

201420051A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

SFTS の制圧に向けた総合的研究

(H25－新興－指定－009)

平成26年度 総括・分担研究報告書

平成27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)

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

SFTS の制圧に向けた総合的研究

(H25－新興－指定－009)

平成26年度 総括・分担研究報告書

平成27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 26 年度厚生労働科学研究費補助金
[新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

SFTS の制圧に向けた総合的研究

平成 26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
福士秀悦	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
谷口怜	国立感染症研究所ウイルス第一部
安藤秀二	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
中島典子	国立感染症研究所感染病理部
永田典代	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
新倉綾	国立感染症研究所動物管理室
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
加藤博史	国立感染症研究所疫学センター
新井智	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
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
下田宙	山口大学共同獣医学部
鍬田龍星	山口大学共同獣医学部
濱崎千菜美	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
瀬戸順次	山形県衛生研究所 微生物部
門馬直太	福島県衛生研究所 微生物課
千葉一樹	福島県衛生研究所 微生物課
山本正悟	宮崎大学医学部
海老原秀喜	米国 NIH 国立アレルギー・感染症研究所
中尾亮	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
梶原将大	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
邱永晋	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
森亜紀奈	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
直亨則	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
高田礼人	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
村松美笑子	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
加藤里美	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
五十嵐学	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
山内聡子	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
小林進太郎	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
佐々木道仁	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
大場靖子	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
徐慶霖	國立中興大學 獸醫教學醫院
Bernard Hang'ombe	ザンビア大学 獣医学部
水谷哲也	東京農工大学農学部
高田伸弘	福井大学医学部
藤田博己	馬原アカリ研究所
岸本壽男	岡山県環境保健センター

濱野雅子	岡山県環境保健センター
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
竹井正行	宮崎県衛生環境研究所
町野太朗	宮崎県衛生環境研究所
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
柳井徳麿	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
本永恭子	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. SFTS の診断・治療・予防法に関する研究:中和抗体測定法の開発…………… 13
西條政幸, 下島昌幸
2. SFTS の診断・治療・予防法の開発に関する研究:重症熱性血小板減少症候群剖検症例の病理学的解析…………… 17
西條政幸, 長谷川秀樹, 片野晴隆, 永田典代, 中島典子, 鈴木忠樹
3. SFTS の診断・治療・予防法の開発に関する研究: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との相関についての研究…………… 23
西條政幸, 吉河智城, 下島昌幸
4. SFTS の診断・治療・予防法に関する研究:SFTS ウイルス抗原検出法の開発…………… 27
西條政幸, 福間藍子, 谷口怜, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 下島昌幸, 森川茂, 鈴木忠樹, 長谷川秀樹
5. SFTS の診断・治療・予防法に関する研究:重症熱性血小板減少症候群(SFTS)報告症例の臨床像と感染リスク因子の推定…………… 31
西條政幸, 山岸拓也, 加藤博史, 大石和徳
6. 日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明…………… 39
森川茂, 澤邊京子, 安藤秀二, 川端寛樹, 新倉綾, 木村昌伸, 藤田修, 今岡浩一, 宇田晶彦, 加来義浩, 野口章, 新井智, 高田伸弘, 藤田博巳, 高野愛, 前田健, 岸本壽男, 四宮博人, 荻和宏明, 有川二郎, 澤洋文, 水谷哲也, 柳井徳麿, 西園晃
7. 日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明:特定地域における動物の SFTSV の疫学とリスク評価の研究…………… 49
森川茂, 前田健, 高野愛, 下田宙, 鎌田龍星, 濱崎千菜美
8. 日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明:国内外において採集したダニを対象とした SFTSV ゲノムの検出…………… 55
森川茂, 澤洋文
9. 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…………… 59
森田公一, 泉川公一, 吾郷昌信, 吉川亮, 堀尾政博, 奥村順子, 早坂大輔
10. SFTS ウイルスの感染機構・増殖機構・病原性の解明研究…………… 69
有川二郎, 谷英樹, 福士秀悦, 下島昌幸, 安田二郎, 西園晃, 山田健太郎, 吉松組子

11. SFTS の調査研究における国内ネットワークのあり方に関する研究:リアルタイム PCR による SFTS 診断法の開発	83
調恒明, 岸本壽男, 濱野雅子, 四宮博人, 菅美樹, 竹井正行, 町野太朗, 福盛順子, 御供田睦代, 戸田昌一, 岡本玲子, 村田祥子, 本永恭子, 福士秀悦, 下島昌幸, 吉河智城, 谷英樹, 福間藍子, 西條政幸	
12. SFTS の臨床対応とガイドライン	91
加藤康幸, 忽那賢志, 高橋徹, 東太地, 山中篤志	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	95

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金[新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

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年に報告された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，2013年1月に日本でも流行していることが確認された。2013年には40人の，2014年には61人のSFTS患者が報告され，その30%の患者が死亡している。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。H26年度の本研究班において，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(SFTSV)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の作成，等である。SFTSVに対する抗ウイルス薬の探索，新規SFTS抗原検出法の開発，SFTS患者の病理学的特徴の解明，日本で分離されたSFVSVの分子疫学，SFTS患者の臨床的特徴と感染リスク因子の解明，に関する新規知見が得られた。また，自然界におけるSFTSVの存在様式解明と感染リスクを明らかにするために，各種動物の血清疫学を実施し，国内のSFTSVの宿主・媒介マダニ種の同定とその分布を調査した。またSFTSVに関する基礎研究として，SFTSVの細胞への侵入機構，中和活性のある単クローン抗体の作出，等の研究がなされた。さらに厚労省からの通知，病原微生物検出情報の速報，国内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)診療の手引きを改訂した。

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。SFTS は致死率が高く、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。2013 年度に本研究班が立ち上げられた。H25 年度(1 年目)には、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(特に後方視的研究を通じた SFTS の流行および臨床的特徴の解明)、2)日本の自然界における SFTSV の存在様式の解明(マダニおよび哺乳動物における SFTSV 感染の実態解明)、3) SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性の解明研究(病理学的特徴の解析、C 型レクチンの感染増強効果、感受性のある細胞の探索、等)、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、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 の診療の手引き」作成に関する研究、が実施された。

H27 年度においても引き続き、SFTS の臨床的・疫学的特徴を前向きに調査し、診断・治療・予防法の開発や日本国内での SFTSV 感染リスク因子を明らかにし、1 人でも患者が減るような対策を講じるため、予後の改善にむけ

た研究が継続された。また、SFTSV に関する基礎的研究がなされた。

B. 研究方法

1) SFTSV に対する中和抗体測定法の開発

Vero 細胞等で明瞭な細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) を示さない SFTSV を多数回にわたり継代して、Vero 細胞に SFTSV を順化させ、明瞭な CPE を誘導する SPL030 p50-2 株を得た。これを用いて中和抗体測定法を開発した。

2) 重症熱性血小板減少症候群剖検症例の病理学的解析

SFTS で亡くなられた 15 人の病理解剖標本を用いて病理解析を行い、SFTS の病理学的特徴と発症病理を明らかにした。

3) 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との関連についての研究

より詳細な知見を得るために更に最近までの国内発生患者由来の SFTSV ゲノム塩基配列の決定を行い、分子系統学的解析を行った。

4) SFTS ウイルス抗原検出法の開発

SFTSV の組換え核蛋白質(に対するモノクローナル抗体を作出し、それを用いた抗原検出 ELISA 法(サンドイッチ ELISA)を開発した。

5) 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)報告症例の臨床像と感染リスク因子の推定

2013 年 1 月 1 日以降に SFTS と診断され、感染症発生動向調査 (National Epidemiological Surveillance of

Infectious Disease : NESID)に届出をされた患者を対象として、臨床的・疫学的情報に関する情報を調査票にて郵送回収した。

6) 日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明

各種動物の血清疫学を実施し、国内の SFTSV の宿主・媒介マダニ種の同定とその分布を調査した。

7) 特定地域における動物の SFTSV の疫学とリスク評価の研究

特定地域の各種野生動物と伴侶動物の SFTSV の感染状況を調査するとともに、その地域で捕集されるマダニ種を調査した。

8) 国内外において採集したダニを対象とした SFTSV ゲノムの検出

SFTSV のダニにおける疫学調査を実施した。ザンビアで採集した 361 検体、台湾で採集した 369 検体、国内 12 道県で採集した 1352 検体のダニを対象として、real-time RT-PCR 法を用いて、SFTSV のゲノムを検索した。

9) 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

H26 年度の本研究事業において開発された抗体検出系を中国の SFTS 患者血清を用いて評価し、患者発生地域におけるヒトの血清疫学調査、動物の血清疫学調査での非特異反応の対策、ダニ調査、リスクコミュニケーションに資する地域住民の意識調査を実施した。

10) SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性の解明研究

リバビリン、インターフェロン- α 、

S1P/SKI-1 阻害剤の抗 SFTSV 効果を複数のヒト由来培養細胞を用いて解析した。SFTSV 感染マクロファージ細胞系細胞株を用いて、感染による貪食能の亢進および抗体依存性感染増強(ADE)の解析を行った。

11) リアルタイム PCR による SFTS 診断法の開発

岡山県環境保健センター、愛媛県立衛生環境研究所、宮崎県衛生環境研究所、鹿児島県環境保健センター、山口県環境保健センターの各研究施設において、リアルタイム PCR による SFTSV 検出法の感度および、従来のコンベンショナル PCR との比較検討を行った。

12) SFTS の臨床対応とガイドラインの作成

厚生省からの通知、病原微生物検出情報の速報、国内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)診療の手引きを改訂した。

C. 研究結果

1) SFTSV に対する中和抗体測定法の開発

順化前の SFTSV を用いて測定する中和抗体価と順化 SFTSV を用いて測定されたそれとは正の相関が認められた。

2) 重症熱性血小板減少症候群剖検症例の病理学的解析

①大型リンパ球の浸潤が目立つ壊死性リンパ節炎、②節外臓器への大型リンパ球浸潤、③著しい血球貪食が SFTS の病理学的特徴であることを明らかにした。

3) 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との相関についての研究

SFTSVはその系統樹の根から大きく2つのクレードに分けることが出来た。この分類は日本で確認された株と中国/韓国で確認された株という地理的な分布と一致した。ウイルスは8つの遺伝子型に分類可能であり、中国/韓国のクレードに5種類、日本のクレードに3種類存在していた。更に日本で確認された、いくつかの株については中国のクレードに分類されること、一方中国で確認された、いくつかの株については日本のクレードに分類されることが明らかとなった。

4) SFTS ウイルス抗原検出法の開発

SFTSV-rN を特異的に認識するモノクローナル抗体が得られた。また本研究で開発された抗原検出 ELISA は、定量 RT-PCR と比較し感度は低いものの、ウイルス RNA 量の高い検体(10^5 copies/ml 以上)中のウイルス検出が可能であった。SFTS 患者の血中ウイルス RNA 量は、発症後 10^{5-6} copies/ml に達し、死亡患者では 10^7 copies/ml 以上に増加することが報告されている。本研究で開発された抗原検出 ELISA は、SFTS の急性期診断法の一つとして有用である。

5) 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)報告症例の臨床像と感染リスク因子の推定

対象は97名で、うち40名から回答が得られ(回収率:41%)、致命率は約30%であった。農業従事者(特に田畑での活動)、自宅周囲環境が山林であることが罹患の高リ

スクであると推測され、死亡のリスクとして加齢、神経症状、高度な血小板減少、腎機能障害、AST 高値、凝固障害が挙げられた。

6) 日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明

最も広範囲に調査したニホンジカでは、青森県、岩手県、宮城県、栃木県、群馬県、静岡県、山梨県、長野県、岐阜県、三重県、滋賀県、京都府、兵庫県、鳥取県、島根県の15自治体を調査し、全体で18.6%が抗体陽性であった。昨年度までの調査結果(2007年からの保管血清及び2013/2014年狩猟期の捕獲されたニホンジカ血清)と併せると、少なくとも2007年には抗体陽性シカが存在し患者発生自治体では高い抗体陽性率であること、患者発生自治体ではシカの抗体陽性率は有意に高いこと、患者非発生自治体でもシカの抗体陽性率がこの2年間で上昇している自治体、2年間比較的高い陽性率である自治体が存在した。また、イノシシやウサギでは2005年には抗体陽性動物がいた。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。

7) 特定地域における動物の SFTSV の疫学とリスク評価の研究

SFTSV 感染が拡大している地域があること、飼育犬の血液中にウイルスが存在すること、地区により SFTSV 感染のリスクが異なることが判明したこれらの地域で捕集される主なダニは、フタゲチマダニやキチマダニであった

8) 国内外において採集したダニを対象とした SFTSV ゲノムの検出

国内で採集した 1352 検体のダニの内、北海道で採集されたヤマトチマダニ (*Haemaphysalis japonica*) から抽出した RNA から陽性所見が得られなかった。

9) 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 を大腸菌で発現させた診断抗原は安価で大量生産に適しており、開発した診断系は中国の患者血清でも高い感度特異を示した。また H26 年度の調査でも患者周辺のハイリスクグループの調査では不顕性感染者は 1 例も発見できなかった。動物の血清疫学調査で問題となる非特異的反応について抗原のクロマト精製によりほとんど解決されることが分かったが、それでもなお稀に非特異反応を示すものがあった。ダニの調査では今年も、ウイルスは分離できておらずダニのウイルス保有率は極めて低いと思われる。一般市民の意識調査では、SFTS 及びその他のダニ媒介性疾患の危険性に関する認識の低い者が少なからず存在し、目下の住民啓発方法では不十分であることが示唆された。

10) SFTS ウイルスの感染機構・増殖機構・病原性の解明研究

リバビリン、インターフェロン- α 、S1P/SKI-1 阻害剤の 3 剤とも SFTSV の増殖を抑制することがわかった。しかし、マウス個体レベルではリバビリン投与は SFTSV の増殖に影響を与えなかった。

SFTSV 感染マクロファージ細胞系細胞で

は貪食能亢進は認められなかったものの抗体依存性感染増強効果が確認され、SFTS の病態形成に関与している可能性が考えられた。

SFTSV のエンベロープ糖蛋白(GP)によって誘導される細胞侵入に関わる現象として、感染細胞の pH 依存性細胞融合能を解析した。SFTSV の GP は、細胞表面にほとんど局在していないにも関わらず、低 pH 条件下では容易に細胞膜融合を引き起こすことが明らかとなった。また、25-HC は SFTSV の細胞侵入時、特にウイルス膜融合の段階に作用して抗ウイルス効果を示すことが明らかとなった。

11)リアルタイム PCR による SFTS 診断法の開発

スタンダード RNA を用いた検討では、いずれの研究施設においても 10^1 コピー/reaction 以上の RNA を検出し、高感度に SFTSV を検出できた。また、リアルタイム PCR 法によりコンベンショナル PCR と同等あるいは、それ以上の高い感度でウイルス RNA を検出可能であった。臨床検体を用いた比較検討では、尿検体等、RNA コピー数の少ない検体を用いた場合に、コンベンショナル PCR の結果との相違がみられたが、血清を用いた場合は結果がほぼ一致した。

12) SFTS の臨床対応とガイドラインの作成

SFTS はまれに患者血液・体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、治療が概観できるガイドラインを作成した。血

球貧食症候群に対するステロイド薬等の補助療法の評価などが今後の課題と考えられた。

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 2 年が経過した。SFTS の日本における流行状況を前向きに調査研究する体制が整備されるつある。本研究班が立ち上がり、研究が開始されて 2 年目を迎えた。

H25 年度に行われた SFTS の日本における流行状況の後方視的研究により得られた成績をさらに詳細で、そして、より深い研究成績が得られた。後方視的分子疫学的解析によると、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。しかし、分離株を増やして詳細に解析したところ、日本株の中には中国株に分類されるものがあり、逆に中国株の中に日本株と考えられるものが存在していた。

15 名の亡くなられた患者の病理学的解析がなされた。日本国内で発症した SFTS 致死例の 15 症例について病理学的解析を行った結果、壊死性リンパ節炎と血球貪食像が SFTS の病理学的特徴であると考えられた。臨床的には同様の経過をたどった致死症例ではあるが、ウイルス感染細胞分布にいくつかのパターンが存在しており、SFTS 病態形成に複数の機構が関与していることが考えられた。SFTS の病理学的解析は、日本のみで実施されている。世界的にも貴重な研

究成績と考えられる。

新規診断システムが開発された。SFTSV-rNP に対するモノクローナル抗体を用いた抗原検出 ELISA 法、それを抗原とした抗体検出法である。これらの診断法の有用性が示された。抗体検出法が広く行われる体制整備が求められる。

農業従事者(特に田畑での活動)、自宅周囲環境が山林であることが罹患の高リスクであると推測され、死亡のリスクとして加齢、神経症状、高度な血小板減少、腎機能障害、AST 高値、凝固障害が挙げられた。臨床的・疫学的研究に関する考察では、死亡のリスクは中国からの報告と同様であったが、罹患リスクは評価が十分ではなく、中国でのリスクとは違う可能性があることから、罹患リスクを評価する研究が望まれる。また、国内報告例は重症例に偏っており、軽症例の診断報告の推進が重要である。

マダニにおける SFTSV ゲノム陽性率や日本におけるいくつかの哺乳動物における抗体保有状況を前向き、かつ、経時的な調査を継続した。特記すべき研究成果として、ある患者発生地域におけるアライグマ等の動物における抗体保有率が年々上昇していたり、陽性動物個体の存在地域が拡大する傾向が証明されたことである。動物における SFTSV 感染状況を継続的に調査することは、患者発生リスクをモニターすることに繋がる、重要な研究成果である。

SFTS の治療法の開発の一端として、抗ウイルス剤による治療法の開発が望まれる。In vitro の系で評価した限りにおいて、インター

フェロン α , リバビリンには抗 SFTSV 活性が認められた。しかし、臨床効果については未知数である。今後、これらの薬剤だけでなく、その他の候補薬品の抗 SFTSV 活性は、in vivo における効果についても評価される必要がある。

SFTS 感染予防にはワクチン開発も重要な研究課題となる。診断・治療・予防法の開発には基礎研究が欠かせない。SFTSV 感染において抗体依存性感染増強効果が誘導されることが in vitro で確認された。この抗体依存性感染現象は、患者で確認されている B 細胞へのウイルス感染に関連し、それが SFTS の病態形成に関与する可能性が考えられた。

SFTSV の GP は、細胞表面にほとんど局在していないにも関わらず、低 pH 条件下では容易に細胞膜融合を引き起こすことが明らかとなった。また、25-HC は SFTSV の細胞侵入時、特にウイルス膜融合の段階に作用して抗ウイルス効果を示すことが明らかとなり、今後、創薬開発への応用にも繋がる可能性が示唆された。

SFTS の調査研究、感染症対策には行政、国立感染症研究所、地方衛生研究所との診断や情報ネットワークの強化・維持がのぞまれる。今年度は選ばれたいくつかの地方衛生研究所間で診断システムの正確性に関する評価が国立感染症研究所ウイルス第一部との連携の上で実施された。このような活動はこれからも継続的に実施していく必要がある。

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。これまで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 (英語版)」を H25 年度に作成した日本語版とともに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

中国で囚動物をおいた成績や、動物への感染実験から、動物は感染しても発症しない可能性が強い。ただし 1 型インターフェロンレセプター KO マウスでは致死性的

感染を起こすことから、生後間もない動物などではより感受性が高い可能性がある。ただし、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。

SFTSV 感染の拡大の懸念される研究成績が得られた。飼育動物を含む動物の体液の取り扱いに注意する必要がある。

SFTS 及びその他のダニ媒介性疾患の危険性に関する認識の低い者が少なからず存在し、より有効な注意喚起・住民啓発の必要性が示唆された。

G. 研究発表

1) 論文発表

- 1) 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) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains and prediction of patient survival based on viral load. J Clin Microbiol 52:3325-3333, 2014
- 3) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. Jpn J Infect Dis. 67: 423-427, 2014
- 4) Hiraki T, Yoshimitsu M, Suzuki T, Goto Y, Higashi M, Yokoyama S, Tabuchi T, Futatsuki T, Nakamura K, Hasegawa H, Saijo M, Kakihana Y, Arima N, Yonezawa S. Two autopsy cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in Japan: A pathognomonic histological feature and

- unique complication of SFTS. *Pathol Int* 64(11):569-75, 2014
- 5) Ohagi Y, Tamura S, Nakamoto C, Nakamoto H, Saijo M, Shimojima M, Nakano Y, Fujimoto T. Mild clinical course of severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in an elderly Japanese patient. *Case Rep Infect Dis.* 2014:918135, 2014
- 6) 谷英樹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス: バイオセーフティと家族内感染および院内感染に対する対応. *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 35: 37-38, 2014
- 7) 谷英樹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS). *血液フロンティア* 24: 80-83, 2014
- 8) 福士秀悦, 吉河智城, 谷英樹, 福間藍子, 下島昌幸, 西條政幸: 重症熱性血小板減少症候群の検査法. *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 35: 40-41, 2014
- 9) 下島昌幸, 西條政幸: 中国での重症熱性血小板減少症候群の発生状況, *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 35: 33-34, 2014
- 10) 谷英樹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. *臨床検査* 58(4):467-473, 2014
- 11) 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS ウイルス感染症). *日本医師会雑誌 感染症診療 update* 143 特別号(2): S398-399, 2014
- 12) 西條政幸. 日本におけるマダニ媒介性ウイルス感染症の発見 -TBEとSFTS-. *小児科臨床* 67:1245-1249, 2014
- 13) 西條政幸. 新興ウイルス感染症と重症熱性血小板減少症候群. *日本臨床内科医会誌* 29:69-76, 2014
- 14) 西條政幸. 日本における重症熱性血小板減少症候群と今後の課題. *日本内科学会雑誌* 103:2581-2586, 2014
- 15) 石堂亜希, 重岡徹, 富永貴元, 末広泰子, 福士秀悦, 下島昌幸, 西條政幸, 高橋徹. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)様の症状を呈した患者における抗 SFTS ウイルス抗体の検討. *山口医学* 63:257-261, 2014
- 16) 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
- 17) 森川茂. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の概要. *獣医畜産新報* 67(3):167-170, 2014
- 18) 泉川公一, 宮村拓人, 原信太郎, 住吉誠, 高園貴弘, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 河野茂, 早坂大輔, 余福勲, 森田公一. リケッチア感染症と臨床的鑑別が困難であった軽症の重症熱性血小板減少症候群の1例. *IASR Vol.* 35:9-40, 2014
- 19) 加藤康幸, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. *内科* 2014;113:1288-1289.
- 2) 学会発表

- 1) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷 英樹, 谷口 怜, 西條政幸. プラークを形成する SFTS ウィルスによる中和抗体価測定. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜(2014. 11)
- 2) 西條政幸, 高橋 徹, 前田健, 金行祥造, 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 森川茂. 日本で流行が確認された重症熱性血小板減少症候群: 発見までの経緯と今後の対策. 第 88 回日本感染症学会講演会, 福岡(2014, 6)
- 3) 長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋徹, 鈴木忠樹, 片野晴隆, 中島典子, 森川茂, 西條政幸, 倉田毅. 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の病理解析. 第 103 回日本病理学会総会, 広島 (2014. 4)
- 4) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, Harpal Singh, 須田遊人, 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との相関. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜(2014.11)
- 5) Fukuma A, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Ogata M, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montréal, Canada.(2014.7)
- 6) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 谷英樹, 谷口怜, 鈴木忠樹, 佐藤由子, 長谷川秀樹, 下島昌幸, 西條政幸. SFTS ウィルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014.11)
- 7) 山岸拓也, 他. 2013 年に発症した重症熱性血小板減少症候群 40 例のまとめ. 第 88 回日本感染症学会学術講演会, 福岡, (2014. 6)
- 8) 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, 札幌 (2014. 9)
- 9) 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 ウィルス維持様式の検討. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌(2014. 9)
- 10) 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 ウィルス抗体調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌(2014. 9)
- 11) 浜崎千菜美, 鎌田龍星, 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 ウィルス感染の疫学調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌(2014. 9)
- 12) 森川茂, 朴ウンシル, 今岡浩一, 前田健, 宇田晶彦. SFTS ウィルスの生活環にお

- 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, 横浜(2014.11)
- 13) 前田健, 濱崎千菜美, 下田宙, 鎌田龍星, 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, 横浜(2014.11)
- 14) 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, 横浜(2014.11)
- 15) Morikawa S, Kimura M, Fukushi S, Fukuma A, Kaku Y, Paku U, Tani H, Yoshikawa T, Imaoka K, Shimojima M, Saijo M, Maeda K. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), (July-August, 2014)
- 16) Fukuma A, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Ogata M, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), (July-August, 2014)
- 17) Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Ogata M, Morikawa S, Saijo M. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), (July-August, 2014)
- 18) Uda A, Kawabata H, Fukushi S, Kaku Y, Shimojima M, Ando S, Maeda K, Fujita H, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa T, Niikura A, Kyoko S. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), (July-August, 2014)
- 19) Morikawa S, Uda A, Kimura M, Kawabata H, Fukushi S, Fukuma A, Kaku Y, Paku U, Tani H, Yoshikawa T, Niikura A, Ando S, Kyoko S, Fujita H, Imaoka K, Shimojima M, Saijo M, Maeda K. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10th China-Japan International Conference of Virology, Changchun, China, (August, 2014)
- 20) 濱崎千菜美, 鎌田龍星, 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 ウイルス感染の拡大傾向. 第29回中国四国ウイルス研究会(山口大学)(2014, 06)
- 21) 濱崎千菜美, 鎌田龍星, 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 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会(山口大学)(2014, 05)
- 22) 早坂大輔, 余福勲, 吉川亮, 嶋田聡, Guillermo Posadas Herrera, Mya Myat Ngwe Tun, 吾郷昌信, 森田公一. 長崎県における野生動物およびマダニの SFTS ウイルス感染状況の調査. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)
- 23) Nishio S, Tsuda Y, Ito R, Shimizu K, Yoshimatsu K, Arikawa J. Seroepidemiological and biological studies on SFTSV. The 10th China-Japan International Conference of Virology Changchun, China (2014.08)
- 24) Ito R, Tsuda Y, Nishio S, Shimizu K, Yoshimatsu K, Arikawa J: Analysis of intracellular localization of virus proteins of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Taipei, Taiwan (2015.01)
- 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.

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金[新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究(H25-新興-指定-009)

SFTS の診断・治療・予防法に関する研究: 中和抗体測定法の開発

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・室長

研究要旨: SFTS ウイルスを多数回にわたり継代して得られた SPL030 p50-2 株は、通常分離直後の SFTS ウイルスと異なり Vero 細胞でプラークを形成することができる。この性状変化を利用し、以下の 2 点の成果を得た。1: 長期培養や特異抗体を必要としない迅速かつ安価な中和抗体価測定法の確立。2: ウイルス蛋白質 GP の細胞膜融合能を変化させるアミノ酸の同定。これらの成果は SFTS 診断の迅速化や普及、SFTS ウイルスの基本性状の解明に貢献すると思われる。

A. 研究目的

ウイルスは一般的に継代(実験的な増殖)を重ねることにより弱毒化する等、性状が変化することが知られている。この現象は一方では変異した蛋白質の性状解析など基礎研究で用いられることもあるし、また他方では弱毒生ワクチンとしてそれぞれの感染症に対する対策として応用されている。

SFTS ウイルスを Vero 細胞で 50 回継代したところ、通常分離直後のウイルスと比べ明らかに早く増殖し、明瞭なプラークを形成できるように性状が変化したウイルス株(SPL030 p50-2 株とする)が得られた。このウイルス株を SFTS の診断の 1 つ、中和抗体価の測定に活用できないか、また特に GP 蛋

白質の基本性状解析に活用できないか検討した。

B. 研究方法

1) 中和抗体価測定法

従来の中和抗体価測定法: SPL030 p50-2 のもとである継代回数が少ないウイルス株(SPL030 Original 株とする)を被検血清と混合後 Vero 細胞に接種し、メチルセルロース存在下で 8 日間培養した。ホルマリンで固定後、SFTS ウイルスの NP 蛋白質に対する特異ウサギ抗体を反応後、更に HRP ラベルの抗ウサギ抗体を反応させた。DAB で発色させ、フォーカス数を数えて中和抗体価を算出した。

p50-2 株を用いた中和抗体価測定法:

p50-2 株を被検血清と混合後 Vero 細胞に接種し、アガロース存在下で3日間培養した。ニュートラルレッドを加えて一晚培養し、プラーク数を数えて中和抗体価を算出した。

2) GP 蛋白質の細胞融合能評価

SFTS ウイルスより RNA を精製し cDNA を得て、ゲノム塩基配列の決定と GP 遺伝子の発現プラスミドへのクローニングを行った。またプライマーに基づく変異導入も行った。GP 発現プラスミドを蛍光蛋白質 Venus 発現プラスミドと共に Vero 細胞に導入後、様々な pH の溶液に一定時間暴露させ、通常の培養液(DMEM)で2時間培養し、融合細胞の有無や大きさを蛍光顕微鏡下で観察した。

(倫理面からの配慮について)

SFTS(疑い)患者および健常人の血清の利用については国立感染症研究所倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) SFTS(疑い)患者および健常人の血清について、従来の中和抗体価測定法による中和抗体価および p50-2 株を用いた中和抗体価測定による中和抗体価に示した(図 1)。2つの測定法による中和抗体価に大きな差異は認められなかった。

2) SPL030 の Original 株および p50-2 株の塩基配列では、GP 遺伝子の 6 か所に違いが認められ、うち 4 か所はアミノ酸変異も伴うものであった(図2)。Original 株および p50-2 株の GP 蛋白質の細胞融合能には差があり、後者

はより高めの pH で細胞融合を起こしていた。GP 蛋白質の細胞表面への発現量に差は認められなかった(図3)。

3) GP 蛋白質に認められた 4 つのアミノ酸変異のうち、962 番のアミノ酸変異が Original 株の GP 蛋白質と p50-2 株の GP 蛋白質の細胞融合能の差をもたらす変異であった(それぞれセリンおよびアスパラギン)。

D. 考察

SPL p50-2 株を用いた中和抗体価測定法は少ない日数で終了できかつ特異抗体を必要としないにも拘らず、従来の中和抗体価測定法と同様の結果を示した。

SPL p50-2 株の少なくとも GP 蛋白質には変異が認められ、細胞融合が比較的高い pH でも起こせるように性状が変化していた。この性状変化は GP 蛋白質の 962 番のアミノ酸変異によりもたらされていた。p50-2 株が示す明瞭なプラーク形成能の一因はこのアミノ酸変異によるものと考えられた。

E. 結論

SPL030 p50-2 株を用いた迅速かつ安価な中和抗体価測定法を確立した。SFTS ウイルスの GP 蛋白質による細胞融合は GP 蛋白質の 1 アミノ酸により変わりうるものであることが判明した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani Hi, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. J Clin Microbiol 52:3325-3333, 2014
- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe

fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. Jpn J Infect Dis 67:423-427, 2014

2. 学会発表

- 1) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷 英樹, 谷口 怜, 西條政幸. プラークを形成するSFTSウイルスによる中和抗体価測定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし.
2. 実用新案登録
該当なし.
3. その他
該当なし.

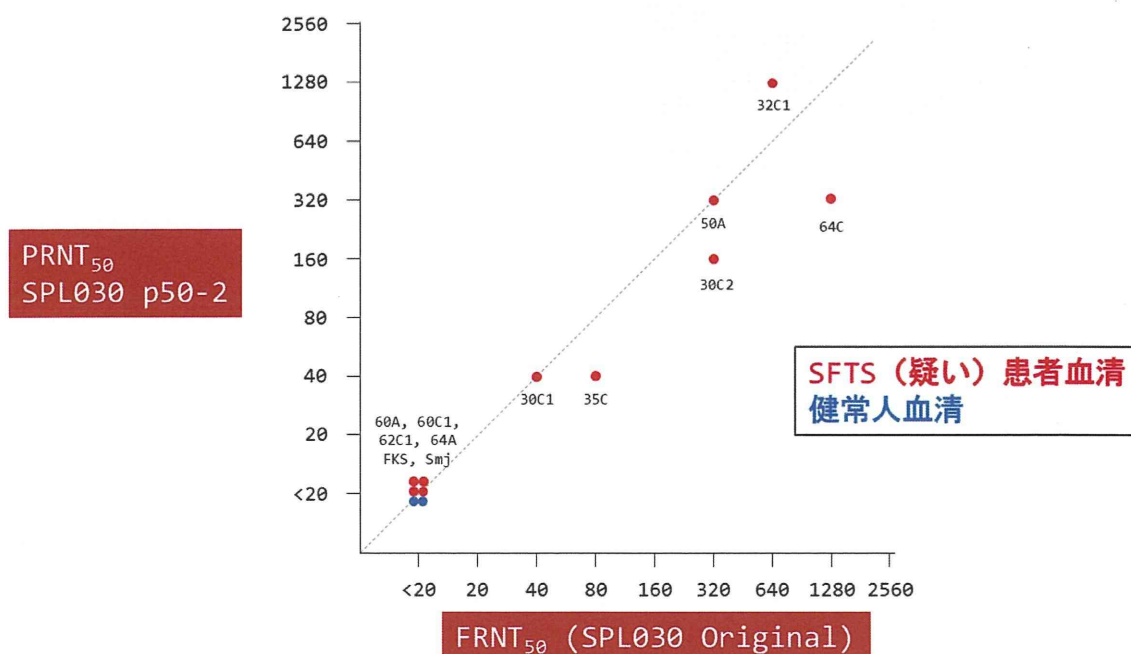


図 1: 2つの中和抗体価測定法によるヒト血清の中和抗体価の比較

GP sequence	328	1149	1382	1828	2289	2885
Original	A (110K)	T	T (461L)	C (610P)	T	G (962S)
p50-2	G (110E)	C	A (461H)	T (610S)	C	A (962N)

図 2: Original 株と p50-2 株の GP 遺伝子の差異

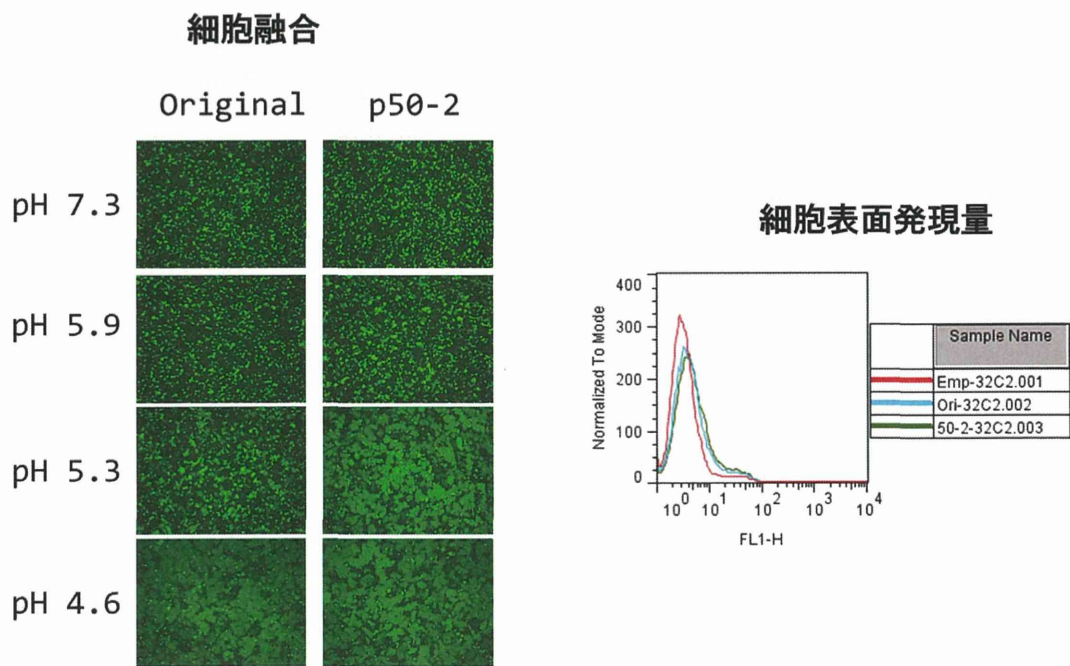


図 3: SFTS ウイルス GP 蛋白質による細胞融合と細胞表面発現量

厚生労働科学研究費補助金[新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究(H25-新興-指定-009)

SFTS の診断・治療・予防法の開発に関する研究:

重症熱性血小板減少症候群剖検症例の病理学的解析

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:	長谷川秀樹	国立感染症研究所 感染病理部・部長
	片野晴隆	国立感染症研究所 感染病理部・室長
	永田典代	国立感染症研究所 感染病理部・室長
	中島典子	国立感染症研究所 感染病理部・主任研究官
	鈴木忠樹	国立感染症研究所 感染病理部・室長

研究要旨: 新しい感染症である SFTS の有効な予防・治療法を確立するためには、その病態形成機構を正しく理解する必要がある。そのためには、ヒト症例の病理学的解析が必要不可欠である。国立感染症研究所感染病理部で、これまでに 15 例の剖検例について病理解析を行った結果、①大型リンパ球の浸潤が目立つ壊死性リンパ節炎、②節外臓器への大型リンパ球浸潤、③著しい血球貪食が SFTS の病理学的特徴であり、ウイルスは主にリンパ組織に存在する大型リンパ球で増殖していると考えられた。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日本からの数例に留まり、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。

A. 研究目的

新しい感染症である SFTS の有効な予防・治療法を確立するためには、その病態形成機構を正しく理解する必要がある。そのためには、ヒト症例の病理学的解析が必要不可欠である。ウイルス感染症の病理解析のためには、病変部においてウイルスの存在を正確に把握することができるウイルス特異的な免疫組織

化学、ISH(In situ hybridization)法、遺伝子検査などが必要不可欠である。国立感染症研究所感染病理部では SFTS の病理解析のためにこれらの検査系を確立し、SFTS の病理診断について全国の医療機関からコンサルテーションを受け付けている。そこで本研究では、SFTS の病理像を明らかにすることを目的に、これまでにコンサルテーション依頼のあった

15 例の剖検例について病理学的手法によりウイルス感染と病変との関連性について解析した。

B. 研究方法

1) 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 15 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。

2) 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(国立感染症研究所ウイルス第一部作製)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°C、20 分間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°Cで一晩インキュベートした。その後、ENVISION+(DAKO)を用いてプロトコール通り免疫染色を実施した。

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°C20 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°Cで一晩インキュベートした。その後、ENVISION+(DAKO)を用いてプロトコール通り免疫染色を実施した。

3) 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 beta-actin の検出を行った。

(倫理面からの配慮について)

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) SFTS 剖検例の病理学的解析

ほとんどの症例において、表在若しくは深部リンパ節の腫脹を認めており、それらの腫脹し

たリンパ節には Cell debris や核崩壊産物が目立つ壊死と大型リンパ球の浸潤を伴う壊死性リンパ節炎が見られた。激しい壊死がリンパ節全域に及ぶことが多いが、好中球などの顆粒球浸潤はほとんど見られなかった。SFTSV NP 抗原は、上記の所見を伴うリンパ組織に存在する大型リンパ球の細胞質と壊死部の Cell debris に検出された(図 1)。全身のリンパ節や脾臓、骨髄など網内系組織に多数の血球貪食像を認めた。一部の症例において、これらの細胞の細胞質に貪食された感染細胞と考えられる抗原陽性像が見られたが、血球貪食細胞がウイルス感染の主要な標的となっているとは考えにくい所見であった。骨髄では、著明な血球貪食像は認めるが明らかな巨核球の減少は見られず、血小板減少は産生量減少によるものであるとは考えにくい所見であった。骨髄、肝臓、脾臓、副腎などの臓器を主体に大型リンパ球浸潤、抗原陽性細胞が見られたが、明らかな節外臓器実質細胞への感染は見られなかった。また、リンパ節に抗原陽性細胞が限局する症例と腸管(図 2)や肺、腎臓、甲状腺などの全身諸臓器に抗原陽性細胞が分布する症例が存在した。全身諸臓器に抗原陽性細胞が分布する症例においては、約半数の症例において組織内毛細血管内に大型リンパ球の集簇像が見られ、同細胞にウイルス抗原陽性となり、ウイルス感染リンパ球が全身を循環していると考えられた。そのような症例においても明らかな節外臓器実質細胞への感染は見られなかった。

D. 考察

日本国内で発症した SFTS 致死例の 15 症例について病理学的解析を行った結果、壊死性リンパ節炎と血球貪食像が SFTS の病理学的特徴であると考えられた。臨床的には同様の経過をたどった致死症例ではあるが、ウイルス感染細胞分布にいくつかのパターンが存在しており、SFTS 病態形成に複数の機構が関与していることが考えられた。SFTS の病理学的解析は、日本のみで実施されている。最近、米国で SFTS ウイルスの近縁ウイルスである Hartland ウイルスの致死症例の剖検解析について報告があったが、ウイルス感染細胞は SFTS に類似していたにも関わらず、血球貪食像に乏しく、SFTS の病理像とは大きく異なっていた。今後、SFTS ウイルスと Harland ウイルスの標的細胞とその病理を比較解析していくことにより、SFTS を始めとした新しいフレボウイルス感染症の病態が明らかになることが期待される。

E. 結論

国立感染症研究所感染病理部で、これまでに 15 例の剖検例について病理解析を行った結果、①大型リンパ球の浸潤が目立つ壊死性リンパ節炎、②節外臓器への大型リンパ球浸潤、③著しい血球貪食が SFTS の病理学的特徴であり、ウイルスは主にリンパ組織に存在する大型リンパ球で増殖していると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiraki T, Yoshimitsu M, Suzuki T, Goto Y, Higashi M, Yokoyama S, Tabuchi T, Futatsuki T, Nakamura K, Hasegawa H, Saijo M, Kakihana Y, Arima N, Yonezawa S. Two autopsy cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in Japan: A pathognomonic histological feature and unique complication of SFTS. Pathology International 64(11):569-575, 2014

2. 学会発表

- 1) 長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋徹, 鈴木忠樹, 片野晴隆, 中島典子, 森川茂, 西條政幸, 倉田毅. 日本国内で発生した重症熱性血小

板減少症候群の病理解析. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, (2014. 4)

- 2) Suzuki T, Hasegawa H. Pathology and pathogenesis of emerging and re-emerging viral infections. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 神奈川, (2014. 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし.

1. 特許取得
該当なし.
2. 実用新案登録
該当なし.
3. その他
該当なし.

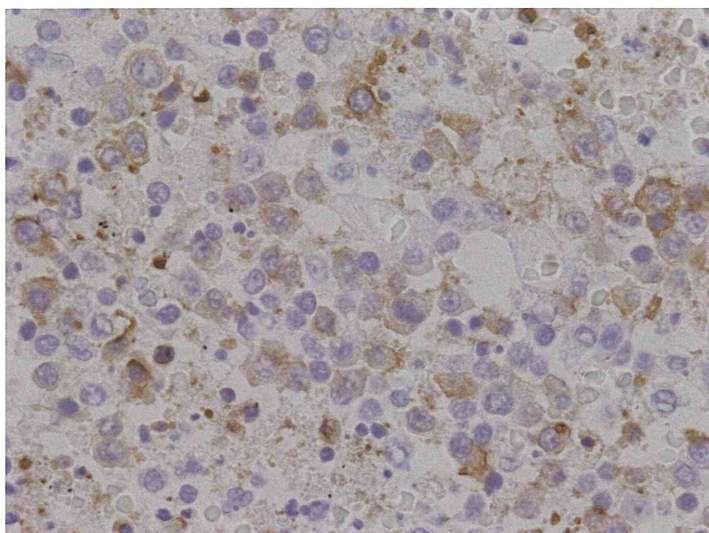


図 1. 壊死性リンパ節炎を伴うリンパ節の抗 SFTSV NP 抗体による免疫組織化学. 多数の大型リンパ球浸潤が見られ, 同細胞の細胞質と壊死した細胞残屑に抗原陽性となる.

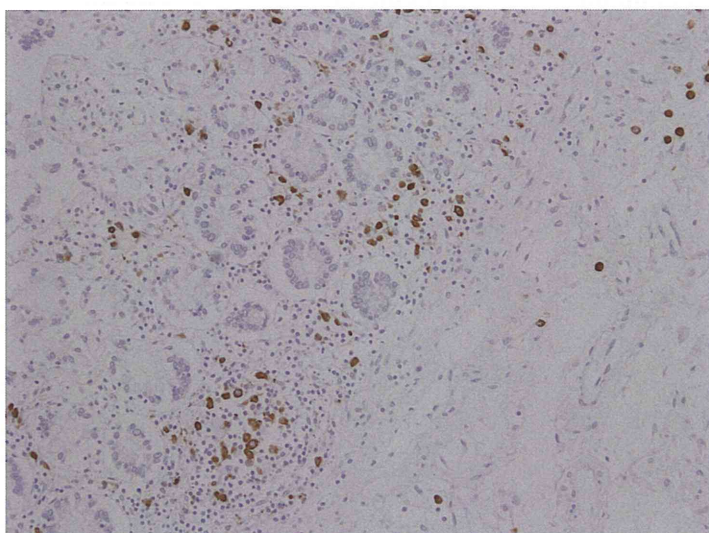


図 2. 全身諸臓器に抗原陽性細胞が見られた症例の回腸粘膜組織. 粘膜固有層にウイルス抗原陽性となる大型リンパ球の浸潤を認める. 腸管上皮細胞にウイルス抗原は検出されない.

厚生労働科学研究費補助金[新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究(H25-新興-指定-009)

SFTS の診断・治療・予防法の開発に関する研究: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との相関についての研究

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	吉河智城	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
研究協力者	下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・室長

研究要旨:重症熱性血小板減少症候群(SFTS)はダニによって媒介されるSFTSウイルス(SFTSV)により引き起こされる急性感染症であり,日本,中国,韓国で患者が報告されている.既に我々のグループは,日本で確認されたSFTSVの塩基配列を中国で確認されたウイルス株とともに分子系統学的解析を行ったところ,日本の株は中国株と比較して系統学的に独立していることを明らかにした.しかし国内初の患者確認は2013年であり,当時解析に供することができた日本の株は8株と限定されていた.そこで本研究では,より詳細な知見を得るために更に最近までの国内発生患者由来のSFTSVゲノム塩基配列の決定を行い,分子系統学的解析を行った.その結果,SFTSVはその系統樹の根から大きく2つのクレードに分けることが出来た.この分類は日本で確認された株と中国/韓国で確認された株という地理的な分布と一致した.ウイルスは8つの遺伝子型に分類可能であり,中国/韓国のクレードに5種類,日本のクレードに3種類存在していた.更に日本で確認された,いくつかの株については中国のクレードに分類されること,一方中国で確認されたいくつかの株については日本のクレードに分類されることが明らかとなった.

A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)はダニによって媒介されるSFTSウイルス(SFTSV)により引き起こされる急性感染症であり,日本,中国,韓国で患者が報告されている.既に我々のグループは,日本で確認された

SFTSVの塩基配列を中国で確認されたウイルス株とともに分子系統学的解析を行ったところ,日本の株は中国株と比較して系統学的に独立していることを明らかにした.しかし国内初の患者確認は2013年であり,当時解析に供することができた日本の株は8株と限定

されていた。そこで本研究では、より詳細な知見を得るために更に2014年の国内発生患者由来のSFTSVゲノム塩基配列の決定を行い解析に供した。

B. 研究方法

国立感染症研究所ウイルス第一部で開発した検査法により、SFTSVゲノムが含まれていることが確認された患者の血液検体からRT-PCR法及び次世代シーケンシング法を用いて、その塩基配列の決定を行った。これにより新規に決定された75株と既報の8株を含めた合計83株の日本で確認されたウイルス株を、データベース上に登録されていた中国で確認された株と韓国で確認された株を含めてL, M, S各分節ゲノムそれぞれの塩基配列について分子系統学的解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

本研究は国立感染症研究所人を対象とする医学研究倫理審査委員会において審議され、承認されている。

C. 研究結果

SFTSVはその系統樹の根から大きく2つのクレードに分けることが出来た(図1)。この分類は日本で確認された株と中国/韓国で確認された株という地理的な分布と一致した。ウイルスは8つの遺伝子型に分類可能であり、中国/韓国のクレードに5種類、日本のクレードに3種類存在していた。更に日本で確認された3株については中国のクレードに分類されること、一方中国で確認されたいくつかの株につ

いて日本のクレードに分類されることが明らかとなった。

D. 考察

系統樹の根、つまり共通祖先から直ちに分岐している2つのクレードによるウイルス株の分類と、その地理的分布が一致することからSFTSVはウイルス出現後の早い段階から日本と中国/韓国というそれぞれの地域で独立して進化を遂げてきたことが強く示唆された。日本と中国のどちらの地域においても複数株の別のクレードのウイルス株の存在が確認されたこと、そして少なくとも日本国内の患者に渡航歴は無かったことより、ウイルスは海を越えて別の地域に伝播していることが明らかとなった。

E. 結論

SFTSVの分子系統学的な特徴はその地理的分布とよく相関することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

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):816-827, 2014
- 2) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains and prediction of patient survival based on viral load. *J Clin Microbiol* 52:3325-3333, 2014
- 3) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 67: 423-427, 2014
- 4) 谷英樹, 西條政幸:重症熱性血小板減少症候群ウイルス:バイオセーフティと家族内感染および院内感染に対する対応, *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 35: 37-38, 2014
- 5) 谷英樹, 西條政幸:重症熱性血小板減少症候群(SFTS), *血液フロンティア* 24: 80-83, 2014
- 6) 福士秀悦, 吉河智城, 谷英樹, 福間藍子, 下島昌幸, 西條政幸:重症熱性血小板減少症候群の検査法, *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 35: 40-41, 2014
- 7) 下島昌幸, 西條政幸:中国での重症熱性血小板減少症候群の発生状況, *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 35: 33-34, 2014
- 8) 谷英樹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. *臨床検査* 58(4):467-473, 2014
- 9) 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS ウイルス感染症). *日本医師会雑誌 感染症診療 update* 143 特別号(2): S398-399, 2014
- 10) 西條政幸. 日本におけるマダニ媒介性ウイルス感染症の発見 -TBEとSFTS-. *小児科臨床* 67:1245-1249, 2014
- 11) 西條政幸. 新興ウイルス感染症と重症熱性血小板減少症候群. *日本臨床内科医会会誌* 29:69-76, 2014
- 12) 西條政幸. 日本における重症熱性血小板減少症候群と今後の課題. *日本内科学会雑誌* 103:2581-2586, 2014
- 13) 石堂亜希, 重岡徹, 富永貴元, 末広泰子,

福士秀悦, 下島昌幸, 西條政幸, 高橋徹.
重症熱性血小板減少症候群(SFTS)様の
症状を呈した患者における抗 SFTS ウィル
ス抗体の検討. 山口医学 63:257-261,
2014

- 14) Hiraki T, Yoshimitsu M, Suzuki T, Goto Y,
Higashi M, Yokoyama S, Tabuchi T,
Futatsuki T, Nakamura K, Hasegawa H,
Saijo M, Kakihana Y, Arima N, Yonezawa
S. Two autopsy cases of severe fever
with thrombocytopenia syndrome (SFTS)
in Japan: A pathognomonic histological
feature and unique complication of SFTS.
Pathol Int 64(11):569-75, 2014
- 15) Ohagi Y, Tamura S, Nakamoto C,
Nakamoto H, Saijo M, Shimojima M,
Nakano Y, Fujimoto T. Mild clinical course

of severe Fever with thrombocytopenia
syndrome virus infection in an elderly
Japanese patient. Case Rep Infect Dis.
2014;2014:918135.

2. 学会発表

- 1) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹,
福間藍子, 谷口怜, Harpal Singh, 須田遊
人, 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との相
関. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会,
横浜,(2014.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

M Segment

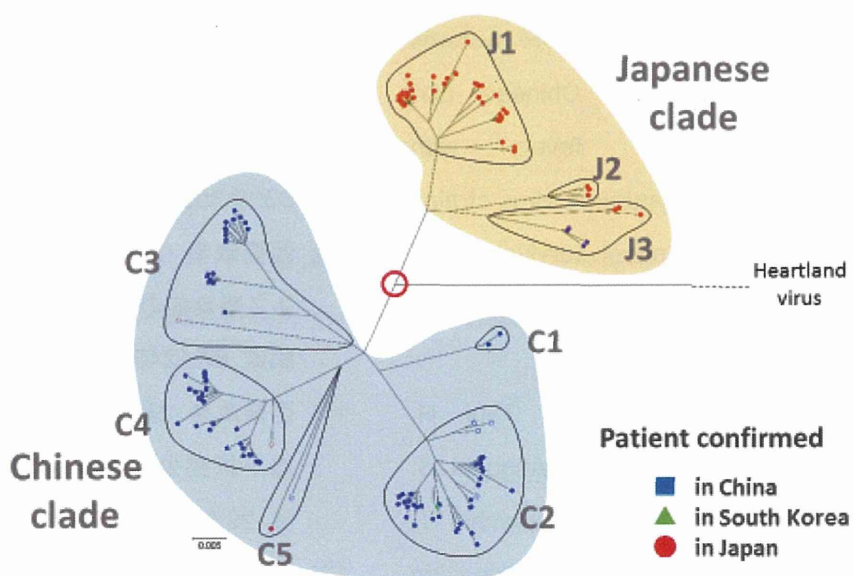


図 1. SFTSV M セグメントの系統樹

厚生労働科学研究費補助金[新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究(H25-新興-指定-009)

SFTS の診断・治療・予防法に関する研究:SFTS ウイルス抗原検出法の開発

研究分担者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・部長
研究協力者	福間藍子	国立感染症研究所ウイルス第一部・流動研究員
研究協力者	谷口怜	国立感染症研究所ウイルス第一部第一室・研究員
研究協力者	福士秀悦	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
研究協力者	谷英樹	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
研究協力者	吉河智城	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
研究協力者	下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・室長
研究協力者	森川茂	国立感染症研究所獣医科学部・部長
研究協力者	鈴木忠樹	国立感染症研究所感染病理部・室長
研究協力者	長谷川秀樹	国立感染症研究所感染病理部・部長

研究要旨:重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体を作出し、それを用いた抗原検出 ELISA 法を開発した。また、SFTS 患者から採取された病理組織中の SFTS ウイルス抗原を、このモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学法により検出できることが明らかにされた。これらの SFTS ウイルス核蛋白質検出法は SFTS の診断に有用である。

A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)は、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される新規ウイルス(SFTS ウイルス, SFTSV)によって引き起こされるダニ媒介性感染症で、ヒトにおいて致死率 10%を超える重篤な疾患を引き起こす。2013 年に日本国内における SFTS 患者の存在が明らかとなって以降、新

たな患者の発生が発生していることから、迅速で簡便な SFTS 診断法の整備が急務である。本研究では、SFTSV の核蛋白質(SFTSV-N)を認識するモノクローナル抗体を作製し、これを用いて SFTSV-N 抗原検出 ELISA 法を開発し、その診断における有用性について検討した。

B. 研究方法

1) モノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA

SFTSVのN遺伝子領域をクローニングし、バキュロウイルス発現系により組換え核蛋白質(rN)を発現させた。精製されたrNをマウスに免疫し、ハイブリドーマ細胞を作製し、SFTSV感染細胞を抗原としたELISAでモノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングした。得られたモノクローナル抗体は、間接蛍光抗体法及び免疫組織染色を用いて反応性を確認した。得られたモノクローナル抗体とrNをウサギに免疫して得られたウサギ抗rN血清を、それぞれ補足用抗体と検出用抗体とした抗原検出ELISAを開発した。SFTS疑い患者の急性期血清を用いて本ELISAのSFTSの診断における有用性を、ウイルス遺伝子検出のための定量RT-PCRと比較して検討した。

(倫理面からの配慮について)

匿名化のもと研究調査を行い、方法は国立感染症研究所内の研究倫理委員会の承認を得られたものを用いた。SFTSV-Nに対するモノクローナル抗体作製は国立感染症研究所動物実験倫理委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

1) モノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA

rNをマウスに免疫し、2つのモノクローナル抗体(9D3および2D11)を作製した。間接蛍光抗体法では、これらのモノクローナル抗体は、他のフレボウイルス(RVFLV,

Forecariah virus, Palma virus)の感染細胞には反応せず、SFTSV感染細胞特異的に反応した(図1)。また免疫組織染色の結果、これらのモノクローナル抗体はSFTSV患者組織特異的に反応した(図2)。モノクローナル抗体9D3を補足用抗体として用いた抗原検出ELISAの検出最少濃度は、rNで5 pg/100 μ lであった。ウイルスそのものを抗原として用いたところ、中国株1株(HB29株)と日本株3株はいずれも検出可能であり、検出感度は350(SPL010株)-1,220(YG1株)TCID₅₀/100 μ lであった。SFTS疑い患者の急性期血清61検体について抗原検出ELISAを行なった結果、定量RT-PCR陽性37検体中27検体が陽性であり、10⁵ copies/ml以上のウイルスRNAを含む24検体はすべて抗原検出ELISAで陽性であった。一方、10⁵ copies/ml以下の検体は抗原検出ELISAで陰性になる傾向が見られた(表1)。定量RT-PCRで陰性を示した検体はすべて陰性であった(感度73%、特異度100%)。

D. 考察

本研究において、SFTSV-Nを特異的に認識するモノクローナル抗体が得られた。また本研究で開発された抗原検出ELISAは、定量RT-PCRと比較し感度は低いものの、ウイルスRNA量の高い検体(10⁵ copies/ml以上)中のウイルス検出が可能であった。SFTS患者の血中ウイルスRNA量は、発症後10⁵⁻⁶ copies/mlに達し、死亡患者では10⁷ copies/ml以上に増加することが報告され

ている。したがって、本研究で開発された抗原検出 ELISA は、SFTS の急性期診断法の一つとして、また予後の推測に有用であると考えられた。

E. 結論

SFTSV の核蛋白質を特異的に認識する抗体が得られた。高いウイルス RNA 量を含む検体中のウイルス検出可能な抗原検出 ELISA が構築された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol* 52:3325-3333, 2014

- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S,

Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis* 67:423-427, 2014

2. 学会発表

- 1) Fukuma A, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Ogata M, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montréal, Canada. (2014.07)
- 2) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 谷英樹, 谷口怜, 鈴木忠樹, 佐藤由子, 長谷川秀樹, 下島昌幸, 西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし。

1. 特許取得
特記事項なし。
2. 実用新案登録
特記事項なし。
3. その他
特記事項なし。

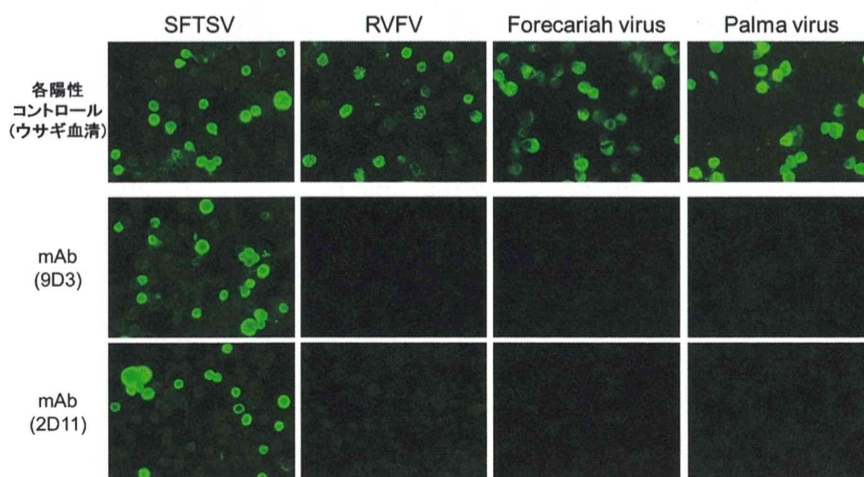


図 1. 間接蛍光抗体法による単クローン抗体の特性

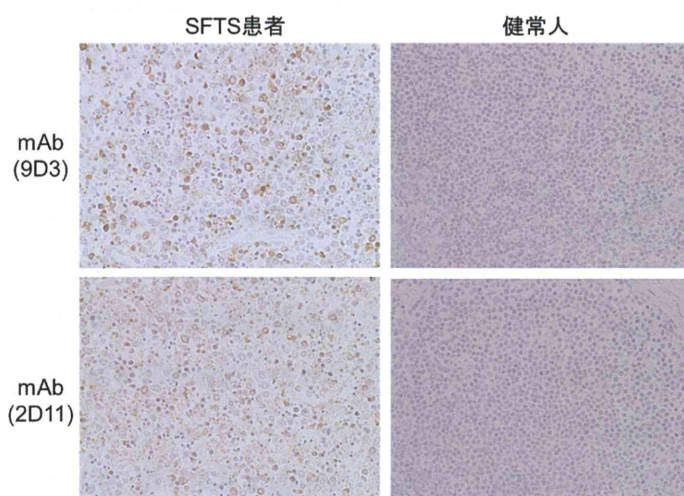


図 2. モノクローナル抗体を用いたリンパ節組織の免疫組織染色による SFTSV 抗原検出

表 1. Ag capture ELISA 法と qRT-PCR 法の比較 (SFTS 疑い患者の急性期血清, N=61)

Ag capture ELISA	qRT-PCR		(計)
	Virus RNA (copies/ml)		
	陽性(+)	陰性(-)	
	⁵ >10	⁵ <10	
陽性(+)	24	3	0 (27)
陰性(-)	0	10	24 (34)
(計)	(24)	(13)	(24) (61)

感度: 73% (27/37) 特異性 : 100% (24/24)

厚生労働科学研究費補助金[新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]
分担研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究(H25-新興-指定-009)

SFTS の診断・治療・予防法に関する研究:

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)報告症例の臨床像と感染リスク因子の推定

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	山岸拓也	同 感染症疫学センター・主任研究官
	加藤博史	同 実地疫学専門家養成コース・医師
	大石和徳	同 感染症疫学センター・センター長

研究要旨：日本における重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS) の曝露状況 (感染源, 感染リスク), 臨床経過, 治療状況を明らかにすること, また, 死亡のリスク因子を調査することを目的として症例の詳細情報を収集した. 対象は, 2013 年 1 月 1 日以降に SFTS と診断され, 感染症発生動向調査 (National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease: NESID) に届出をされた患者とし, 臨床的・疫学的情報に関して NESID で不足している情報を調査票にて郵送回収した. 対象は 97 名で, うち 40 名から回答が得られ (回収率: 41%), 致命率は約 30% であった. 農業従事者 (特に田畑での活動), 自宅周囲環境が山林であることが罹患の高リスクであると推測され, 死亡のリスクとして加齢, 神経症状, 高度な血小板減少, 腎機能障害, AST 高値, 凝固障害が挙げられた. 死亡のリスクは中国からの報告と同様であったが, 罹患リスクは評価が十分ではなく, 中国でのリスクとは違う可能性があることから, 罹患リスクを評価する研究が望まれる. また, 国内報告例は重症例に偏っており, 軽症例の診断報告の推進が重要である.

A. 研究目的

2011 年に中国で, 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による重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS) が報告された. 日本においても, 2012 年に山口県で SFTS ウイルスが分離された以降, SFTS が国内で散発的に発生していることが明らかとなった. 散発例の情報から, 西日本に流行していること, 高齢者に患者が多いこと, 臨床的特徴として血球貪食症候群, 播種性血管内凝固症候群 (Disseminated intravascular coagulation: DIC), 多臓器不全が認められる等が判明してきた. 2014 年 12 月 10 日現在, 感染症発生動向調査 (National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease: NESID) にて 107 例の症例が報告されている. しかし, 届出は情報が乏し

く, 感染源, 臨床像, 転帰などの知見は限られている. そこで, 症例に関する詳細情報を収集し, SFTS の曝露状況 (感染源, 感染リスク), 臨床経過, 死亡のリスク因子, 治療状況を明らかにすることにした.

B. 研究方法

本研究は質問紙調査 1 回で情報を収集する横断研究である. 対象は 2013 年 1 月 1 日以降に SFTS と診断され, NESID へ届出られた患者とし, 質問紙を感染症発生動向調査に届出を行った医師に郵送し, 患者カルテ等からの情報収集を行ってもらい, 返送してもらった. 患者本人または家族などの代理人に, 本研究の目的と方法について説明をしていただき, 研究参加の同意を得た. 収集した情報は NESID で不足している感染前の行動の詳細, 臨床経過, 治療状況とし,

NESID の情報と合わせて解析した。解析では、Wilcoxon 順位和検定または Fisher 正確検定を行い、有意水準は 0.05 未満とした。なお、本研究は個人情報を含んでいるが、収集した情報は国立感染症研究所で厳重に管理されており、国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得ている(受け付け番号 466)。

C. 研究結果

対象は 97 名で、うち 40 名から回答が得られ、回収率は 41%であった。女性が 25 名(63%)、年齢中央値は 76.5 歳[範囲:48-91]、生存が 28 名、死亡が 12 名で致死率は 30%であった。発症から初診までの日数は中央値 2.9 日[0-8]、発症から入院までは中央値 3.4 日[0-9]、発症から退院までの日数は中央値 30.0 日[2-347]であった。職業は無職 23 名(58%)、農業 9 名(23%)でその他主婦、建設業、会社員、水産業、畜産業等であった。活動場所は田畑 26 名(68%)、山菜取り 4 名(10%)、山林 3 名(8%)、狩猟 2 名(5%)であり、マダニ接触歴は 21 名(53%)で認められた。自宅周囲の環境は山林 23 名(58%)、住宅地 9 名(23%)、水田 7 名(18%)、河川 3 名(8%)等であった。動物接触歴は 19 名、ペット飼育歴は 19 名(いずれも延べ数)であった。

症状・所見は発熱 37 名(93%)、全身倦怠感 33 名(82.5%)、下痢 31 名(77.5%)、意識障害 23 名(57.5%)、リンパ節腫大 19 名(47.5%)、刺し口 19 名(47.5%)等であった。初診時血液検査所見の中央値はそれぞれ Hb が 14.1g/dL、WBC が 1750/ μ L、Plt が 6.8 万/ μ L、AST が 120.5IU/L、ALT が 51.5IU/L、LDH が 407IU/L、Cr が 0.94mg/dL、Na が 135mEq/L、K が 4.0mEq/L、Cl が 100mEq/L、PT-INR が 1.0、APTT が 41.7s、Fib が 219mg/dL、CRP が 0.7mg/dL であった。

生存例と死亡例を分けて比較したところ、死亡例では、加齢($p=0.02$)、意識障害($p<0.01$)、痙攣($p<0.01$)、DIC ($p<0.01$)があることと、血小板数低値($p=0.03$)、AST 高値($p=0.01$)、Cr 上

昇($p=0.03$)、PT-INR・APTT 延長($p=0.02$)、Fib 低下($p=0.01$)が有意であった。

D. 考察

今回の調査において、高齢女性の罹患率が高かった。中国からの報告では、年齢中央値は 50 歳~60 歳程度であり、明らかな性差は認めなかった^{1,2)}。これは日本における女性の高齢化による影響が示唆された。また、職業は高齢者が多いことを反映して無職が多かったが、農業従事者が 23%と多く、特に田畑での活動が罹患のリスクである可能性が示唆された。また、Liu らの報告と同様に、自宅周囲が山林である症例がおおく、このことも罹患の高リスクであると推測された⁴⁾。動物との接触例も多く認めており、高リスクである可能性があると考えられた。しかし、罹患リスクに関しては対照を置いて比較していないため、今回の検討からは明らかにはならなかった。症状所見では発熱が最も多かったが、初診時に発熱がなかった人も認められた。また、中国からの報告と同様、高率に全身倦怠感を認め、下痢などの消化器症状、リンパ節腫大も多かった¹⁾。刺し口は約半数でみられ、診断の一助となると思われたが、刺し口の無い場合も SFTS は否定できないと考えられた。

死亡のリスクは加齢、神経症状(意識障害や痙攣)、高度な血小板減少、腎機能障害、AST 高値、凝固障害であった。これは、Deng らの報告と同様の結果であった³⁾。Deng らは急性肺障害が死亡のリスクになるとしていたが、今回の調査症例においては肺障害の存在は明らかではなかった³⁾。

今回の報告では致命率が約 30%であり、中国からの初期に報告された致死率と同様であり、10%未満という最近の報告よりかなり高い値であった⁴⁾。感染症法に基づく報告が依然重症例の報告に偏っている事が改めて示された。国内における軽症例を含めた症例の把握は SFTS の疫学を明らかにする上で大きな課題であると考えられた。

制限としては回収率が約 40%であり、症例数

も少ないことから検出力が小さいこと、発症から長期間経過していた患者や死亡した患者では思いだしバイアスの影響があること、横断研究で対照を置いていないことから感染リスクに関しては因果関係が不明であることが挙げられる。

E. 結論

本研究により、日本において罹患リスクは農業従事者(特に田畑での活動)、自宅周囲が山林であることであると推測され、死亡リスクは高齢で神経症状を呈し、高度な血小板減少、腎機能障害、AST 高値、凝固障害を認めている症例であると考えられた。

参考文献

- 1) Liu W, et al. Case-fatality ratio and effectiveness of ribavirin therapy among hospitalized patients in china who had severe fever with thrombocytopenia syndrome. Clin Infect Dis 57:1292-9,2013
- 2) Ding F, et al. Risk factors for bunyavirus-associated severe Fever with thrombocytopenia syndrome, china. PLoS Negl Trop Dis 8:e3267, 2014
- 3) Deng B, et al. Clinical features and factors associated with severity and fatality among patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome Bunyavirus infection in Northeast China. PLoS One 8: e80802, 2013
- 4) Liu Q, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis. Lancet Infect Dis 14:763-72, 2014

なお、本研究は日本 SFTS 疫学研究グループ (JSERG)により行われた。研究グループのメンバーは以下の通りである。

金子政彦(市立宇和島病院)、上原なつみ(県立延岡病院)、高津宏樹(公立豊岡病院)、渡邊真也(岡山協立病院)、阿部道雄(国保水俣市立

総合医療センター)、末盛浩一郎(愛媛大学医学部附属病院)、坂本愛子(松山赤十字病院)、中野綾子(徳島県鳴門病院)、小川貴司(四万十市立市民病院)、林俊輔(周東総合病院)、丸橋朋子(徳島大学病院)、宮原正晴(唐津赤十字病院)、山口昌明(対馬いずはら病院)、本間義人(愛媛県立中央病院)、亀甲真弘、城元里朋、柴田啓祐(鹿屋医療センター)、田中康博、川畑和代(指宿医療センター)、近藤憲保(国保勝浦病院)、山本優美(長崎大学病院)、谷岡大輔(岩国医療センター)、和田正文(上天草総合病院)、村上雄一(喜多医師会病院)、松本菜穂子(呉医療センター)、林正(林内科医院)、渡辺光章(済生会広島病院)、眞田功(荒尾市民病院)、北尾章人(公立豊岡病院)、山本千恵(愛媛県立中央病院)、仙波尊教(市立八幡浜総合病院)、原田正氣(原田内科医院)

(順不同・敬称略、国立感染症研究所職員を除く)

F. 健康危険情報

なし

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

福間藍子, 谷口怜, Harpal Singh, 須田遊人, 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との相関. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014.11)

2. 学会発表

- 1) 山岸拓也, 他. 2013 年に発症した重症熱性血小板減少症候群 40 例のまとめ. 第 88 回日本感染症学会学術講演会, 福岡, (2014. 6)
- 2) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹,

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 症例の基本情報 1 (n=40)

年齢	中央値	[範囲]
	76.5	[48-91]
性別	症例数	%
女性	25	62.5
転帰		
生存	28	
死亡	12	30
報告県		
愛媛県	13	32.5
鹿児島県, 徳島県	5	12.5
熊本県, 山口県	3	7.5
兵庫県, 広島県, 高知県, 長崎県	2	5.0
岡山県, 宮崎県, 佐賀県	1	2.5
発症からの期間	日数	範囲
発症～初診	2.9	0-8
発症～入院	3.4	0-9
発症～退院	30.0	2-347

表 2 症例の基本情報 2 (n=40)

職業	症例数	%
農業	9	22.5
主婦	2	5.0
建設業	1	2.5
会社員	1	2.5
水産業	1	2.5
畜産業	1	2.5
養蜂業	1	2.5
自動車整備	1	2.5
無職・不明	23	57.5
動物		
イヌ	7	17.5
ネコ	5	12.5
ウシ	2	5.0
シカ	2	5.0
イノシシ	2	5.0
ネズミ	1	2.5
ペット		
イヌ	10	25.0
ネコ	9	22.5
自宅周囲環境		
山林	23	57.5
住宅地	9	22.5
水田	7	17.5
河川	3	7.5
市街地	2	5.0
茶畑	1	2.5
不明	6	15.0
活動場所		
田畑	27	67.5
山菜とり	4	10.0
山林	3	7.5
狩猟	2	5.0
接触歴		
マダニ	21	52.5

表 3 転帰別 基本情報

	合計(n=40)	生存(n=28)	死亡(n=12)	RR	信頼区間	P 値
疫学情報						
性別						
男性	15	11 (73%)	4 (27%)			
女性	25	17(68%)	8(32%)	0.85	0.34-2.13	0.72
年齢, 歳 [範囲]	76.5[48-91]	69[48-87]	82.5[53-91]			0.02
発症～初診(日)	2.8	2.7	2.8			0.98
発症～入院(日)	3.5	3.7	2.8			0.36
発症～死亡(日)	—	—	7.6			

表 4 転帰別 症状

	合計(n=40)	生存(n=28)	死亡(n=12)	リスク比	95%信頼区間	P 値
症状						
発熱	37	25	12	1.12	0.99-1.27	0.24
全身倦怠感	32	22	10	1.05	0.96-1.14	0.50
下痢	31	22	9	1.04	0.74-1.46	0.82
意識障害	23	11	12	2.36	1.51-3.70	0.0008
リンパ節腫大	19	15	4	0.71	0.32-1.57	0.35
刺し口	19	17	2	0.42	0.13-1.40	0.06
腹痛	18	14	4	0.76	0.34-1.7	0.48
嘔吐	14	9	5	1.39	0.62-3.12	0.45
筋肉痛	11	9	2	0.67	0.18-2.46	0.52
紫斑	11	7	4	1.30	0.48-3.5	0.62
関節痛	10	9	1	0.37	0.06-2.4	0.22
震戦	9	5	4	2.0	0.67-5.96	0.22
脱力	8	5	3	1.6	0.48-5.36	0.46
頭痛	7	6	1	0.55	0.08-3.81	0.52
構音障害	5	3	2	1.45	0.28-7.5	0.66
痙攣	5	1	4	9.09	1.14-72.29	0.002
歯肉出血	5	3	2	1.67	0.33-8.52	0.54
下血	5	3	2	1.45	0.28-7.50	0.66
肝脾腫	4	2	2	2.2	0.36-13.47	0.37
吐血	2	0	2	-	-	0.03
咳嗽	1	1	0	-	-	0.53
視野狭窄	1	1	0	-	-	-
DIC	25	10	11	2.29	1.38-3.81	0.004

表 5 転帰別 初診時血液検査

	合計 (n=40)	範囲	生存 (n=28)	範囲	死亡 (n=12)	範囲	P 値
血液検査							
Hb(g/dL)	14.1	9.8-18.9	14.2	10.4-17.7	13.1	9.8-18.9	0.23
WBC(/ μ L)	1750	560-6700	1760	800-6700	1400	570-5460	0.57
Plt ($\times 10^4$ / μ L)	6.8	1.9-22.6	8.3	2.8-22.6	4.6	1.9-37.0	0.03
AST(IU/L)	121	25-3210	97	25-649	259	33-3210	<0.01
ALT (IU/L)	52	12-2736	47	12-224	76	16-2736	0.06
LDH (IU/L)	407	138-2736	404	138-1406	769	218-2736	0.12
TP(g/dL)	6.4	5.4-7.4	6.4	5.9-7.4	6.3	5.4-7.1	0.27
Alb(g/dL)	3.7	2.1-4.2	3.8	3.1-4.2	3.1	2.1-4.1	0.07
BUN(mg/dL)	23.3	8.2-152.0	22.3	8.2-152	29.5	13-85.5	0.05
Cr(mg/dL)	0.94	0.51-4.89	0.83	0.52-4.89	1.15	0.51-3.20	0.03
Na (mEq/L)	135	121-144	135	121-144	134	130-138	0.81
K (mEq/L)	4.0	2.7-4.9	3.7	2.7-4.7	4.2	3.4-4.9	0.06
Cl (mEq/L)	100	86-113	100	86-1069	100	95-113	0.42
Ca (mg/dL)	8.1	6.1-9.0	8.2	6.1-9.0	7.9	7-8.3	0.30
Ferritin(ng/mL)	930	69-20100	1264	139-20100	338	69-1432	0.23
PT-INR	1.0	0.6-1.5	0.94	0.74-1.18	1.06	0.64-1.49	0.02
APTT(sec)	41.7	29.9-64.1	37.7	29.9-58.0	45.0	35.9-64.1	0.02
Fib(mg/dL)	219	2-928	228	152-347	158	103-280	0.01
FDP (μ g/mL)	10.8	2.0-928.0	8.7	1.7-118.0	21.2	5.3-928.0	0.09
D-dimer(μ g/mL)	5.2	0.9-55.3	3.64	0.9-55.3	7.8	1.2-33.6	0.23
CRP(mg/dL)	0.7	0-11.4	0.13	0-1.52	0.4	0-11.4	0.26

厚生労働科学研究費補助金[新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究(H25-新興-指定-009)

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, 安藤秀二, 川端寛樹, 新倉綾, 木村昌伸, 藤田修, 今岡浩一, 宇田 晶彦, 加来義浩, 野口章, 新井智(国立感染症研究所)	
研究協力者	高田伸弘(福井大学医学部)	
研究協力者	藤田博己(馬原アカリ医学研究所)	
研究協力者	高野愛, 前田健(山口大学共同獣医学部)	
研究協力者	岸本壽男(岡山県環境保健センター)	
研究協力者	四宮博人(愛媛県立衛生環境研究所)	
研究協力者	苺和宏明(北大獣医)	
研究協力者	有川二郎(北大医学部)	
研究協力者	澤洋文(北大人獣共通感染症リサーチセンター)	
研究協力者	水谷哲也(東京農工大)	
研究協力者	柳井徳麿(岐阜大)	
研究協力者	西園晃(大分大学医学部)	

研究要旨：SFTSV はマダニ媒介性であり、その感染環には吸血される動物が重要な役割を果たしている。SFTSV の感染環が人の生活圏と重複することにより SFTS 患者の発生リスクは上昇すると考えられる。そこで初年度に引き続き、1) 各種動物の血清疫学を実施し、2) 国内の SFTSV の宿主・媒介マダニ種の同定とその分布を調査した。その結果、最も広範囲に調査したニホンジカでは、青森県、岩手県、宮城県、栃木県、群馬県、静岡県、山梨県、長野県、岐阜県、三重県、滋賀県、京都府、兵庫県、鳥取県、島根県の 15 自治体を調査し、全体で 18.6%が抗体陽性であった。昨年度までの調査結果(2007 年からの保管血清及び 2013/2014 年狩猟期の捕獲されたニホンジカ血清)と併せると、1) 少なくとも 2007 年には抗体陽性シカが存在し患者発生自治体では高い抗体陽性率であること、2) 患者発生自治体ではシカの抗体陽性率は有意に高いこと、3) 患者非発生自治体でもシカの抗体陽性率がこの 2 年間で上昇している自治体、2 年間比較的高い陽性率である自治体が存在した。また、イノシシやウサギでは 2005 年には抗体陽性動物がいたことから、国内のは SFTS ウイルスが 10 年以上前から存在していると推定される。一方、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。これらの結果から、野生動物やイヌでの血清疫学調査を継続して実施することにより、SFTS 発生リスクを評価できると考えられる。

A. 研究目的

SFTS は、中国で 2009 年に新興し 2011 年に原因ウイルスが同定された新興ウイルス感染症である。中国では年間 2,000 人程の患者が発生している。国内でも 2013 年 1 月に初症例が確定診断され、その後患者発生が続いて報告されている。韓国でも同様に患者が報告されている。国内の患者は、九州、四国、中国、近畿地域の 15 県で確認されており、これまでに 110 例の報告があり致死率は 29%と極めて高い。

SFTS ウイルスはブニヤウイルス科フレボウイルス属のウイルスで、ダニにより媒介されるため、自然界ではダニと動物間で感染環を形成していると考えられる。中国では、流行地の山羊、ヒツジ、牛などがウイルスの感染環に重要な役割を果たしていると考えられている。初年度の調査で、日本では野生動物等とマダニによる感染環が形

成されていることが示唆された。このため、本年度は昨年度に引き続き、動物の疫学的調査を行いウイルスの分布や抗体陽性率の変動があるかを調査した。また、ウイルス保有マダニの調査を実施して、その分布を明らかにし自然界におけるマダニと動物間での SFTS ウイルスの感染環をより詳細に理解することを目的とする。

B. 研究方法

1) 各種動物からの SFTS ウイルス特異的抗体の検出：SFTS ウイルス HB29 株(中国 CDC, Prof. Li Dexin より分与)感染 Huh7 細胞の 1% NP40/PBS 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 分間可溶性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 照射して、ニ

重に不活化した。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 倍を使用希釈とした。

- 2) 間接蛍光抗体法(IF 法)は、HeLa W229 細胞を用いた。HeLa W229 細胞に SFTS ウイルス HB29 株を感染後、細胞を 2 代継代し、ほぼ全細胞がウイルス抗原陽性となることを確認した。その後、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 スライドグラスにスポットし、安全キャビネット内で UV 照射下、2 時間以上風乾した後、アセトン固定して IF 法の抗原とした(図1)。
- 3) MGB プローブによる TaqMan-リアルタイム RT-PCR を用いたマダニからの SFTS ウイルス遺伝子検出: 昨年開発された MGB プローブによる TaqMan-リアルタイム RT-PCR を用いた。各地で捕獲されたマダニのダニ種を研究協力者の藤田博己所長(馬原アカリ医学研究所)らが形態学的に同定し、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。抽出 RNA の 1/10 を用いて、リアルタイム RT-PCR で SFTS ウイルス遺伝子の検出した。

(倫理面からの配慮について)

抗 SFTS ウイルス 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み換え精製 SFTS ウイルス NP を、動物実験委員会により承認された動物実験によりウサギに免疫して作製した。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等を用いた。また、大日本猟友会に依頼して狩猟期に採取された野生のニホンジカ等の血液及び動物に付着していたマダニを用いた。

C. 研究結果

- 1) 国内のニホンジカにおける SFTS ウイルス抗体保有状況: 2014 年 11 月から 2015 年 2 月の狩猟期に捕獲されたニホンジカ 404 頭の血清中の抗体の有無を調べた。調査対象としたのは、青森県、岩手県、宮城県、栃木県、群馬県、静岡県、山梨県、長野県、岐阜県、三重県、滋賀県、京都府、兵庫県、鳥取県、島根県の 15 自治体である。その結果、全体で 18.6% が抗体陽性であった(表 1)。昨年度までの調査結果(2007 年からの保管血清及び 2013/2014 年狩猟期の捕獲されたニホンジカ血清)と併せると、1) 少なくとも 2007 年には抗体陽性シカが存在し流行地では高い抗体陽性率であること、2) 流行地のシカの抗体陽性率はその後高い率で推移していることが明らかとなった。ニホンジカの抗体陽性率を SFTS 患者発生自治体と非発生自治体と比較すると、前者で 40.1%、後者で 9.2% と有意に前者が高かった。非発生自治体でもニホンジカの抗体陽性率がこの 2 年間で上昇している自治体(静岡県、三重県)、2 年間比較的高い陽性率である自治体(宮城県、京都府)が存在した(表 2)。なお、データに集計していないが、研究協力者の苅和(北大獣医)による調査でも、北海道のエゾシカからは、抗体が検出されていない(計 315 頭; 斜里町ウトロ 139 頭、標津町 139 頭、札幌 18 頭、静内 19 頭)。

- 2) 国内のイノシシにおける SFTS ウイルス抗体保有状況: これまでの調査で 2005 年(鹿児島), 2007 年(愛媛, 熊本), 2008 年(愛媛, 熊本, 広島), 2009 年(愛媛), 2010 年(愛媛, 高知, 徳島), 2011 年(愛媛, 香川)に抗体陽性動物が確認された。
- 3) 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, 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。徳島県では平成 23 年から 25 年に收容されたイヌの抗体陽性率は 12.6%(20/159), 愛媛県では平成 25 年の屋外飼育犬が 9.1%(3/33), 收容犬が 14.3%(2/14)であった。
- 4) 協力研究者の西園(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。
- 5) 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。協力研究者の前田(山口大学共同獣医学部)の調査は, 別途まとめた(「特定地域における動物の SFTSV の疫学とリスク評価の研究」を参照)。また, 協力研究者の有川(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。また, ネコは調査した全ての検体が陰性であった。
- 6) 国内における SFTS ウイルス保有マダニの分布:九州から北海道にかけて, 27 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。その結果, SFTS ウイルス保有マダニは, これまでに SFTS 患者が確認されている自治体に加えて, SFTS 患者が報告されていない自治体でも確認された(図3)。一方, 協力研究者の澤(北大人獣共通感染症リサーチセンター)の調査でも, 北海道のヤマトチマダニから SFTS ウイルス遺伝子が検出された(「国内外において採集したダニを対象とした SFTSV ゲノムの検出」を参照)。なお, 植生マダニでは, 数匹をプールした検体から遺伝子検出を行っている。6798 匹のマダニ(2839 プール)中 458 プールが陽性であることから, 個体別の陽性率は 6.7~16.1%の範囲になる。一方, シカ付着マダニは, 全て 1 匹から遺伝子を検出し 1001 匹中 439 匹が陽性(43.9%)となった。後者が, 有意に陽性率が高い。遺伝子が検出されたマダニ種は, 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, タカサゴチマダニ, ヒゲナガチマダニ等で, *Amblyomma* 属, *Haemophysalis* 属から遺伝子が検出された。

D. 考察

中国では, SFTS ウイルスの感染環に反芻獣の家畜である山羊, 羊, 牛と犬などが重要な役割を果たしていると考えられている。国内では, これまでの調査からシカ等の野生動物と犬等がウイルスの感染環に重要な役割を果たしていると考えられる。大規模に調査されたニホンジカの血清疫学から, 1)患者発生自治体では非発生自治体と比

較して有意に抗体陽性率が高いこと、2)2年間の調査で患者発生自治体では、徳島県を除いて高い抗体陽性率を維持していること、3)徳島県のニホンジカは抗体保有率が非常に低いこと(犬などでは抗体陽性動物がいる)、4)患者が発生していない自治体で、2013年度から2014年度にかけて抗体陽性率が上昇している自治体があること、5)東北でも2年間にわたって比較的高い抗体陽性率の自治体があること、等が明らかとなった。

他の動物種でこの2年間で有意に抗体陽性率の上昇した動物種が明らかになった自治体があり(「特定地域における動物のSFTSVの疫学とリスク評価の研究」を参照)、SFTS患者が発生したことから、動物の血清疫学データはSFTS発生リスクを推定する指標として有用であると考えられる。ただし、同じ自治体でも地域によって陽性率に差が認められることから、リスク評価には慎重な解析が求められる。このためにも、継続した動物の血清疫学的解析を行う必要がある。

一方、マダニからのSFTSウイルス遺伝子の検出は、調査したほとんどの自治体で検出されるが、抗体陽性動物の分布とは必ずしも一致しない。非常にウイルスRNAコピー数の低いマダニが、実際に感染しているのか、あるいは痕跡としてRNAが残存しているのか等不明の点も多い。これらは、今後の課題である。

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結果、九州から北海道の多くの自治体で、タカサゴキララマダニ、フタゲチマダニ、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。一方、ニホンジカや多くの野生動物及び犬などで抗体保有動物が見出されたことから、多くの動物種がSFTSウイルス感受性であることがわかった。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。

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も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。

F. 健康危険情報

中国で囧動物をおいた成績や、動物への感染実験から、動物は感染しても発症しない可能性が強い。ただし1型インターフェロンレセプターKOマウスでは致死感染を起こすことから、生後間もない動物などではより感受性が高い可能性がある。ただし、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.* 2014, 209(6):816-27.
- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
- 3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol* 2014 52(9):3325-33.
- 4) 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
- 5) 森川茂:重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の概要. 獣医畜産新報67(3):167-170, 2014
2. 学会発表
- 1) 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, 札幌, 2014年9月9-12日
- 2) 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, 札幌, 2014年9月9-12日
- 3) 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, 札幌, 2014年9月9-12日
- 4) 浜崎千菜美, 鎌田龍星, 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, 札幌, 2014年9月9-12日
- 5) 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, 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日

- 6) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日
- 7) 前田健, 濱崎千菜美, 下田宙, 鎌田龍星, 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, 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日
- 8) 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, 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日
- 9) Morikawa S, Kimura M, Fukushi S, Fukuma A, Kaku Y, Paku U, Tani H, Yoshikawa T, Imaoka K, Shimojima M, Saijo M, Maeda K. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
- 10) Fukuma A, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Ogata M, Shimojim M, Morikawa S, Saijo M. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July-

1Aug 2014

- 11) Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Ogata M, Morikawa S, Saijo M. 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.
- 12) Uda A, Kawabata H, Fukushi S, Kaku Y, Shimojima M, Ando S, Maeda K, Fujita H, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa T, Niikura A, Kyoko S. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
- 13) Morikawa S, Uda A, Kimura M, Kawabata H, Fukushi S, Fukuma A, Kaku Y, Paku U, Tani H, Yoshikawa T, Niikura A, Ando S, Kyoko S, Fujita H, Imaoka K, Shimojima M, Saijo M, Maeda K. 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

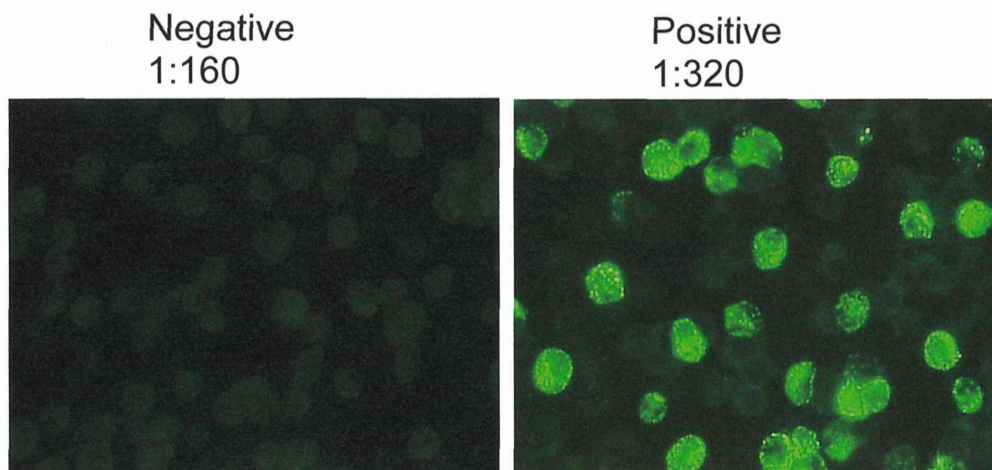


図1. 間接蛍光抗体法(IF法). HeLa W229細胞を用いたIF法. 抗体陽性血清では, 細胞質内に顆粒状に染色される特異像が観察される.

表1. 野生のニホンジカにおけるSFTSV抗体陽性率(2014年11月から2015年2月に捕獲)

	陽性数	検体数	陽性率(%)
青森県	1	1	100.0
岩手県	0	36	0
宮城県	9	24	37.5
栃木県	1	32	3.1
群馬県	1	25	4.0
山梨県	1	36	2.8
長野県	1	35	2.9
岐阜県	1	33	3.0
静岡県	9	33	27.3
三重県	6	20	30.0
滋賀県	4	29	13.8
京都府	5	23	21.7
兵庫県	11	30	36.7
鳥取県	3	18	16.7
島根県	22	29	75.9
	75	404	18.6

表 2. 野生のニホンジカにおける SFTSV 抗体陽性率の2年間の推移

道府県	2013/14			2014/15		
	陽性	総数	陽性率	陽性数	検体数	陽性率
北海道	0	25	0%			
青森				1	1	100%
岩手	0	30	0%	0	36	0%
宮城	5	15	33%	9	24	38%
福島	0	4	0%			
栃木	0	21	0%	1	32	3%
群馬	0	20	0%	1	25	4%
山梨	0	24	0%	1	36	3%
長野	2	31	6%	1	35	3%
岐阜	0	27	0%	1	33	3%
静岡	2	20	10%	9	33	27%
三重	3	23	13%	6	20	30%
京都	5	19	26%	5	23	22%
滋賀	3	26	12%	4	29	14%
兵庫	8	23	35%	11	30	37%
鳥取				3	18	17%
島根	13	19	68%	22	29	76%
愛媛	4	20	20%			
徳島	1	111	1%			
合計	46	458	10%	75	404	19%

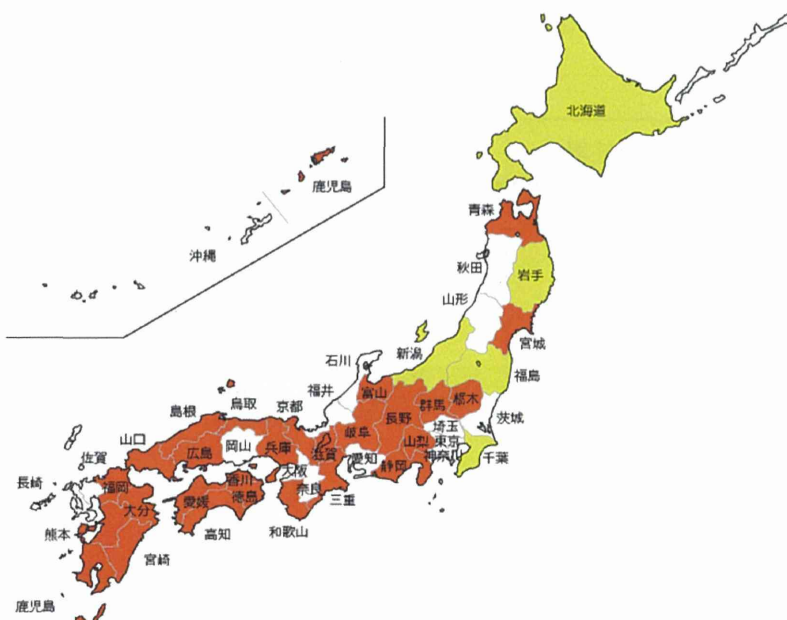


図 2. 抗体陽性動物が分布する自治体静岡県, 三重県では, 2013 年度に比べて 2014 年度のシカの抗体陽性率が上昇している. 宮城県, 京都府では, この 2 年間比較的高い抗体陽性率が維持されている. これまでの調査で, シカ, イノシシ, イヌ, ウサギで抗体陽性動物が見つかった自治体を赤く, 調査したが陽性動物が見つかっていない自治体を黄色で示した. 白は未調査自治体.

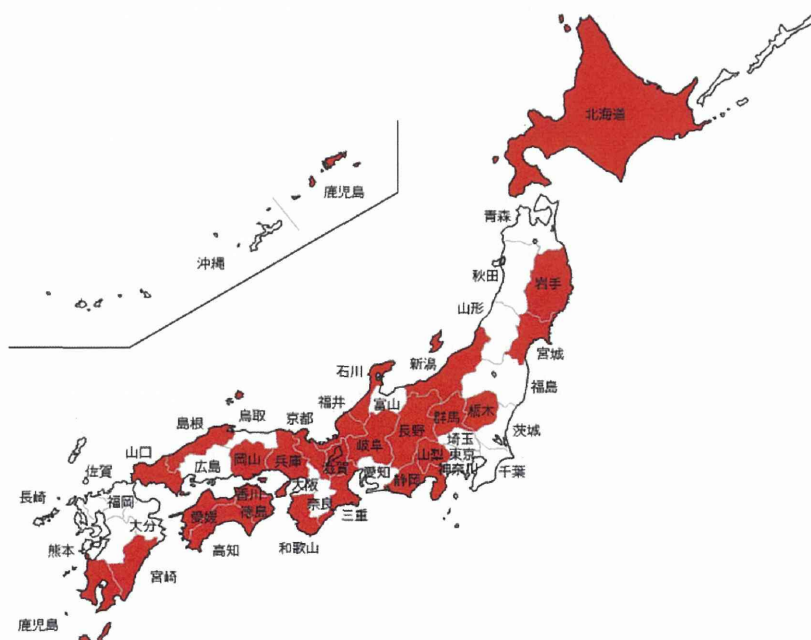


図 3. 国内の植生マダニ, 動物付着マダニで SFTS ウイルス RNA が検出された自治体. 赤は, 植生あるいは動物付着マダニで SFTS ウイルス RNA が検出された自治体. 白は, 未調査あるいは調査したマダニ数が数匹の自治体.