

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(VSVΔG)に SFTSV のエンベロープ蛋白質(GP)を外殻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-α、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。

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、SFTSV_{pv} 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(SFTSV_{pv})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(LASV_{pv})、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(MLV_{pv})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 SFTSV_{pv} 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°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- α (1×10^3 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 μ g 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 エンベ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)のエンベ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

て行った。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) バフィロマイシン 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°C 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/mm³)と血小板数(8.9 × 10⁴/mm³)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 3.5×2.0cm 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。脾臓と骨髓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。骨髓、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-α 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 ~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(α E 鎖, α 鎖, β 鎖および γ 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 依存的事であることから、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- α , 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- α 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① S1P によって直接制御されている, もしくは② 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

SFTSV_{pv} 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- α 、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質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, 福士秀悦, 下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第1部	SFTSV の感染機構の解析
鈴木忠樹	国立感染症研究所感染病理部	SFTS 症例の病理学的解析
安田二郎	長崎大学熱帯医学研究所	抗 SFTSV 薬の検討
西園晃, 山田健太郎	大分大学医学部	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

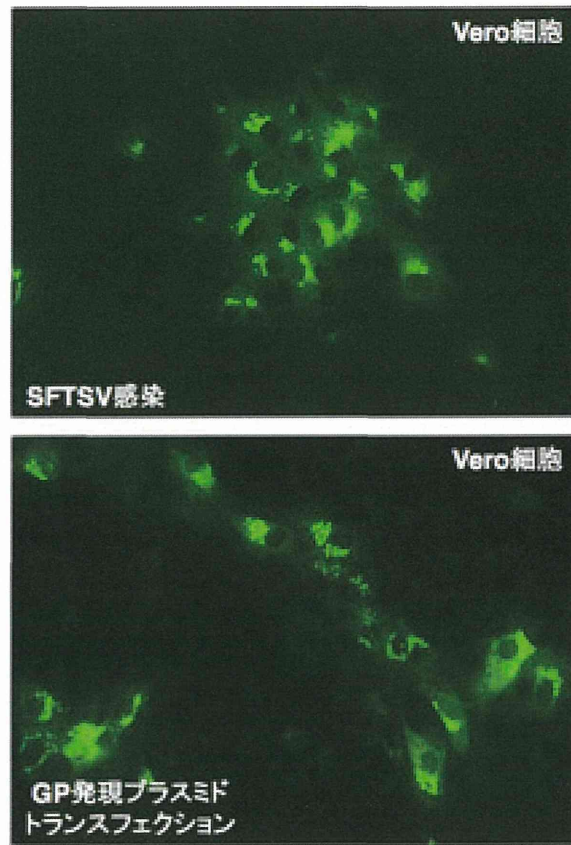


図 1. SFTSV-GP 蛋白質の細胞内局在

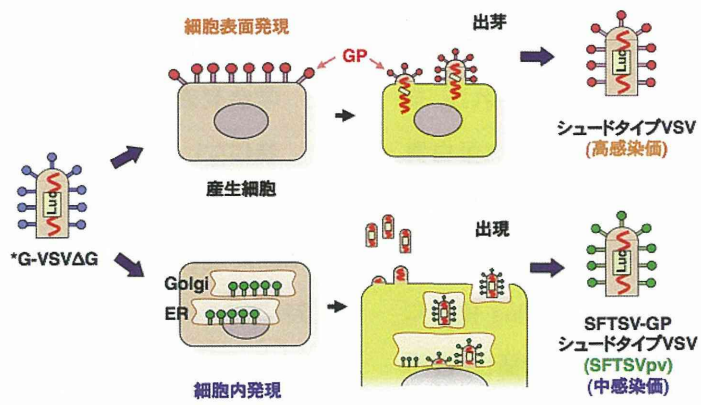


図 2. SFTSV-GP シュードタイプ VSV (SFTSVpv)

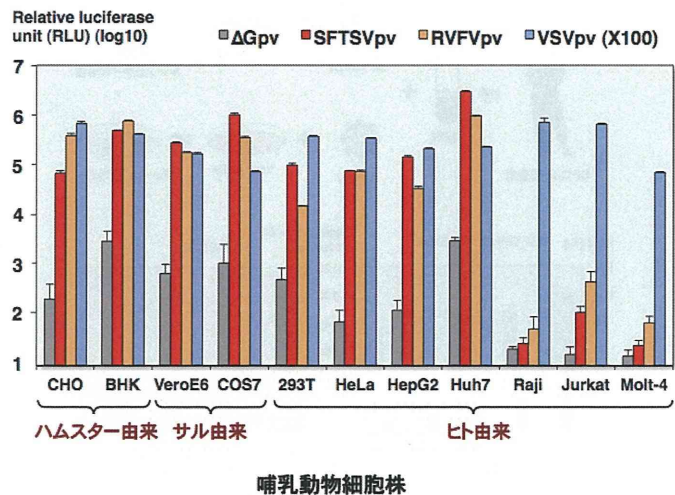


図 3. SFTSVpv の各種哺乳動物細胞への感染性

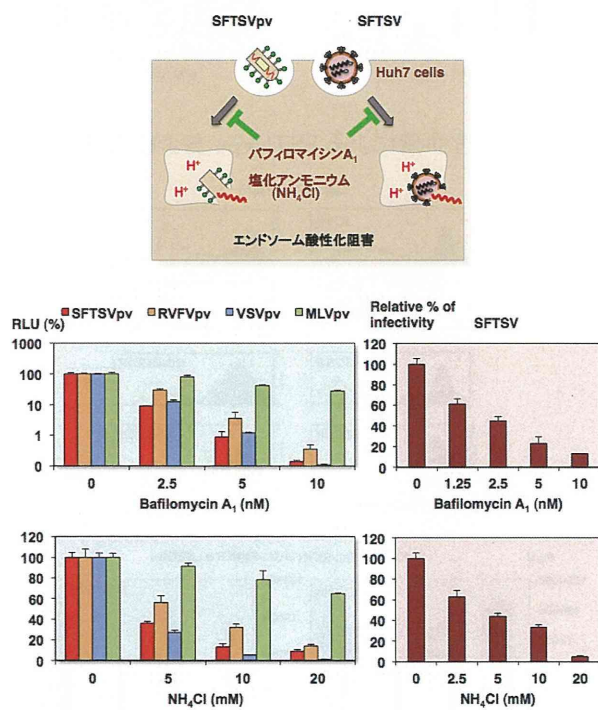


図 4. H⁺-ATPase 阻害剤による SFTSVpv および SFTSV の感染阻害

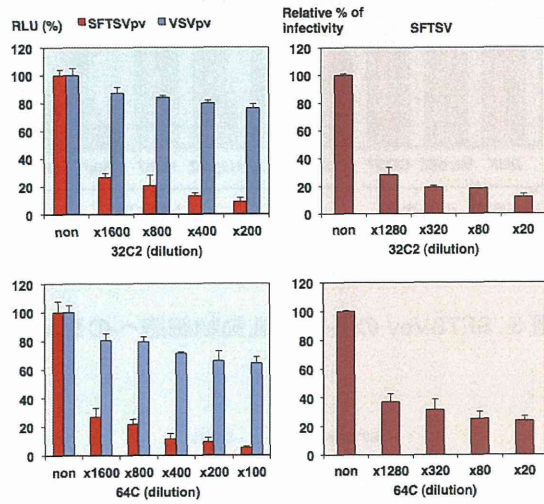
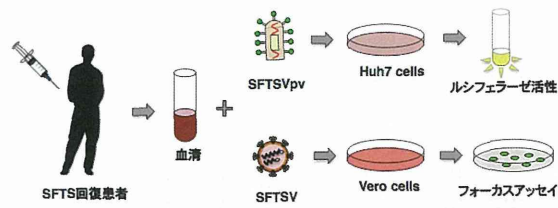


図 5. SFTS 回復期患者血清による SFTSVpv および SFTSV の感染中和

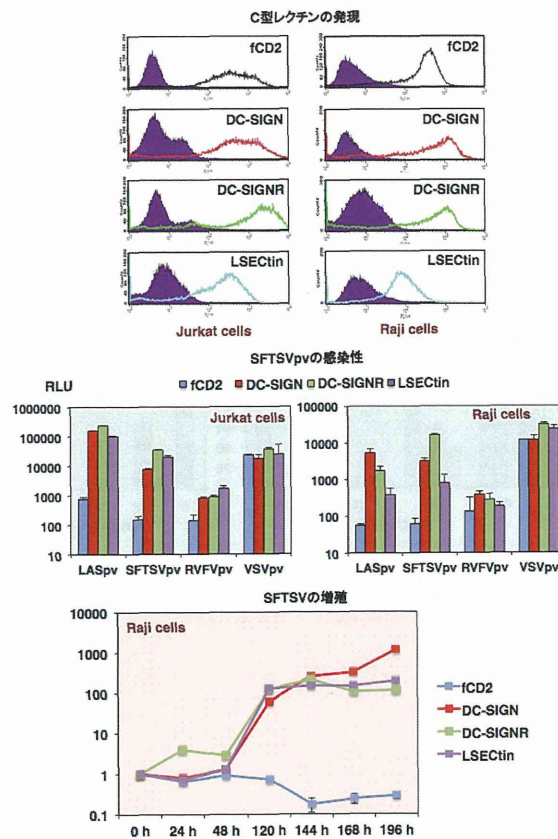


図 6. C 型レクチン発現細胞における SFTSVpv の感染性および SFTSV の増殖効果

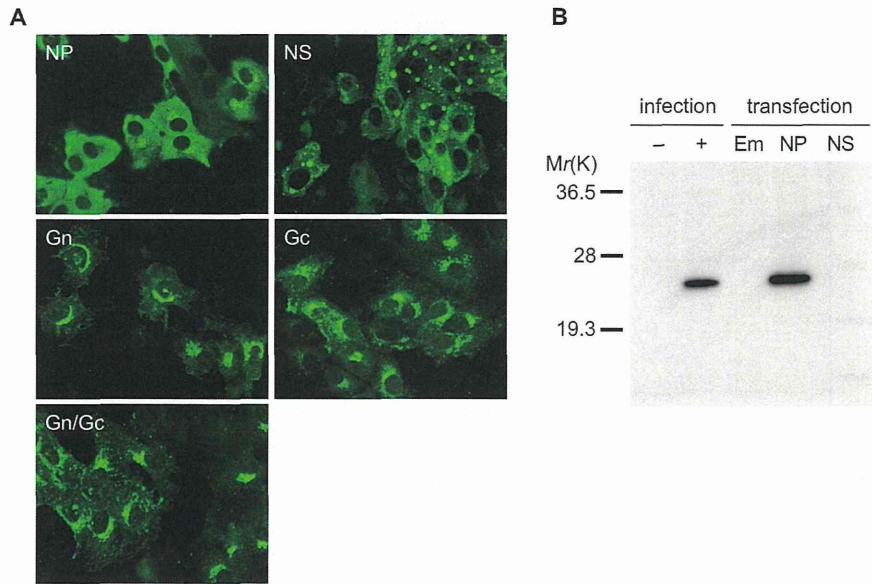


図 7. 各ウイルス蛋白質に対する抗血清の有用性の検証. A) 間接蛍光抗体法により各抗血清の SFTSV 感染 Vero 細胞に対する反応性を検討した. 2 次抗体には Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Life Technologies) を使用した. B) ウェスタンブロット法による検出での抗 NP 血清の有用性について, SFTSV 感染 Vero E6 細胞および発現プラスミド導入 Vero E6 細胞を用いて検討した. 図中の Em は空 (Empty) ベクターの導入を示す.

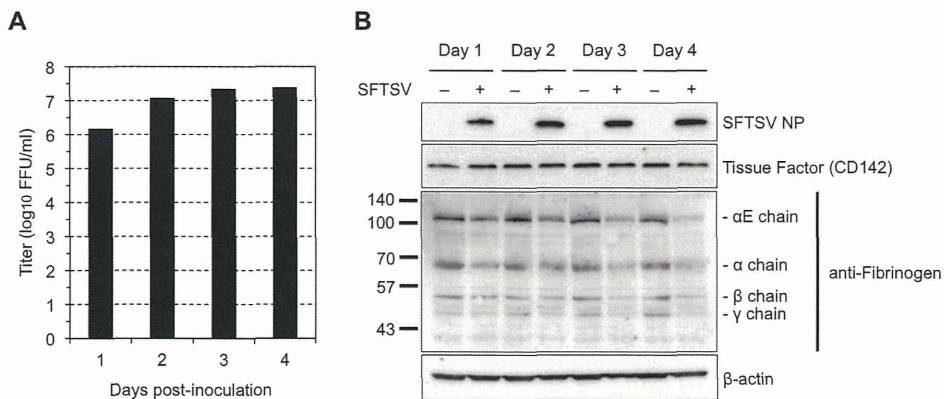


図 8. SFTSV の感染が Huh-7 細胞における血液凝固因子の発現に及ぼす影響. SFTSV を Huh-7 細胞に multiplicity of infection (moi) 10 以上で接種し, 経時的に培養上清と細胞を回収した. A) 培養上清中のウイルス感染価については, Vero E6 細胞を用いてフォーカス法により測定した. B) 細胞については, ウェスタンブロット法により各種蛋白質の発現について検討した. 抗組織因子 (Tissue factor) 抗体は Bioass 社, 抗フィブリノゲン抗体は abcam 社および抗 β-actin 抗体は abm 社より入手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

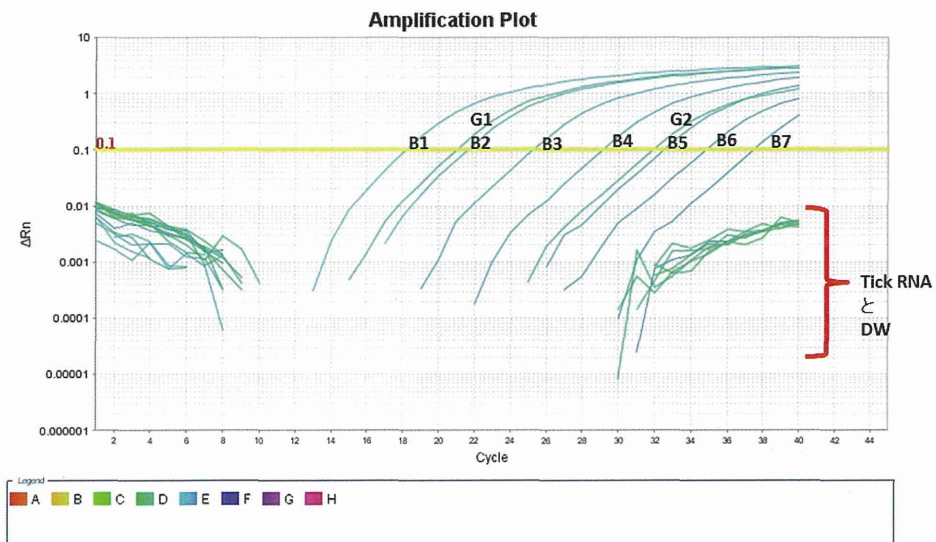


図 9. 作成した primer sets を用いて実施した real time RT-CR の結果. (blue line: plasmid 希釈系列) B1=E7, B2=E6, B3=E5, B4=E4, B5=E3, B6=E2, B7=E1, Green の line は tick RNA (#301-#305)と DW

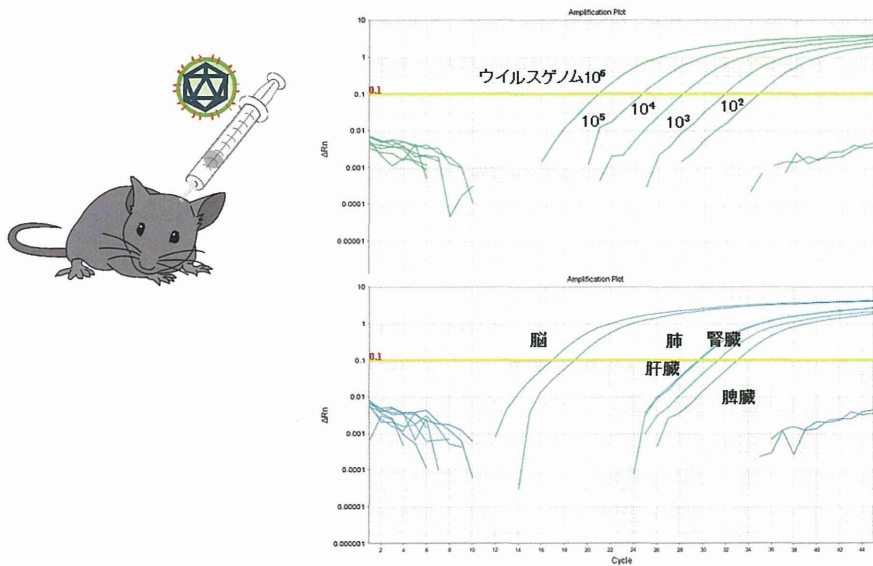


図 10. 生後 2 日の乳のみマウスに SFTSV を接種し, 10 日後に組織を採集して SFTSV RNA を検索.

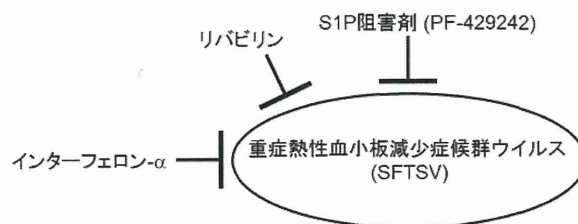


図 11. リバビリン, インターフェロン- α , S1P 阻害剤は SFTSV 増殖を抑制する.

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らかにして感染リスクを評価すること、また調査のためのツールとしての抗体検出系等の開発、加えて流行地域における SFTS ならびにその他感染症に関するリスクコミュニケーションのあり方を検討し、予防対策上より有効な情報発信体制を構築することを目的として研究を実施した。

B. 研究方法

1) 診断系の開発

SFTS ウイルスの N 蛋白遺伝子を大腸菌発現ベクター pQE30 のクローニングサイトに挿入して His-tag を付加した状態で大腸菌に発現させ、ニッケルカラムにて精製した。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°C, 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に準備を実施した。

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 Control	Negative
H	0.08	0.08	0.07	0.06	800x	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-RVSV)		
		<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 ³ _2nd	7227	7656	8898	12483
3	HB29-10 ² _2nd	513	487	710	880
4	HB29-10 ¹ _2nd	68.6	62.6	72.0	133.0
5	HB29-10 ⁰ _2nd	11.5	4.0	6.3	8.4
6	HB29-10 ⁻¹ _2nd	8.7			
7	HB29-10 ⁻² _2nd				
8	YG1-no dilution	1E+07	2E+07	1E+07	1E+07
9	YG1-10 ³	8611	11827	11039	17910
10	YG1-10 ²	800	782	1033	1839
11	YG1-10 ¹	69.1	55.6	102.2	162.3
12	YG1-10 ⁰	12.0	1.2	3.2	15.4
13	YG1-10 ⁻¹	5.5			
14	YG1-10 ⁻²				
15	SPL035-no dilution	1E+07	2E+07	1E+07	2E+07
16	SPL035-10 ³	6289	3950	6672	6832
17	SPL035-10 ²	548	383	571	686
18	SPL035-10 ¹	72.3	30.8	89.2	65.4
19	SPL035-10 ⁰	12.0	1.7		10.7
20	SPL035-10 ⁻¹		0.6		
21	SPL035-10 ⁻²				

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 ³ _2nd	10793.9	+	+
3	HB29-10 ² _2nd	936.2	+	+
4	HB29-10 ¹ _2nd	131.8	+	+
5	HB29-10 ⁰ _2nd	25.7	—	—
6	HB29-10 ⁻¹ _2nd		—	—
7	HB29-10 ⁻² _2nd		—	—
8	YG1-no dilution	10273722.0	+	+
9	YG1-10 ³	11627.0	+	+
10	YG1-10 ²	1038.3	+	+
11	YG1-10 ¹	68.9	+	±
12	YG1-10 ⁰	6.9	+	—
13	YG1-10 ⁻¹	1.4	—	—
14	YG1-10 ⁻²		—	—
15	SPL035-no dilution	10512762.0	+	+
16	SPL035-10 ³	6595.2	+	+
17	SPL035-10 ²	544.2	+	+
18	SPL035-10 ¹	94.9	+	±
19	SPL035-10 ⁰	7.9	—	—
20	SPL035-10 ⁻¹	0.3	—	—
21	SPL035-10 ⁻²		—	—

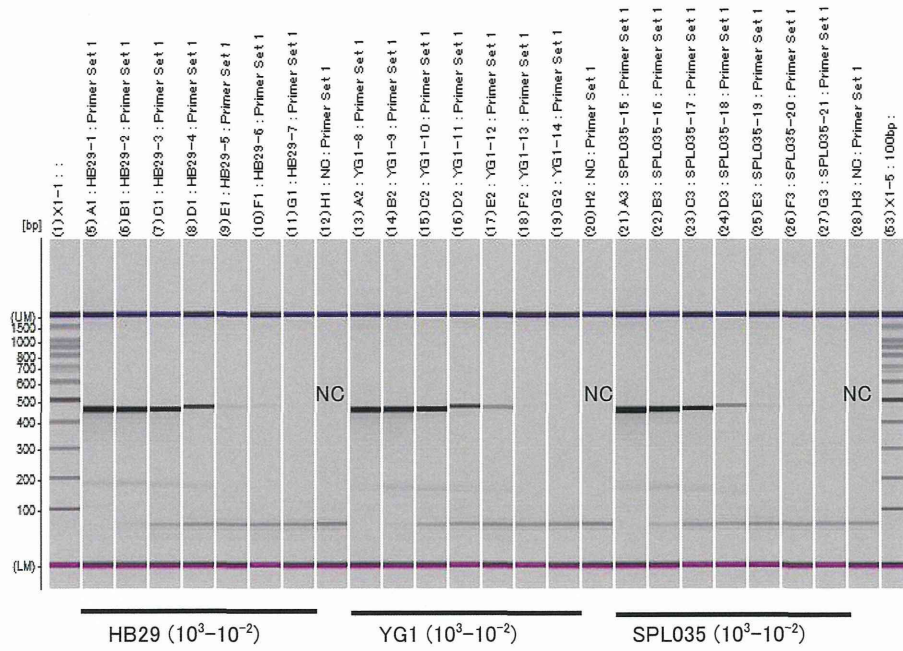


図 1. 従来法 Conventional RT-PCR (primer set 1): 山口県実施

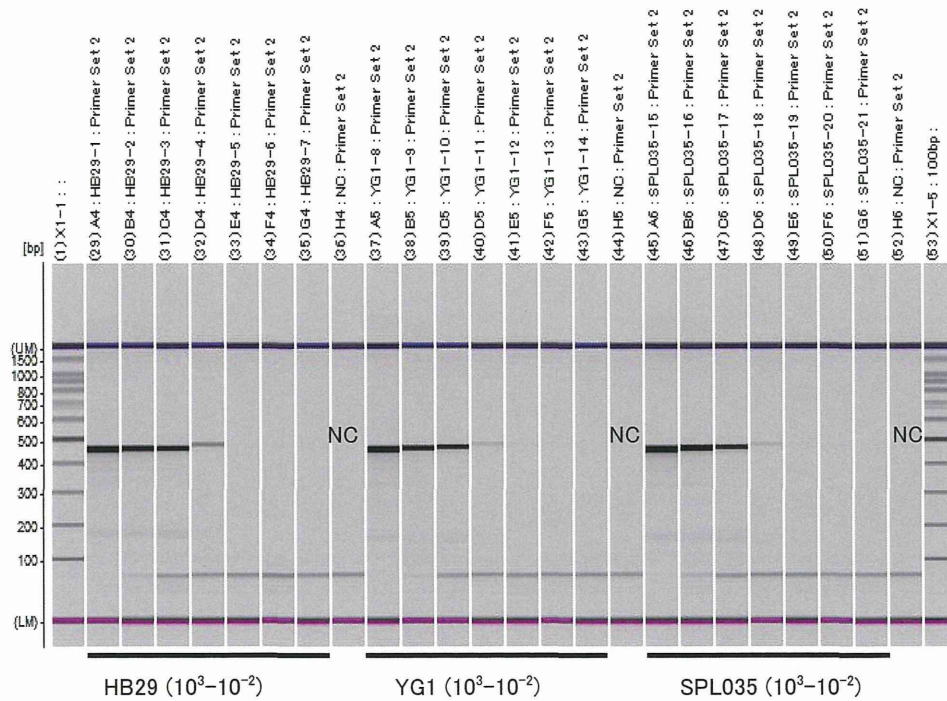


図 2. 従来法 Conventional RT-PCR (primer set 2): 山口県実施

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:厚生労働省からの通知,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, 患者の個人情報とは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。厚労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

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)

診療の手引き

【第2版】2013.11.5

専門家への 相談

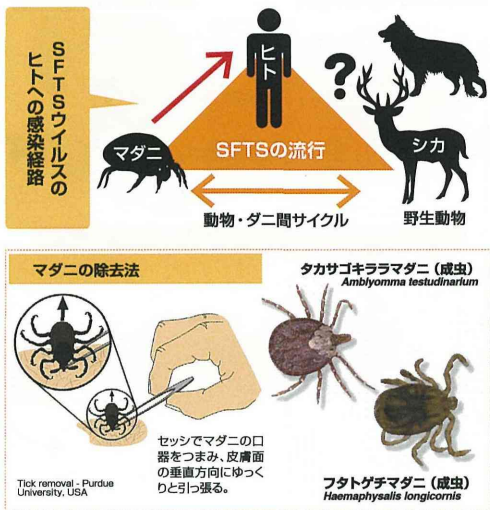
- 国立感染症研究所 ウイルス第一部・感染症疫学センター TEL.03-5285-1111 (代表)
- 国立国際医療研究センター 国際感染症センター TEL.03-3202-7181 (代表)

平成 25 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)
SFTS の制圧に向けた総合研究

研究分担者：加藤康幸(独立行政法人国立国際医療研究センター 国際感染症センター)
研究代表者：倉田毅(国立感染症研究所 感染病理部)

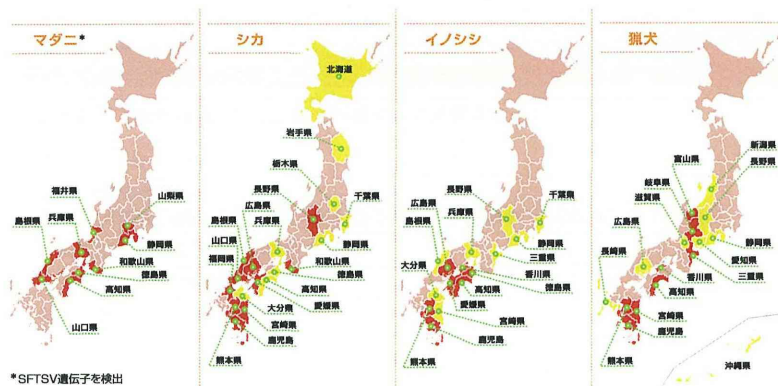
重症熱性血小板減少症候群(SFTS)とは

- 2011年に中国の研究者により初めて報告された新規のSFTSウイルス（ブニヤウイルス科プレボウイルス属）による新興感染症である
- 日本国内では2013年に初めて患者が報告されたが、後方的に少なくとも2005年には患者が発生していたことが判明している
- 発熱、白血球減少、血小板減少に加えて、重症例では出血傾向、多臓器不全を来す
- マダニ刺咬が主要な感染経路だが、中国において、一部患者血液・体液との接触による家族内・職業感染事例の報告があり、医療従事者は適切な感染防止策を行いながら診察を行う必要がある

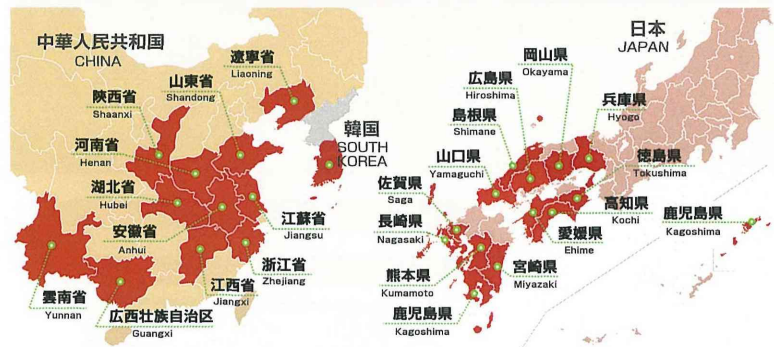


重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの国内分布(第1報) IASR Vol.34 p.303-304 : 2013年10月号

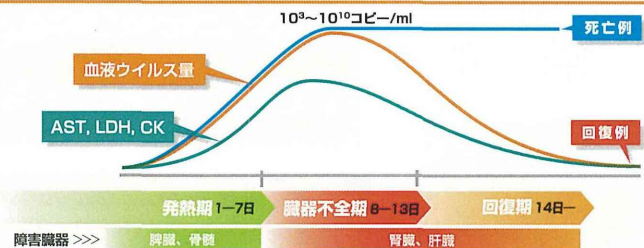
■ 抗体陽性動物が見つかった地域 ■ 抗体陽性動物が見つからなかった地域 ■ 調査されていない地域



東アジアでの患者発生地 ※2013年10月現在



臨床経過



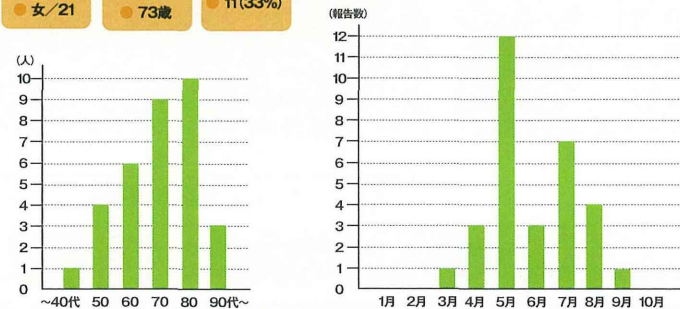
我が国における症例の疫学(n=33)

2013年1月1日以降に発症した症例 / 10月23日現在

男女比
● 男 / 12
● 女 / 21

年齢中央値
● 73歳

死亡
● 11(33%)



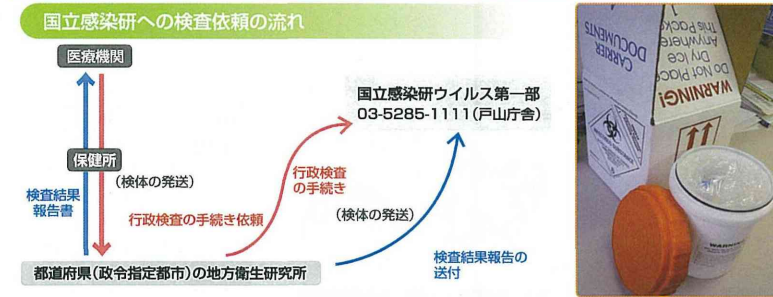
SFTS 臨床的特徴

- 潜伏期間6～14日
- 発熱>38℃
- 血小板減少(10万/mm³未満)
- 白血球減少(4000/mm³未満)
- 血清酵素(AST、ALT、LDH)の上昇
- 消化器症状(嘔気、嘔吐、腹痛、下痢、下血)や頭痛、筋肉痛、神経症状、リンパ節腫脹、出血症状などを伴う
- 致死率10～30%程度

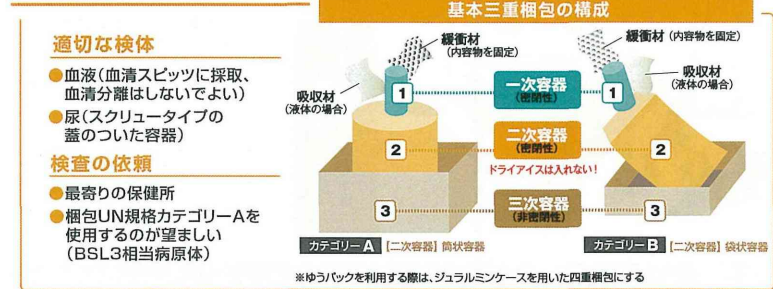
診断確定に必要な検査(すべて行政検査として実施される)

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	血液、咽頭拭い液、尿
PCR法による病原体の遺伝子の検出	
ELISA法又は蛍光抗体法による抗体の検出 (IgM抗体の検出又はペア血清による抗体陽転若しくは抗体価の有意の上昇)	血清
中和試験による抗体の検出(ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意の上昇)	

行政検査の流れ



検体と梱包



診断・治療・感染防止のアルゴリズム

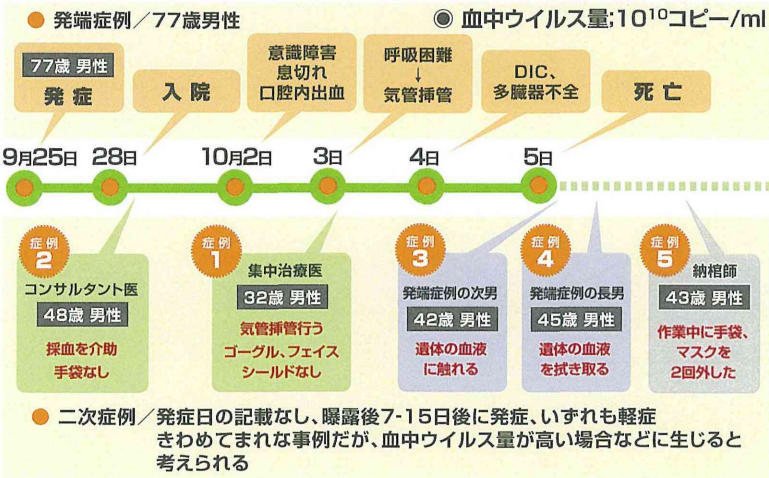
これまでの本邦における報告例のまとめ

- 西日本を中心に報告されている
- マダニへの曝露歴を認めないこともある
- 春から秋にかけて発生が多い
- 高齢者に多い

出血傾向・消化器症状を伴う重症発熱患者

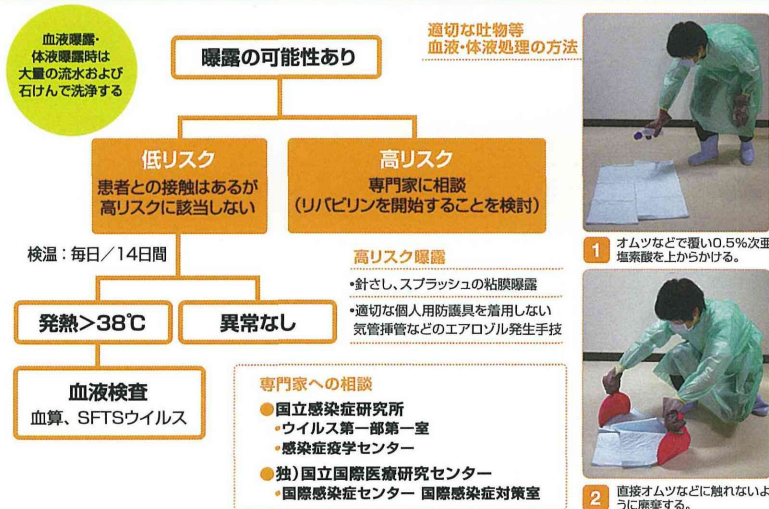


家族内・職業感染事例(山東省 / 2010年)



Clin Infect Dis 2012; 54:249-252.

患者血液・体液曝露時の対応



直接オムツなどに触れないように廃棄する。

国内情報

- 西條 政幸 下島 昌幸 福士 秀悦 ほか
国内で確認された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)患者8名の概要 (IASR Vol.34 p.110 : 2013年4月号)
- 西條 政幸 下島 昌幸 福士 秀悦 ほか
国内で初めて確認された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)患者に続いて後方視的に確認された2例 (IASR Vol.34 p.108-109 : 2013年4月号)
- 森川 茂 宇田 晶彦 加来 義浩 ほか
重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの国内分布調査結果(第一報) (IASR Vol.34 p.303-304 : 2013年10月号)
- 本間 義人 村上 昇司 山本 千恵 ほか
家族内発症2名の重症熱性血小板減少症候群(SFTS)患者を含むSFTS患者5名の臨床的特徴 (IASR Vol.34 p.312-313 : 2013年10月号)

国の通知など

- 感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律施行令の一部を改正する政令等の施行について (健発0222第2号)
- 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)検査のための検体及びその処理法等に関するお願い(検査依頼マニュアル) 国立感染症研究所ウイルス第一部
- 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)に関するQ&A

論文

- Yu X, Liang M, Zhang S, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. N Engl J Med 2011;364:1523-1532.
- Zhang Y, He Y, Dai Y, et al. Hemorrhagic fever caused by a novel bunyavirus in China: pathogenesis and correlates of fatal outcome. Clin Infect Dis 2012; 54:527-533.
- Gai Z, Zhang Y, Liang M, et al. Clinical progress and risk factors for death in severe fever with thrombocytopenia syndrome patients. J Infect Dis 2012;206:1095-1102.
- Gai Z, Liang M, Zhang Y, et al. Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through blood contact. Clin Infect Dis 2012;54:249-252.
- Bao C, Xi G, Qi X, et al. A family cluster of infections by a newly recognized bunyavirus in eastern China, 2007: further evidence of person-to-person transmission. Clin Infect Dis 2011;53:1208-1214.
- Tang X, Wu W, Wang H, et al. Human-to-human transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through contact with infectious blood. J Infect Dis 2013;207:736-739.
- Advisory Committee on Dangerous Pathogens(ACDP). Management of Hazard Group 4 viral haemorrhagic fevers and similar human infectious diseases of high consequence*

執筆 / 忽那賢志(国立国際医療研究センター 国際感染症センター) 加藤康幸(国立国際医療研究センター 国際感染症センター)

協力 / 西條政幸(国立感染症研究所 ウイルス第一部)・森川 茂(国立感染症研究所 獣医科学部) 高橋 徹(山崎県立総合医療センター 血液内科)・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) 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)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
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	デング熱と vector-borne diseases (SFTSを含む)	化学療法の領域	29	25-32	2013

