

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15778

研究課題名(和文) 高浸淫地域における SFTS感染症の血清学的迅速診断検査法の開発と臨床応用

研究課題名(英文) The development of diagnostic tool for severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in a SFTS-endemic area in Japan.

研究代表者

松田 基弘 (Matsuda, Motohiro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90770149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス関連タンパク質である核タンパク(NP)および非構造タンパク(NS)のリコンビナントタンパク(rNPおよびrNS)および抗rNPウサギ抗体を精製し、double-antigen ELISA法とイムノクロマト法(ICA)を確立した。同ELISA法は感度・特異度に優れた抗NP抗体の検出系であり、SFTS発症3～4日後の患者血清中の抗NP抗体の検出が可能であった。一方のICAについては検出感度の向上が今後の課題となった。Double-antigen ELISA法は、SFTSの早期診断の検査方法として有用と考えられたが、多くの臨床検体による検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

致死率の高い感染症である重症熱性血小板減少症候群(SFTS)には有効な治療法がない。近年、SFTS発症早期にファビピラビルを投薬することにより、SFTS患者の回復が期待できることが示されている。本研究で確立したdouble-antigen ELISA法は、SFTSの早期診断に有用と考えられ、早期治療介入に貢献し死亡率を低減できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop the useful diagnostic tool for severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in daily clinical practice. We prepared recombinant SFTS virus-associated protein such as nucleoprotein (NP) and nonstructural S segment (NS) protein. Anti-recombinant NP (rNP) antibody was purified from serum of immunized rabbit with rNP. Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using rNP detected anti-NP antibody in serum obtained from patients with early onset of SFTS. This assay showed that anti-NP antibody increased in serum within 3 or 4 days after SFTS virus infection. Although immunochromatographic assay (ICA) to detect SFTS virus antigen was also developed using anti-rNP rabbit antibody, the performance of ICA was unstable. In future study, it is necessary to improve the sensitivity of ICA for early diagnosis of SFTS. Double-antigen ELISA may be useful diagnostic tool for SFTS virus infection in a SFTS-endemic area in Japan.

研究分野：Infectious Diseases

キーワード：SFTS diagnostic tools Double-antigen ELISA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は 2009 年中国から報告されて以来、本邦でも 2013 年以降多くの報告がなされている。SFTS は発熱と血小板減少を伴う致死性の高い感染症であり、早期診断が必要とされる。現在、SFTS の実験室診断は主に国立感染症研究所あるいは各県の衛生研究所で行われるのが現状で、検体搬送等で時間を要している。早期診断および適切な治療のタイミングを考慮する上で、ベッドサイドでの迅速な確認検査が必要であり、その開発が望まれる。

## 2. 研究の目的

重篤な感染症である SFTS の早期診断法の確立、ベッドサイドで使用可能な血清学的診断方法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

1) SFTS の各遺伝子を大腸菌発現系 (pET ベクター) に組み込み大腸菌に各タンパク質を発現させる。また、バキュロウイルス発現系 (BacPAK システム) を用いて昆虫細胞でタンパク質を発現する。

SFTS ゲノムには地域により多様性が認められる。本邦で分離された典型的な SFTS 株の cDNA (国立感染症研究所 下島昌幸博士より供与) を鋳型として、SFTS の S-segment 非構造タンパク質 (NSs)、核タンパク質 (NP)、M-segment の糖タンパク質 (Gn, Gc)、L-segment の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP) タンパク質のコード領域を PCR で増幅し、大腸菌発現系 (pET) ベクターおよびバキュロウイルス発現系 (BacPAK) ベクターに組み込む。その後大腸菌 BL21 で発現したタンパク質を His-Tag を利用して HisTALON カラムあるいは HisNi カラムで精製する。昆虫細胞 IPLB-Sf21 insect Host cell で発現させたタンパク質は可溶化した後、ゲル濾過、イオン交換クロマト、アフィニティー精製法を組み合わせることで純化する。

2) 分離精製した SFTS 関連タンパク質をウサギあるいはマウスに免疫し特異抗体を得る。

1) で分離精製した SFTS 関連タンパク質を免疫源としてウサギあるいはマウスに接種する。抗体価が上昇した時点でウサギより採血を行い、IgG 分画にした後、免疫源のタンパク質を結合したアフィニティーゲルを作成し、アフィニティークロマトで抗体を精製する。必要に応じてマウスにも免疫しモノクローナル抗体を得る。

3) 得られた SFTS 関連タンパク質および精製抗体を用いて患者の抗 SFTS 抗体及び SFTS 抗原の測定方法を確立する。

ELISA 法およびイムノクロマト法による SFTS 患者の抗 SFTS 抗体の検出系を検討する。各抗原をアルカリホスファターゼあるいはペルオキシダーゼで標識する。未標識及び標識抗原でサンドイッチする形で抗 SFTS 抗体を測定する。第 1 段階は ELISA 法で各抗体を個別に測定し、抗 SFTS 抗体の検出に適切な抗原を選択する。適切な抗原 (抗原の組み合わせ) を選定し、イムノクロマト法に応用する。この方法について臨床検体を用いて測定感度、特異性、簡便性を検証する。

さらに、血中の SFTS 抗原を測定する目的の ELISA 法およびイムノクロマト法を構築する。各特異抗体をアルカリホスファターゼあるいはペルオキシダーゼで標識し、未標識及び標識抗体で SFTS 抗原をサンドイッチする形で測定する。第 1 段階は ELISA 法で各抗原を個別に測定し、抗 SFTS 抗体の検出に適切な抗原を選択する。適切な抗体（抗体の組み合わせ）を選定し、イムノクロマト法に応用する。この方法について臨床検体を用いて測定感度、特異性、簡便性を検証する。

#### 4. 研究成果

##### 1) SFTSv 抗体測定に使用するための SFTSv 抗原の精製回収

SFTSv の S セグメントにコードされている NSs および NP の遺伝子を増幅後、pET 6xHN-C Vector (タカラバイオ) に組み込み、大腸菌に導入してタンパク質の発現を試みた。発現ベクターを導入した大腸菌ライセートを SDS-PAGE で泳動し、NSs および NP とも予測される分子量の位置にバンドが認められた。次に SFTS 回復期患者血清を用いたウエスタンブロットを行ったが、NSs に対する抗体は検出されず、NP に対する抗体は明確なバンドとして検出された。この結果より、NP タンパク質が SFTS 患者の抗体検出に有用と考え、組換え NP タンパク質の精製を行った。IPTG でタンパク質発現を誘導した組み換え体 E. coli を可溶化し HisTALON Column (タカラバイオ) を用いてアフィニティ精製組換え NP タンパク質 (rNP) を得た。SDS-PAGE では、この rNP は単一バンドとして検出され精製度の高いタンパク質として精製回収することに成功した。

##### 2) ウサギ抗 NP 血清の作成

上記の rNP タンパク質を抗原としたアジュバント・コンプリートの等量混合をウサギに 2 週間の間隔で 5 回感作し、ウサギ抗 NP 血清を得た。更に、得られた抗血清から IgG 分画を分取し、rNP を吸着させた抗原カラムでアフィニティ精製を行った。精製した特異抗体を抗体測定のコントロールおよびイムノクロマトグラフィの構築に用いた。

##### 3) rNP タンパク質を利用した抗 SFTS 抗体の測定法の確立

rNP タンパク質を利用した double-antigen ELISA とイムノクロマト法の確立を進めた。ペルオキシダーゼで標識した rNP タンパク質を標識抗原とし、固相に rNP タンパク質を用いた Double-antigen ELISA を組み立てた。健康人血清 60 検体を購入し ELISA 法のカットオ

図 1

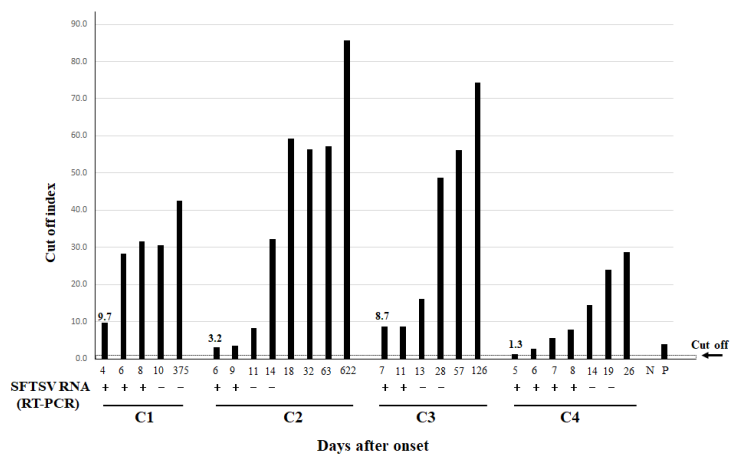


図 1. 組換え NP 抗原を用いた double-antigen ELISA による SFTS 患者 4 症例の経時的 NP 抗体の推移. C1~C4 は SFTS の症例、横軸の数値は SFTS 発症後の日数を示す。RT-PCR による SFTSV-RNA の検出結果は +/- で示した。

フ値を設定した。SFTS の急性期から回復期まで経時的にフォローできた 4 症例分の血清を臨床検体として、ELISA 法で抗体を測定した (図 1)。また、同じ患者血清における SFTSv 遺伝子を RT-PCR 法で検出した。その結果、SFTS 4 症例すべてにおいて、初診時の発症早期 (発症後 4~7 日) の患者血清から抗 NP 抗体の検出が可能であった。また発症後の経過とともに抗体価が高くなる傾向が認められ、回復後長期を経た (発症後 26 日~622 日) 検体が最も高いカットオフインデックス(COI)を示した。 図 2

この抗体の活性は SFTSv 感染細胞ライセートで吸収され、未感染細胞ライセートでは吸収されないことを確認した (図 2)。患者血清の RT-PCR

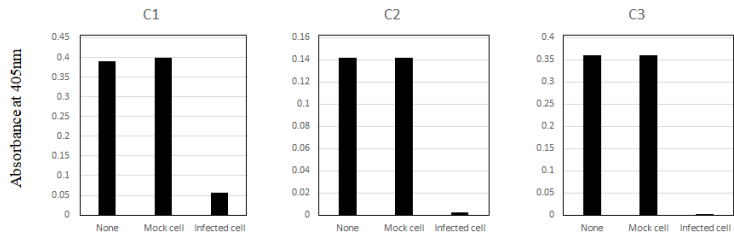


図 2 . SFTS 感染細胞ライセートを用いた NP 抗体吸収による特異性の検証 . 吸収試験には C1 発症 4 日目, C2 発症 6 日目, C3 発症後 7 日に採取した血清を用いた。None は未処理、Mock cell は SFTSV 未感染細胞ライセートで吸収後、Infected cell は SFTSV 感染細胞ライセートで吸収後 double-antigen ELISA で NP 抗体を測定した。

では、発症後 8~11 日目までウイルス RNA が検出されたが、その後、時間経過とともに急速に消失する傾向が認められた (図 1)。これら経時的に得られた検体の解析から、急性期から数日間ウイルス RNA と抗 NP 抗体が血中に共存していることが明らかになった。次にベッドサイドで利用可能なイムノクロマトグラフィによる抗 NP 抗体の検出系の確立を試みた。Double-antigen ELISA を参考に、検出部に rNP タンパク質を塗布し、標識抗原として金コロイド標識 rNP タンパク質を用いたイムノクロマトグラフィを作成 図 3

した。イムノクロマトグラフィにおいても急性期 (発症後 4~7 日) (図 3) および回復期をふくむ検体から抗 NP 抗体が検出されたが、判定に苦慮する症例も認められたことから、

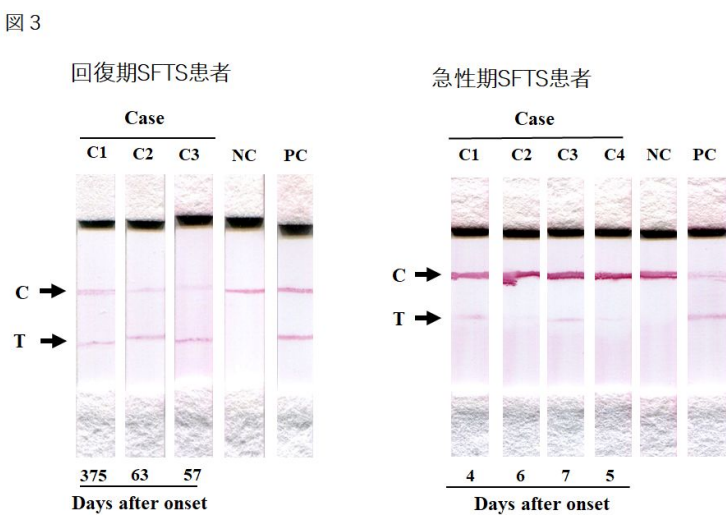


図 3 . イムノクロマトグラフィによる NP 抗体の検出 . SFTS 急性期は各症例の初診時 (発症後 4~7 日) の血清、SFTS 慢性期は発症後 57 日~375 日目の血清を用いて測定した。矢印は (C) コントロールラインと (T) テストラインを示す。

今後は検出感度を改善する必要があると考えられた。 Double-antigen ELISA により、

SFTSv-NP タンパク質に対する抗体を発症後数日の急性期から回復期の長期間において検出することが可能であった。特に同抗体は、SFTS 発症早期から明確な陽性を示すことから、発症後短期間で血中から消失する SFTS ウイルス RNA を検出する検査を補完する方法としても有用と考えられた。また、本抗体検出法は 2 次抗体を必要としないため疫学的研究において応用範囲が広いと考えられた。一方、イム

ノクロマトグラフィの感度を向上することによりベッドサイドで利用できる検査法として実用化できるものと考えられる。特異性が高く十分な感度を有する Double-antigen ELISA 法を確立できたことから、本研究で開発を目指していた抗原測定法については検討を中止し、多くの SFTS 感染症の臨床検体を用いた Double-antigen ELISA 法の有用性の検証を開始した。また、野生動物および愛玩動物等でも問題となる SFTSv 感染の実態調査等への利用についても検討を進めている。新たな研究課題として、ベッドサイドで利用可能なより高感度のイムノクロマトグラフィの開発に取り組む必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>川口剛, 川田千紘, 力武雄幹, 力武真央, 岩尾浩昭, 相澤彩子, 仮屋裕美, 松田基弘, 宮内俊一, 梅北邦彦, 高城一郎, 岡山昭彦 |
| 2. 発表標題<br>重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) における凝固能異常.  |
| 3. 学会等名<br>第92回日本感染症学会講演会 第66回日本化学療法学会総会合同学会                                     |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>岩尾浩昭, 川口剛, 木村賢俊, 川田千紘, 力武真央, 相澤彩子, 仮屋裕美, 松田基弘, 宮内俊一, 梅北邦彦, 高城一郎, 岡山昭彦 |
| 2. 発表標題<br>致死性不整脈を合併した重症熱性血小板減少症候群の一例.   |
| 3. 学会等名<br>第1回SFTS研究会・学術集会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>川口剛, 木村賢俊, 川田千紘, 力武真央, 岩尾浩昭, 相澤彩子, 仮屋裕美, 松田基弘, 宮内俊一, 梅北邦彦, 高城一郎, 岡山昭彦 |
| 2. 発表標題<br>重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) における神経学的異常.                                       |
| 3. 学会等名<br>第1回SFTS研究会・学術集会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>梅木一美, 保田和里, 橋倉悠輝, 山田明輝, 山本成郎, 野村創, 梅北邦彦, 下島昌幸, 岡山昭彦. |
| 2. 発表標題<br>重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルス抗原の作成と臨床応用.                  |
| 3. 学会等名<br>第64回日本臨床検査医学会学術集会.                                   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|   |                               |               |
|---|-------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>重症熱性血小板減少症候群ウイルス抗体検出キット及び重症熱性血小板減少症候群ウイルス抗体検出方法 | 発明者<br>岡山昭彦 梅北邦彦<br>松田基弘 梅木一美 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2018-149981                             | 出願年<br>2018年                  | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|