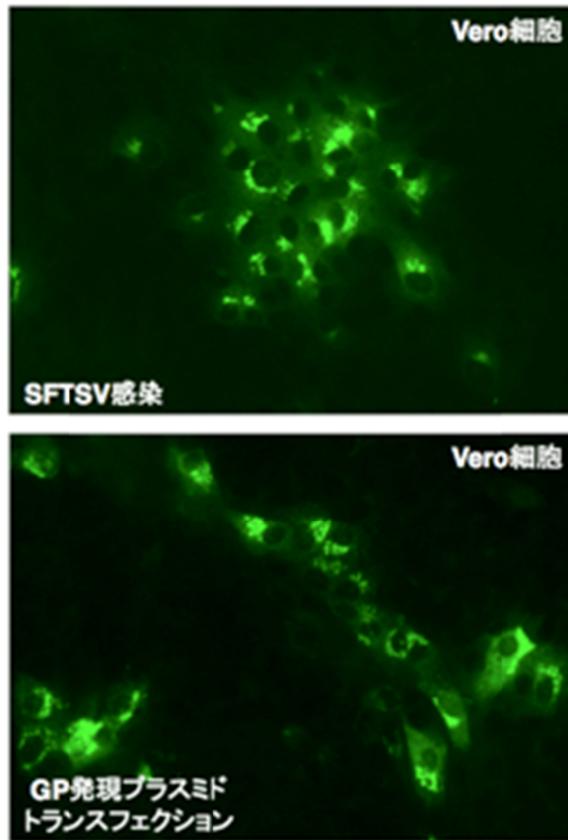


図 1. SFTSV-GP 蛋白質の細胞内局在

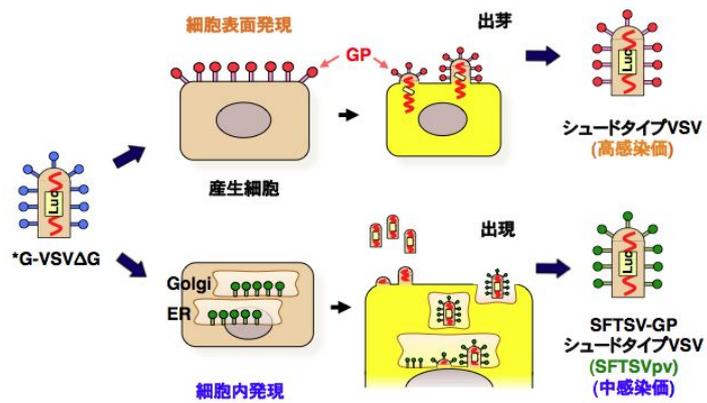


図 2. SFTSV-GP シュードタイプ VSV(SFTSVpv)

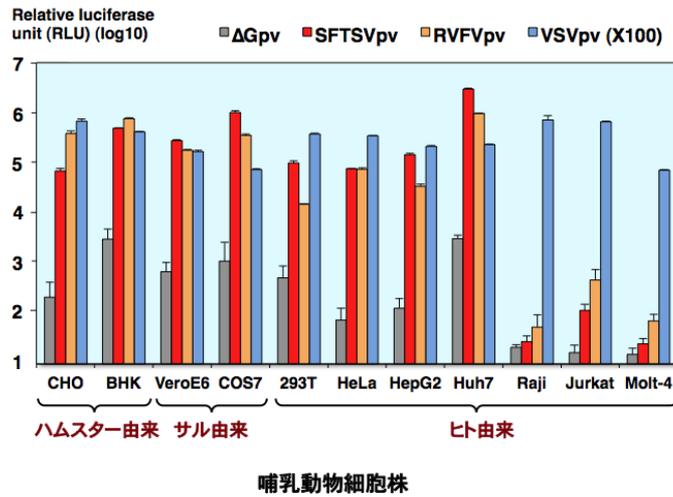


図 3. SFTSVpv の各種哺乳動物細胞への感染性

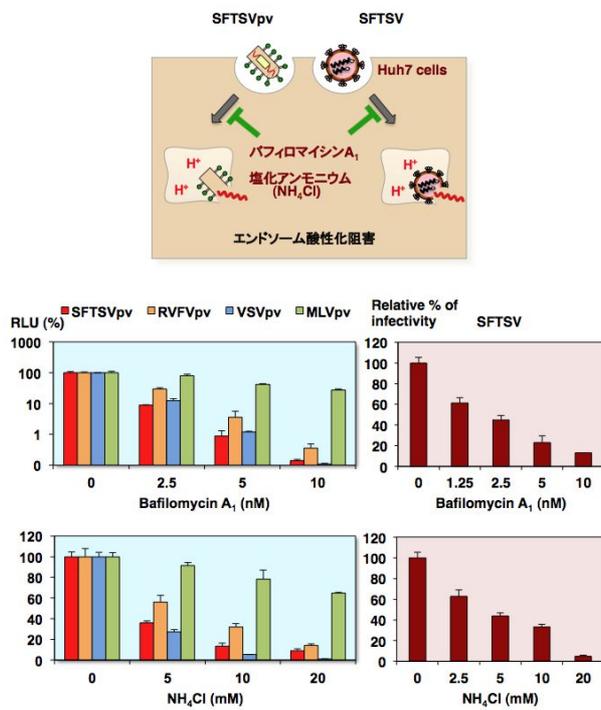


図 4. H<sup>+</sup>-ATPase 阻害剤による SFTSVpv および SFTSV の感染阻害

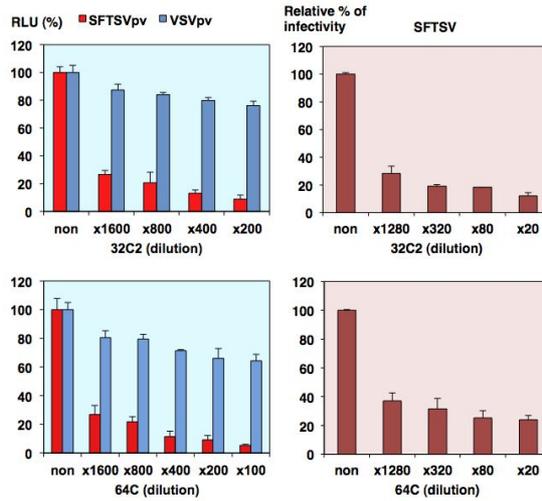
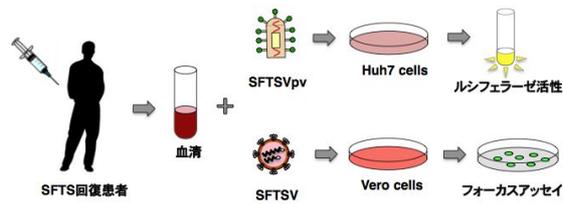


図 5. SFTS 回復期患者血清による SFTSVpv および SFTSV の感染中和

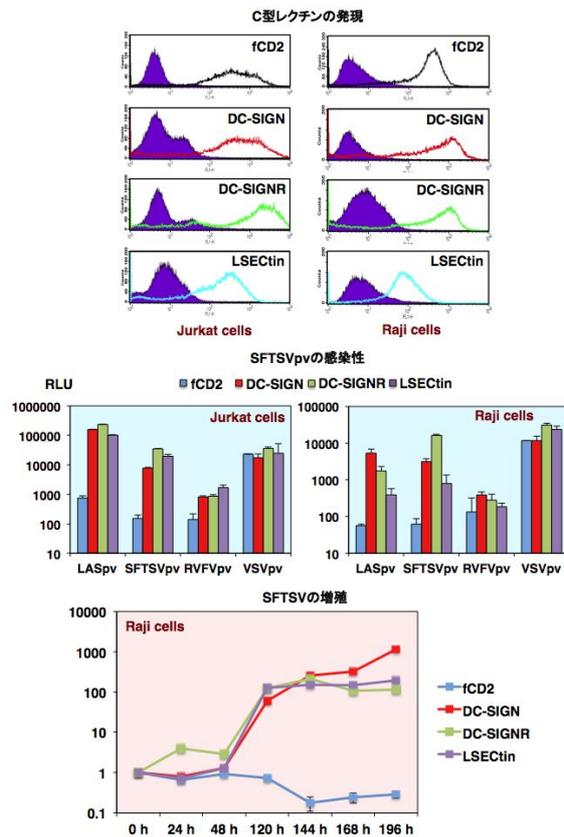


図 6. C 型レクチン発現細胞における SFTSVpv の感染性および SFTSV の増殖効果

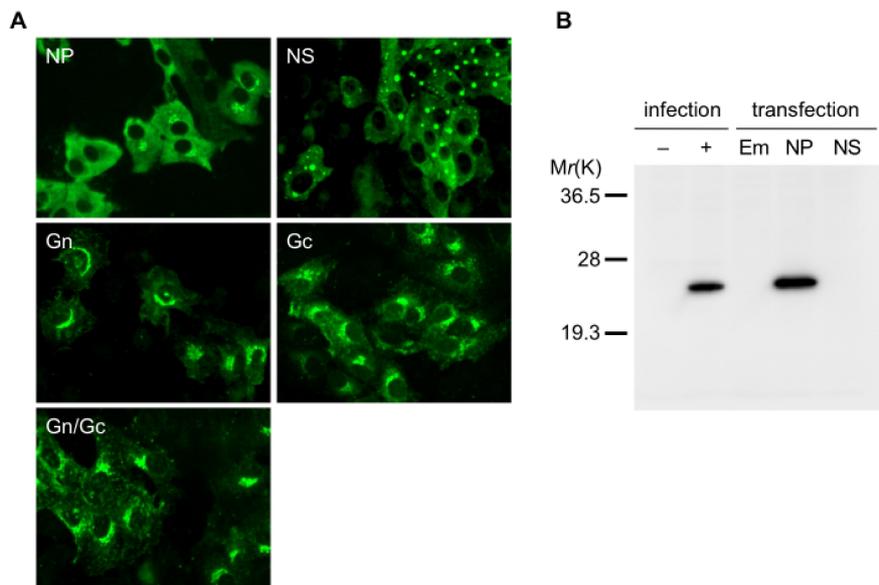


図 7. 各ウイルス蛋白質に対する抗血清の有用性の検証 . A) 間接蛍光抗体法により各抗血清の SFTSV 感染 Vero 細胞に対する反応性を検討した . 2 次抗体には Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Life Technologies) を使用した . B) ウェスタンブロット法による検出での抗 NP 血清の有用性について , SFTSV 感染 Vero E6 細胞および発現プラスミド導入 Vero E6 細胞を用いて検討した . 図中の Em は空 (Empty) ベクターの導入を示す .

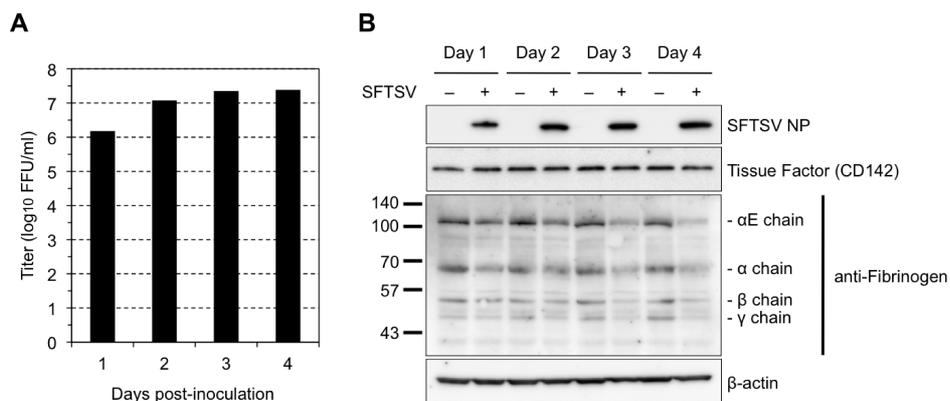


図 8. SFTSV の感染が Huh-7 細胞における血液凝固因子の発現に及ぼす影響 . SFTSV を Huh-7 細胞に multiplicity of infection (moi) 10 以上で接種し , 経時的に培養上清と細胞を回収した . A) 培養上清中のウイルス感染価については , Vero E6 細胞を用いてフォーカス法により測定した . B) 細胞については , ウェスタンブロット法により各種蛋白質の発現について検討した . 抗組織因子 (Tissue factor) 抗体は Bioss 社 , 抗フィブリノゲン抗体は abcam 社および抗  $\beta$ -actin 抗体は abm 社より入手した .

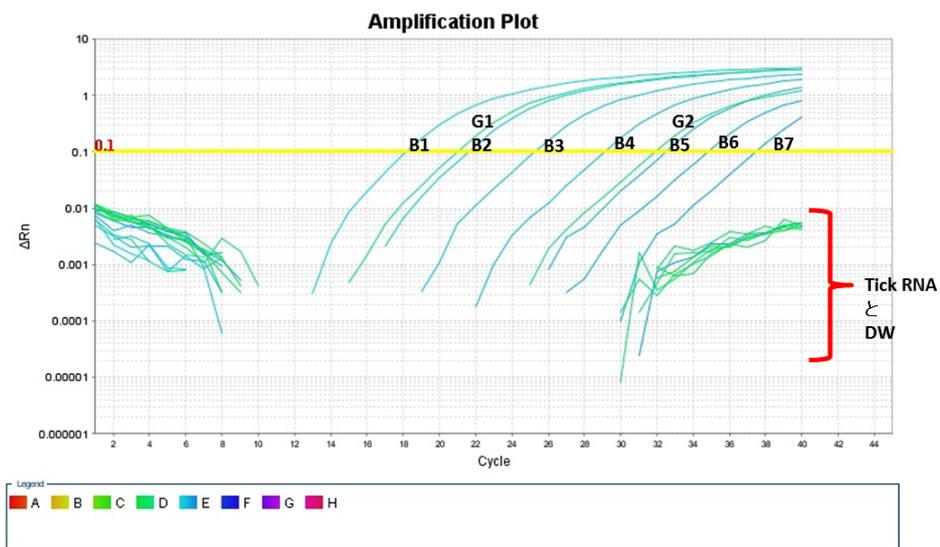


図 9. 作成した primer sets を用いて実施した real time RT-CR の結果 . (blue line: plasmid 希釈系列) B1=E7, B2=E6, B3=E5, B4=E4, B5=E3, B6=E2, B7=E1 , Green の line は tick RNA (#301-#305)と DW

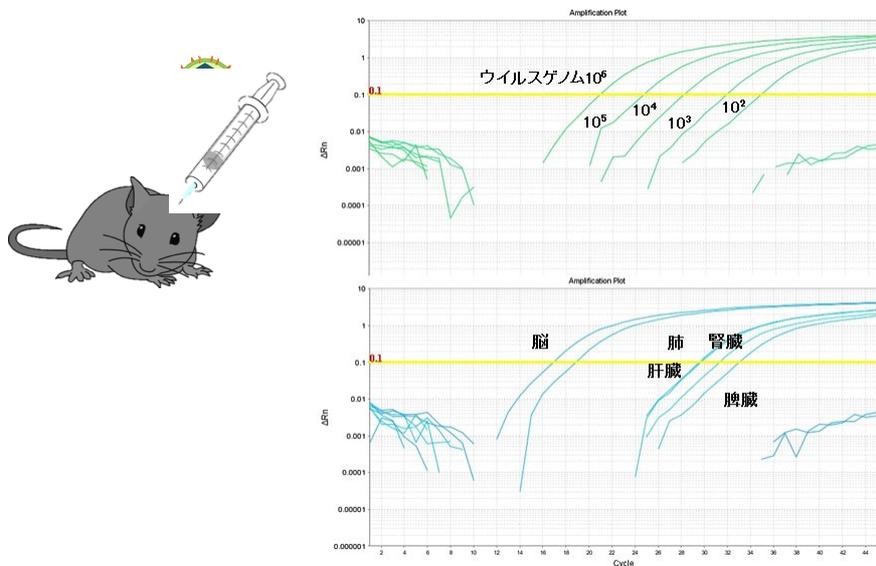


図 10. 生後 2 日の乳のみマウスに SFTSV を接種し, 10 日後に組織を採集して SFTSV RNA を検索 .

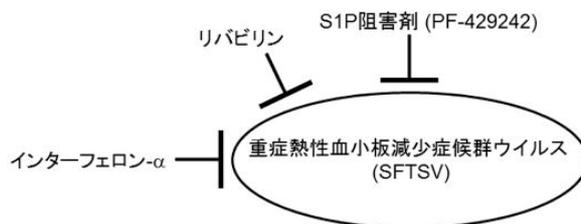


図 11. リバビリン, インターフェロン-, S1P 阻害剤は SFTSV 増殖を抑制する .

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)

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
研究協力者	泉川公一	長崎大学医歯薬学総合研究科
	吾郷昌信	長崎県環境保健研究センター
	堀尾政博	長崎大学熱帯医学研究所ミュージアム
	早坂大輔	長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野

研究要旨: 国立感染症研究所は、平成 25 年 1 月に我が国初のマダニ媒介性の重症熱性血小板減少症候群(SFTS)患者確認を公表した。長崎県では平成 17 年(2005 年)に 2 例の患者が発生していたことが確認され、平成 25 年にはあらたに 3 名の患者が発生した。このような状況下で、長崎県下でも SFTS に関する症状ならびに予防方法についてはメディア等でも取り上げられ、関心が高まっており、感染リスクを調査し効果的な予防対策を講じることが求められている。本分担研究では、SFTS 流行地域においてヒト、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。初年度は、1) 抗体検出系の安価な診断用抗原の開発と血清診断系の開発とそれを利用して、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、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開始した。現在までに得られた成果は以下の通りである。SFTS ウイルスの Nタンパク質を大腸菌で発現させた安価で大量生産に適する診断用抗原の開発、LAMP 法を用いた迅速遺伝子検出系が完成した。また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。患者急性期血清からは 5 例すべてウイルスが分離され、その遺伝子解析から県内においてウイルスは地域に土着し変化を続けていることが示唆された。動物の調査では野生のイノシシや患者発生地域で飼育されているイヌに抗体陽性(ELISA 抗体、中和抗体価ともに陽性)が確認された。またダニの調査では今の処、ウイルスは分離で来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。住民の意識調査については、調査項目を決定して実施予定である。

## 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。精製蛋白を 96 穴のマイクロプレートにコートして間接 ELISA 法にて IgG, IgM 検出系をヒト、イノシシ、イヌ、シカについて作成した。

### 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。また県内で発生した 5 名の患者については血清を Vero 細胞に接種しウイルス分離を実施した。分離されたウイルスは遺伝子塩基配列を解析した。

### 3) 動物における血清疫学調査

長崎県において 2006 年から 2012 年に捕獲されたイノシシの血清 276 検体、および 2013 年に長崎県福祉保健部が採取したイヌ血清 114 検体を上記組み換え抗原を用いた ELISA 法、およびウイルス中和法により解析した。ELISA 法ではイノシシ血清は 1:40、イヌ血清は 1:100 に希釈して使用した。中和抗体は focus-reduction assay を用いて測定した。

### 4) ダニ調査

5 月から 11 月にかけて長崎県各地(長崎市、諫早市、島原市、対馬市、五島市)でマダニを採集し種類を確認した。マダニ 1 - 30 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(4℃, 4,500rpm, 15sec)し、遠心後上清を回収した。回収液を Vero E6 細胞に接種し 5 - 6 日間培養後、上清をさらに別の Vero E6 細胞に接種しウイルス分離を試みた。また、回収液より RNA を抽出し、SFTSV L セグメントゲノムのポリメラーゼ蛋白領域を増幅するように設計した 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

土田昭司著 (2000)、酒井隆 (2004)、CDC (2013)の手法を参考にして、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を実施する。研究者が調査票を作成・インターネットへアップロードし調査会社の登録者を対象としてインターネット上で実施する。調査会社は登録会員に告知メールを送信し、定めた期間内に会員が Web 上で回答する。研究等の実施場所:長崎県内に住む住民を対象とする。質問紙調査(追跡調査を含む)は

上記の両地域における研究対象者の自宅において、また、FGD は、それぞれの地域の集会所において実施する。

(倫理面からの配慮について)

本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、長崎大学熱帯学研究所の倫理委員会の承認手続きを申請中である。

## C. 研究結果

### 1) 診断系の開発

SFTS ウイルスの N 蛋白質は大腸菌で可溶性抗原として多量に発現し、ニッケルカラムにて容易に精製でき安全な抗体検出抗原となった。対象抗原として同様な手法で発現させたリフトバレー熱ウイルスの Nタンパク質抗原を用いることで非特異的の反応を評価することができ、SFTS に特異的な抗体を判定することが可能となった。ヒトとイヌでは非特異反応は低く(表 1, 2)、イノシシでは高い傾向がみられた。ELISA 抗体価とウイルス中和抗体価はよく相関した。

### 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 138 人(男性 129 人, 女性 9 人), 平均年齢 48.6 歳の対象者について調査したところ, 抗体保有率は 0%であった。コントロール群については, 未調査で, 今後, 調査予定である。

県内で発生した 5 名の患者の急性期血清

からは, ウイルスが分離された。これらのウイルスの遺伝子解析から長崎のウイルスは中国の SFTS ウイルスとは異なる系統に属し, かつ長崎県という限られた範囲であっても, それぞれの地域で独自に変化をしていることが明らかとなった。

### 3) 動物における血清疫学調査

イノシシ調査について, 長崎県下全体では全捕獲頭数 276 頭のうち, S 値が 1.0 を超える値(1.0S)を示した個体は 27 頭 (9.8%), S 値の下限を 0.5 まで下げる(0.5S)と 58 頭 (21.0%) が陽性であった(表 3)。地区別では 6 地区のうち, 基準値を 1.0S にした場合, 陽性個体が認められたのは長崎市及び松浦市であった。陽性率は, それぞれ 20.2% (19/94), 17.0% (8/47)であった。基準値を 0.5S に下げると, さらに大村市及び新上五島町がこれらに加わった。それぞれの陽性率は, 長崎市 48.9% (46/94), 松浦市 19.1% (9/47), 大村市 25.0% (1/4), 新上五島町 2.1% (2/96)であった。江迎町(現在, 佐世保市と合併)及び対馬市で捕獲されたイノシシからは, 陽性個体は見出されなかった。

イヌの調査については, 県内の 3 地点で採取した飼育犬, 野犬 114 匹のうち 11 匹が ELISA 抗体陽性をしめし, ウイルス中和抗体も確認できた。

### 4) ダニ調査

長崎県において約 5000 匹のマダニを採集した。そのうち成虫についてはフタトゲチマダニ(70.6%), タカサゴチマダニ(10.2%), キチマダニ(0.92%), ヤマアラシチマダニ(2.23%), オオトゲチマダニ(0.26%), タカサゴキラマダニ

(0.52%), その他分類未同定のチマダニ属(15%)およびマダニ属(0.13%), 若虫についてはフタトゲチマダニ(36.1%), タカサゴチマダニ(10.4%), キチマダニ(0.53%), ヤマアラシチマダニ(0.61%), オオトゲチマダニ(1.64%), タカサゴキラマダニ(3.32%), その他分類未同定のチマダニ属(47.3%)およびマダニ属(0.08%)が採集された。採集されたマダニのうち, 1684 匹を 487 プールにわけて 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。また, 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

倫理委員会の承認が下り次第, 調査を開始して平成 29 年 3 月 31 日まで継続する予定である。うち質問紙調査は, 承認月の翌月から 3 年間に 2 回実施する予定である。

#### D. 考察

大腸菌で発現した SFTS ウイルスの N 蛋白質は安全な診断用抗原となったが, イヌでは少数の, イノシシでは多くの非特異反応が見られ, 対症抗原との対比によって SFTS 特異的反応を評価する必要があった。この非特異反応は抗原中に残存する大腸菌成分に対する抗体がイノシシ血清中に存在する可能性が示唆され, 今後はより純度の高い抗原精製法を利用することに加えて, 単クローン抗体を用いた IgM 補足 ELSIA 法の利用など今後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。今後,

環境中のダニの SFTS ウイルスの保有率を併せて解析していくことが望まれる。

長崎県に生息する SFTS ウイルスはそれぞれの地域に限局して維持されていることが, その遺伝子解析から明らかとなり, 今後のリスク管理や対策には感染リスクマップの作成が有用ではないかと思われる。

長崎県下で SFTS 患者発生数が最も多い長崎市およびその近郊地区で捕獲されたイノシシの抗体陽性率が最も高率であったことは, 極めて興味深い。また, 捕獲頭数は少ないものの陽性個体(0.5S)が見出された大村地区及び抗体陽性率が長崎市に次いで高率であった松浦市を含む県北地域から本年度患者発生が認められたことから, イノシシの抗体保有率と患者発生には少なからず関連性があるものと思われる。

イヌの陽性検体が検出された地域と患者発生地域には相関がみられたことは, ヒトへの SFTS 感染リスクを評価する指標として, イヌの抗体保有率も利用できる可能性を示唆していた。

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, さらに調査を進める。

#### E. 結論

大腸菌発現系を用いて安全な SFTS 血清診断

用抗原が出来た。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。長崎県下では地域的に限局して SFTS ウイルスが維持されていることが示された。イノシシ、イヌで SFTS 感染個体が確認できた。調査地域のマダニでは SFTS 陽性立は極めて低かった。地域住民の SFTS についての意識調査の為の準備を実施した。

F. 健康危険情報

長崎県内では野生動物(イノシシ), および飼育動物(イヌ)で SFTS 感染個体が確認され, 生活の場にちかく SFTS ウイルスが生息している可能性が高い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 森田公一, デング熱と vector-borne diseases (SFTS を含む), 化学療法の領域, Vol.29 (8): 25-32, 2013

2. 学会発表

- 1) 余福勲, Ferdinard Adungo, 内田玲麻, 井上真吾, 森田公一, Preparation of genetically-engineered antigen of RVF virus for development of antibody- detecting test kit. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸 (2013.11.10-12)
- 2) 早坂大輔, 森田公一, 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清診断法の確立および媒介マダニ調査. 九州微生物研究会, 福岡 (2013.12.6)
- 3) 泉川公一 他, 「SFTS の臨床像」, 第 9 回市中病院でみる世界の感染症, 東京 (2013.10.19)
- 4) 泉川公一 他, 「我が国で発生した SFTS の臨床と疫学研究」第 13 回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 東京, (2013.11.2)
- 5) 泉川公一 他, 「救命し得た SFTS virus による重症熱性血小板減少症候群の一例」, 第 61 回化療・56 回感染症中西日本合同学会, 大阪 (2013.11.6-8)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 大腸菌発現 SFTS-N 蛋白質を用いたヒト血清の IgG-ELISA

	STFS Antigen		Control Antigen		Serum dilution	Sample date	Sample	Result
	OD1	OD2	OD1	OD2				
A	0.17	0.18	0.13	0.13	200x	Apr26,2013		Negative
B	0.09	0.09	0.07	0.08	800x			Negative
C	2.30	2.34	0.15	0.15	200x	May15,2013		Positive
D	2.18	2.15	0.08	0.09	800x			Positive
E	2.06	1.91	0.14	0.16	200x	Dec13,2005	Confirmed patient	Positive
F	1.61	1.60	0.09	0.09	800x			Positive
G	2.30	2.35	0.08	0.09	800x	Apr2,2013		Positive
H	0.08	0.08	0.07	0.08	800x		Negative Control	Negative

表2. 大腸菌発現 SFTS-N 蛋白質を用いたヒト血清の IgM-ELISA

	SFTS Antigen		Control Antigen		Serum dilution	Sample date	Sample	Result
	OD1	OD2	OD1	OD2				
A	0.15	0.15	0.07	0.07	200x	Apr26,2013		Negative
B	0.09	0.09	0.08	0.08	800x			Negative
C	1.01	0.99	0.10	0.09	200x	May15,2013		Positive
D	0.43	0.41	0.08	0.08	800x			Positive
E	1.02	0.93	0.08	0.08	200x	Dec13,2005	Confirmed patient	Positive
F	0.45	0.44	0.07	0.07	800x			Positive
G	0.12	0.13	0.06	0.07	800x	Apr2,2013		Negative
H	0.08	0.08	0.07	0.06	800x		Negative Control	Negative

表3. 長崎県におけるイノシシの抗体SFTS抗体保有状況

捕獲年	捕獲頭数	OD値(SFTS-RVFV)		
		<0.5	0.5 - 1.0	>1.0
2006	4	4	0	0
2007	28	21	6	1
2008	49	48	1	0
2009	116	73	20	23
2010	39	37	1	1
2011	29	26	2	1
2012	16	14	1	1

イノシシ血清;40倍希釈

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)  
「SFTSの制圧に向けた総合的研究」班  
分担研究報告書

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

研究分担者	調 恒明	山口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 國吉香織 岸本寿男 木田浩司 四宮博人 菅美樹 福盛順子 御供田睦代	山口県環境保健センター 山口県環境保健センター 山口県環境保健センター 山口県環境保健センター 岡山県環境保健センター 岡山県環境保健センター 愛媛県立衛生環境研究所 愛媛県立衛生環境研究所 鹿児島県環境保健センター 鹿児島県環境保健センター

**研究要旨:**現在, SFTSの確定診断は地方衛生研究所においてconventional PCR法及びその増幅DNA断片の塩基配列決定によって実施されている. 本研究では, この検査法の検出感度を検証し, SFTSV感染症患者血清中のウイルスを検出するに十分であるかどうかを検討した. また, 国立感染症研究所ウイルス第1部において開発されたリアルタイムPCR法について検出感度を検討するとともに, conventional PCR法と比較した. その結果, リアルタイムPCR法は現在使用されているconventional PCR法と同等か, これより高感度である事が示された. 今後, 地方衛生研究所へのリアルタイムPCR法の普及を行うことにより検査体制を支援していく必要がある.

A. 研究目的

国立感染症研究所において開発されたSFTSV検出用のリアルタイムPCR法の検出感度を測定し, 地方衛生研究所において使用可能であることを示すことにより地方衛生研究所の検査の体制に貢献することを目的として研究を行った. また, 現在使用しているconventional PCR法の検出感度を測定し患者血清中のウイルス検出に十分な感度がある事を検証した.

B. 研究方法

国立感染症研究所で分離された SFTSV のうち, HB29, YG1, SPL053 の 3 株の RNA を段階希釈した. これを鋳型として conventional PCR 法により増幅し, マルチナ(島津株式会社)をもちいて

電気泳動を行いバンドが検出される最低濃度を求めた.

SFTSV 検出用のリアルタイム PCR 法のプロトコル, 試薬は国立感染症研究所ウイルス第 1 部より供与された. リアルタイム PCR 法では, multiplex PCR 法により, SFTSV の GP 遺伝子, NP 遺伝子を同時に検出する事が可能である. Conventional PCR 法の検出感度と同様にウイルス RNA を段階希釈し, リアルタイム PCR 法により検出感度を測定した. 山口県環境保健センターにおけるリアルタイム PCR は, Applied Biosystems 7500 Fast を用いて行った. 国立感染症研究所においては Roche Diagnostics の機器を用いて, 同一検体について濃度測定が行われており, これと比較した.

## C. 研究結果と考察

### 1. リアルタイム PCR 法と conventional PCR 法の検出感度

リアルタイム PCR 法による測定では、いずれの RNA についても 10 コピー程度の RNA が検出可能であった(表 1)。山口県環境保健センターと感染研の測定濃度はすべての検体についておおむね一致した。山口県環境保健センターにおける Conventional PCR 法とリアルタイム PCR 法の検出感度の比較では、同程度か、リアルタイム PCR 法がやや優れていた。当所では、Conventional PCR 法の泳動に島津社製のマルチナを用いており、通常のアガロースゲル電気泳動よりも検出感度が高いと考えられることから、アガロースゲル電気泳動を用いた場合はやや検出感度が低下する可能性があることを考慮する必要がある。

10 コピー程度の RNA の検出の場合、患者血清中からの RNA 回収率が 100%と仮定したとき、測定可能な最低濃度は 1,250copies/ml となる。

### 2. リアルタイム PCR 法における改善が望まれる点

今回開発されたリアルタイム PCR 法では、GP 遺伝子の検出用プローブの蛍光色素として Texas-red が用いられている。ABI の機器では、well 間のシグナルの補正のために rox が使用されており、この波長が Texas-red と重なるため、rox による補正を解除しなければ検量線が得られないことが分かった。従って、別の蛍光色素を使用したプローブを作成し、感度を再検証する必要がある。また、陽性コントロールが作成されているが、陽性コントロール検出用の挿入配列が特殊な配列である。これをインフルエンザウイルスの検出用のものと共通のものに変更すれば、

各地方衛生研究所で陽性コントロール検出用プローブを新たに購入する必要がなくなる。

## D. 結論

地方衛生研究所においても、患者の臨床経過においてどのように血中ウイルス濃度が変化するかをリアルタイム PCR 法により検証したいという要望がある。また、地方衛生研究所における SFTS 疑い患者の検査では、塩基配列を決定することなく結果を確定することの出来るリアルタイム PCR 法のニーズは大きいと思われる。

国立感染症研究所で開発され、現在地方衛生研究所で使用されている conventional PCR 法の検出感度は、ほぼ患者血清中のウイルスを検出するに十分であることが示された。Conventional PCR 法とリアルタイム PCR 法の検出感度の比較では、同程度か、リアルタイム PCR 法がやや優れていた。リアルタイム PCR 法については、いくつかの改良すべき点が判明したため、次の流行にそなえて再検討し、速やかに地方衛生研究所に普及する必要がある。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

国際学会

なし

国内学会

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得	特記事項なし
特記事項なし	
	その他
実用新案登録	特記事項なし

表 1. リアルタイム PCR 法によるウイルス定量値の 2 施設における比較

No.	サンプル	国立感染症研究所		山口県環境保健センター	
		NP	GPC	NP	GPC
1	HB29-no dilution 2nd	5E+07	6E+07	2E+07	1E+07
2	HB29-10 <sup>3</sup> _2nd	7227	7656	8898	12483
3	HB29-10 <sup>2</sup> _2nd	513	487	710	880
4	HB29-10 <sup>1</sup> _2nd	68.6	62.6	72.0	133.0
5	HB29-10 <sup>0</sup> _2nd	11.5	4.0	6.3	8.4
6	HB29-10 <sup>-1</sup> _2nd	8.7			
7	HB29-10 <sup>-2</sup> _2nd				
8	YG1-no dilution	1E+07	2E+07	1E+07	1E+07
9	YG1-10 <sup>3</sup>	8611	11827	11039	17910
10	YG1-10 <sup>2</sup>	800	782	1033	1839
11	YG1-10 <sup>1</sup>	69.1	55.6	102.2	162.3
12	YG1-10 <sup>0</sup>	12.0	1.2	3.2	15.4
13	YG1-10 <sup>-1</sup>	5.5			
14	YG1-10 <sup>-2</sup>				
15	SPL035-no dilution	1E+07	2E+07	1E+07	2E+07
16	SPL035-10 <sup>3</sup>	6289	3950	6672	6832
17	SPL035-10 <sup>2</sup>	548	383	571	686
18	SPL035-10 <sup>1</sup>	72.3	30.8	89.2	65.4
19	SPL035-10 <sup>0</sup>	12.0	1.7		10.7
20	SPL035-10 <sup>-1</sup>		0.6		
21	SPL035-10 <sup>-2</sup>				

表 2. RealTime RT-PCR と Conventional RT-PCR の結果比較

(ともに山口県実施)

No.	Sample	RealTime RT-PCR	Conventional RT-PCR	
		NP (single) copies/reaction	primer set 1	primer set 2
1	HB29-no dilution 2nd	19618812.0	+	+
2	HB29-10 <sup>3</sup> _2nd	10793.9	+	+
3	HB29-10 <sup>2</sup> _2nd	936.2	+	+
4	HB29-10 <sup>1</sup> _2nd	131.8	+	+
5	HB29-10 <sup>0</sup> _2nd	25.7		
6	HB29-10 <sup>-1</sup> _2nd			
7	HB29-10 <sup>-2</sup> _2nd			
8	YG1-no dilution	10273722.0	+	+
9	YG1-10 <sup>3</sup>	11627.0	+	+
10	YG1-10 <sup>2</sup>	1038.3	+	+
11	YG1-10 <sup>1</sup>	68.9	+	±
12	YG1-10 <sup>0</sup>	6.9	+	
13	YG1-10 <sup>-1</sup>	1.4		
14	YG1-10 <sup>-2</sup>			
15	SPL035-no dilution	10512762.0	+	+
16	SPL035-10 <sup>3</sup>	6595.2	+	+
17	SPL035-10 <sup>2</sup>	544.2	+	+
18	SPL035-10 <sup>1</sup>	94.9	+	±
19	SPL035-10 <sup>0</sup>	7.9		
20	SPL035-10 <sup>-1</sup>	0.3		
21	SPL035-10 <sup>-2</sup>			

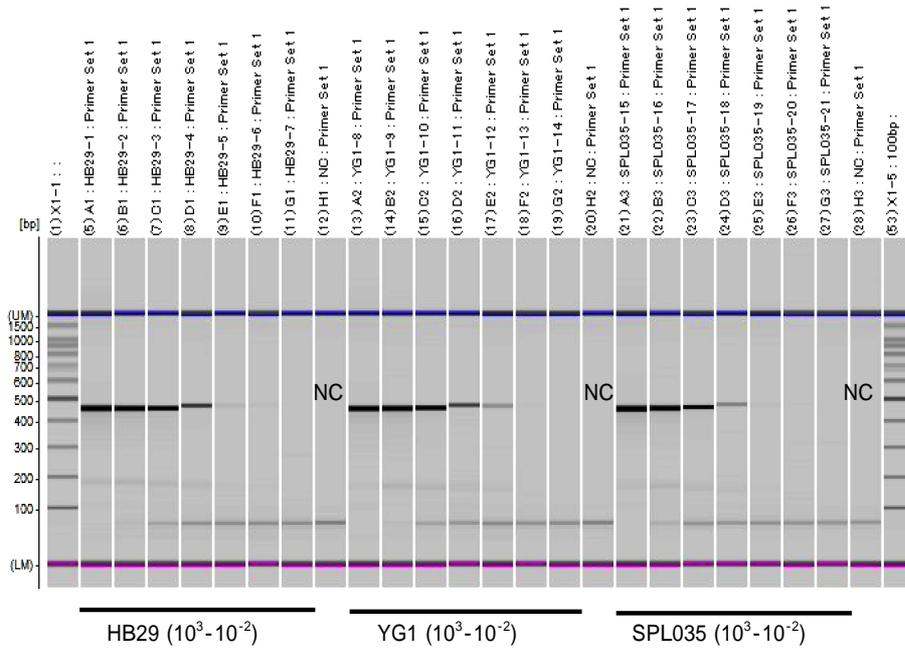


図 1. 従来法 Conventional RT-PCR (primer set 1): 山口県実施

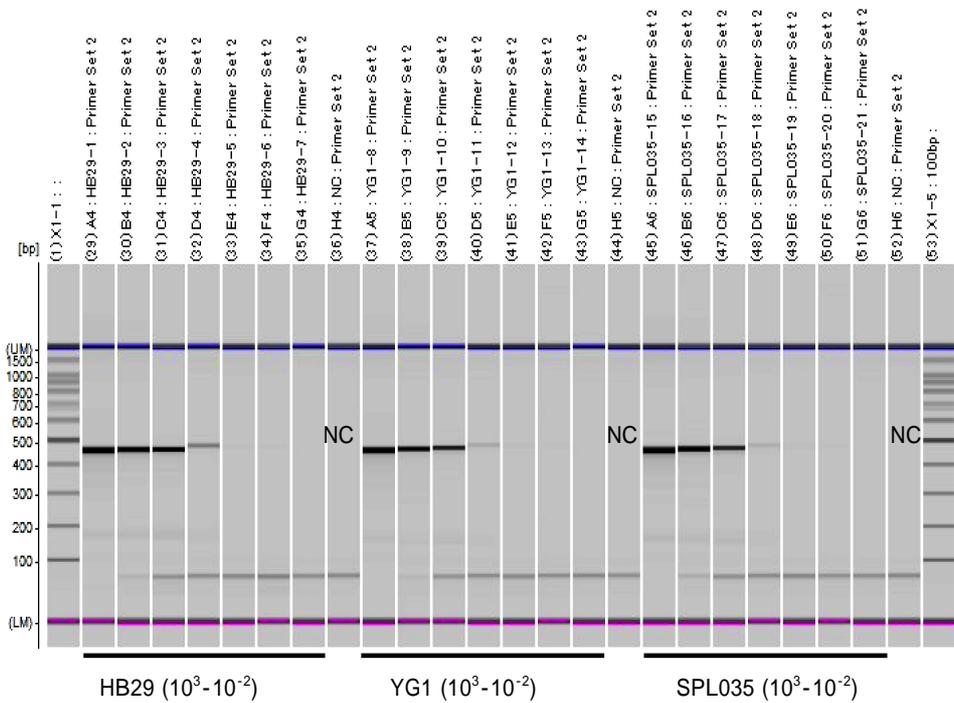


図 2. 従来法 Conventional RT-PCR (primer set 2): 山口県実施

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)

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 の臨床対応とガイドライン

研究分担者	加藤 康幸	独)国立国際医療研究センター国際感染症センター
研究協力者	忽那 賢志	独)国立国際医療研究センター国際感染症センター
	富尾 淳	東京大学医学部附属病院災害医療マネジメント部
	高橋 徹	山口県立総合医療センター血液内科
	泉川 公一	長崎大学病院第二内科
	下島 昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
	福井 康雄	高知医療センター感染症科

研究要旨:厚労省からの通知,病原微生物検出情報の速報,国外の論文等を参照し,医療関係者向けに重症熱性血小板減少症候群(SFTS)診療の手引きを作成した.SFTSはまれに患者血液との接触により感染することがあるため,感染防止手順に重点を置くとともに,疫学,検査,治療が概観できるものとした.治療および曝露後発症予防におけるリバビリンの評価,病院内検査室におけるバイオセーフティが今後の課題と考えられた.

A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS)は,2011年に中国の研究者によって初めて報告されたSFTSウイルス(SFTSV)による発熱性疾患である.2013年になって,少なくとも2005年からわが国でも患者発生があったことが明らかとなった.2013年1月以降に発症した患者は,同年末までに40名で,致死率は30%(死亡13名)であった.

このような致死率の高い新興感染症が発生した場合には,患者に適切な医療が提供されるためにも医療関係者に正しい情報を伝えることが重要である.中国において,患者血液の曝露に

よる感染が報告されており,職業安全保健の立場からも感染防止手順をまとめることなどが求められている.

B. 研究方法

1) SFTS 診療の手引き作成

厚生労働省や国立感染症研究所からの通知,病原微生物検出情報の速報,国内外の論文・ガイドラインなど収集した情報を医療関係者向けにわかりやすくまとめ,公表することとした.平成24年度厚生労働科学研究費補助金「我が国における一類感染症の患者発生時に備えた診断・治療・予防等の臨床的対応及び積極的疫学調査に関する研究

(H23-新興-一般-006)」において作成した「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)診療の手引き」を基に内容の充実,改訂することを図った。編集にあたっては,ほかの分担研究者や患者の診療経験がある研究協力者に査読をしてもらい,内容の評価を行った。

## 2) 国内診療体制の調査

SFTS は広義のウイルス性出血熱とも考えられる。ラッサ熱などの患者を診療することが想定されている第一種感染症指定医療機関において,SFTS 患者の診療をどのように行われているかについて聴き取り調査を行った。

(倫理面からの配慮について)

国内診療体制の調査においては,患者の個人情報を取り扱わないように配慮した。

## C. 研究結果

### 1) SFTS 診療の手引き作成

平成 25 年 10 月までに公表された情報をまとめ,重症熱性血小板減少症候群(SFTS)診療の手引き(A4 版 6 ページ)をまとめた。内容は,疾患概要,SFTSV の国内および国際分布,臨床経過,国内症例の疫学,SFTS の臨床的特徴,診断確定に必要な検査,行政検査の流れ,適切な検体と梱包,診断・治療・感染防止のアルゴリズム,家族内・職業感染事例,患者血液・体液曝露時の対応,参考資料とした。PDF を国立国際医療研究センター国際感染症対策室のホームページに公表したほか,印刷した冊子を医療機関に配布した。

### 2) 国内診療体制の調査

SFTS 患者の診療を想定している第一種感染症指定医療機関(高知医療センター)を訪

問し,聴き取り調査を行った。SFTS 患者の診療には,第一種感染症病室は使用せず,集中治療室や一般病棟の個室を使用する方針をとっていた。第一種感染症病室が使用されないのは,1) 普段使用していない,2) 重症患者の医療が行うのが困難,3) SFTS は四類感染症であること,が理由とされていた。

## D. 考察

新興感染症が発生した場合に,医療関係者に正しい知識を伝えることは重要である。とくに重症急性呼吸器症候群(SARS)のように,業務中感染する可能性がある疾患においては,その防止手段を医療関係者に伝えることは患者に適切な医療を提供する上で不可欠の要素である。SFTS はわが国で発生した新興感染症であり,症例を実際に経験した医療関係者も限られ,まだ情報が不足している。厚生省から発出される通知などを医療関係者(医師,看護師,検査技師など)にわかりやすくまとめることを目的として診療の手引きを作成した。作成にあたっては,図表を多く使い,とくに,1) まれに患者血液との接触で感染する可能性があること(表 1),2) 後向き調査に使われた症例定義にとらわれず検査を依頼できること,3) 適切な検体搬送方法に重点を置いた。

SFTS の治療は現時点で支持療法が中心となる。中国保健省による改訂治療ガイドライン(2012 年)によれば,静注用リバビリン 500 mg/日の使用が推奨されている。Liu らは,致死率にリバビリンが影響しないことを報告している(Clin Infect Dis 2013;57)。しかし,リバビリンの用量が,ラッサ熱の推奨量(約 4,000 mg/日)と比べると著しく少ない。用量を増やすと治療効果が高まる可能性があるのか,今後検討が必要である。

また、曝露後発症予防にリバビリンを使用する場合について、安全性や倫理面の課題を解決していく必要がある。また、中国や韓国の治療ガイドラインを翻訳するなどし、日中韓の専門家により内容を検討していくことが望ましいと考えられる。

SFTS は四類感染症に指定されているが、SFTSV は第三種病原体の指定を受けるなど、バイオセーフティに十分留意した診療体制を考える必要がある。病院内の検査室では、末梢血液塗抹検査、遠心などエアロゾルが発生する可能性のある手技が通常安全キャビネットで行われていない。少なくとも診断が確定した患者には、血中にウイルスが多量に含まれることを考慮し、安全キャビネットで検査を行うことが望ましい。このような検査部門についても今後ガイドラインを整備していく必要があるだろう。

#### E. 結論

厚労省からの通知、病原微生物検出情報の速報、国外の論文を参照し、医療関係者向けの SFTS 診療の手引きを作成した。今後、新たな知見を取り入れて、改訂する必要がある。リバビリンの治療および曝露後発症予防における使用方法、病院内検査室におけるバイオセーフティが今後の課題と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表

なし

#### 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

特記すべきことなし

表 1. 中国におけるヒト-ヒト感染事例

発生年	発端症例 (転帰)	二次症例(致死率)	推定感染経路(潜伏期 間)	文献
2007年	80歳女性 (死亡)	別居している家族 6名(0%)	血液, 便, 遺体との接触 (10日前後)	Bao et al. Clin Infect Dis 2011:53
2010年	77歳男性( 死亡)	医師2名, 子2名, 納棺師1名(0%)	血液, 遺体との接触 (7-15日)	Gai et al. Clin Infect Dis 2012:54
2012年	63歳男性 (死亡)	別居している兄弟 2名, 友人1名 (66%)	血液, 遺体との接触 (7-15日)	Chen et al. Int J Infect Dis 2013:17

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

特記事項なし

#### 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
Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M.	The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan	Journal of Infectious Diseases	209	816-827	2014
下島昌幸, 福土秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 森川茂, 西條政幸	日本における重症熱性血小板減少症候群	ウイルス	63	7-12	2013
下島昌幸, 西條政幸	ダニ媒介性新興感染症 SFTS	実験医学	31	3047-3053	2013
西條政幸	Severe fever with thrombocytopenia syndrome	感染症	43	210-216	2013
西條政幸	血小板減少をきたす新しいダニ媒介性ウイルス感染症: SFTS	Medical Practice	30	1810-1812	2013
西條政幸	重症熱性血小板減少症候群	皮膚病診療	35	822-826	2013
西條政幸	日本で流行するダニ媒介性ウイルス感染症 SFTS とダニ媒介性脳炎	医学のあゆみ	247	701-702	2013

西條政幸	重症熱性血小板減少症候群	Medical Technology	41	1275-1277	2013
谷英樹, 西條政幸	重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)	検査と技術	41	1164-1167	2013
森川茂	重症熱性血小板減少症候群	獣疫学雑誌	17	142-143	2014
森田公一	Dengue 熱 と vector-borne diseases (SFTS を含む)	化学療法の領域	29	25-32	2013