

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：15501
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20H03479
研究課題名（和文）マダニ体内におけるSFTSウイルスの感染動態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of SFTSV infection in ticks

研究代表者

高野 愛 (Takano, Ai)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：90700055

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、非常に重篤な疾病である重症熱性血小板減少症候群 (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome) ウイルスをマダニに人工感染させる感染実験系を国内で初めて確立し、マウスを用いた伝播検証実験を実施した。これにより、媒介マダニ種ならびにマダニ体内でのウイルスの感染動態の一部を明らかにすることができた。本研究により、これまで不明な事が多かったマダニ媒介性ウイルス感染症のさらなる解析が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症熱性血小板減少症候群は、致死率が高く、現時点で確立された治療法がない重篤なマダニ媒介性感染症である。このような重篤な感染症病原体を用いたマダニでの感染実験系の確立と、媒介マダニ体内における詳細なウイルス動態の解析は、世界でも事例が少なく、非常に学術的意義が大きい。また、今後、マダニにおける解析が進むことで、新しい予防法の開発に向けた研究が進むなど、社会的な意義も大きいと言える。

研究成果の概要（英文）：This study established for the first time in Japan a novel experimental systems for artificial infection of ticks with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus, which is a very serious disease, and conducted transmission experiments using mice. As the result, we were able to clarify the vector tick species by experimentally and transmission dynamics in ticks of the virus. This research should lead to further analysis of tick-borne viral infections, which until now have remained largely unknown.

研究分野：マダニ媒介性感染症

キーワード：マダニ SFTSV

1. 研究開始当初の背景

重症熱性血小板減少症候群(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome: SFTS)は、近年報告されている新しいマダニ媒介性の感染症である。本疾患は、ヒトにおいて発熱、消化器症状を主徴とした疾病を引き起こし、致死率が 20%前後と高く、未だ確立された治療法が報告されていない。日本国内では西日本を中心に、年間 50~100 名程度のヒト患者が報告されている。このような重篤な疾患にも関わらず、ワクチンは未だ開発されておらず、その予防法は唯一「マダニに刺されないこと」が現状である。一方で、予防対策に重要な媒介マダニの情報は国内では野外での検出例のみであり、媒介ベクターの実験的な証明は中国からの 1 報告のみであった。他方、日本国内では中国とは異なる遺伝型が大多数を占めており、国内におけるベクターの実験的な証明だけでなく、ウイルスがどのようにマダニ体内で維持、伝播されているかは全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、SFTS ウイルスが自然界、特にマダニ体内においてどのようなメカニズムで感染が維持され、伝播されているのかを明らかにするために、マダニ体内でのウイルス感染動態(感染組織、感染状態、維持時間)の解明を行い、媒介マダニの特定と伝播時間の解明、ならびに感染初期の免疫応答の解明を目的とした。

3. 研究の方法

陽性マダニの作出には人工接種を用いた。BSL3 ラボ内の安全キャビネット内にて複数種の若ダニの肛門から SFTS ウイルス C22 株を接種し、陽性マダニを作出した。その後、インキュベーター内で飼育した後、以下の解析を実施した。

(1) 感染持続時間の検証

接種後経時的にマダニをホモジナイズし、RNA を抽出した。マダニ内部標準と SFTSV 遺伝子をリアルタイム RT-PCR にて増幅させ、マダニが保有する SFTSV の RNA を定量し、経時的に種毎に比較をおこなった。本実験は合計 4 種類のマダニを用い、最長 100 日以上までウイルス RNA の検出を試みた。

(2) ウイルス蛋白の検出

接種後経時的にマダニ全体を用いてホモジナイズし、ウエスタンブロット法にて SFTSV 蛋白の検出をおこなった。

(3) 臓器毎の比較

接種後経時的にマダニを解剖し、臓器毎に分離し、それぞれ RNA 量の定量と蛋白の検出、IFA による観察をおこなった。

(4) マウスへの感染実験

BALB/c マウスに人工感染マダニを吸血させ、1, 2, 3, 4, 5 日目に吸血しているマダニを人工的に取り除いた。吸血していたマダニはその後解剖を行い、各臓器におけるウイルス RNA コピー数とウイルス蛋白量を IFA にて比較した。

(5) マウスの感染確認

マダニを吸血させたマウスは一定期間経過後に安楽殺を行い、血清を回収し、感染の有無を ELISA と中和試験にて検証した。

(6) BALB/c マウスにおける感染最低ウイルス量の算出

BALB/c マウスに腹腔内あるいは皮下に SFTS ウイルスを 10^3 、 10^4 、 10^5 ffu 接種し、接

種後 3 日目から経時的に経尾採血を行い、ウイルス RNA の検出を行った。さらに、4 週間後安楽殺を行い、抗体の陽転を検証した。

(7) マダニ寄生部位のマウス皮下における免疫組織学的観察

マダニが寄生していたマウスについて、マダニ刺噛部位の病理組織解析をおこなった。標的細胞の解析は国立感染症研究所坂井博士に依頼、実施していただいた。

4. 研究成果

本研究により、マダニに SFTS ウイルスを人工感染させる系を確立し、マウスを用いた伝播検証実験を実施した。

1) タカサゴキララマダニ、キチマダニ、ヤマアラシチマダニ、タイワンカクマダニの若ダニにウイルスを接種し、経時間的にウイルス RNA を検出した結果、4 種とも接種後 7 日目でウイルス RNA 量が有意に増加したが、7 日目以降は検出量に有意な変化は見られず、実験を行った最長 112 日目までウイルス RNA が検出され続けた。この結果から、ウイルス RNA は比較的長期間マダニ体内で維持されていることが示唆された。一方、IFA による観察や、ウエスタンブロットによる蛋白の検出では、マダニ種による多少の違いがあるものの、14 日から 21 日目でウイルス蛋白が検出されるようになる事が多く、RNA の複製から蛋白複製までややタイムラグがあることが示唆された。

さらに、一部臓器を用いて実施したタイトレーションの結果では、7 日目と 14 日目では感染性ウイルス粒子が検出されたが、21 日目では検出限界以下となった。これらの結果は、マダニ細胞内で粒子を形成しないウイルスが多数存在することが原因の 1 つではないかと示唆された。

2) まず、ウイルスの最低感染量の検証では、腹腔内接種の場合では 10^2 ffu から感染が成立したが、皮下接種では個体差があり、 10^3 ffu から感染が成立する個体が増える傾向が見られた。1 匹のマウスに複数個体のマダニを吸血させる実験では、実験をおこなった全てのマダニ種：タカサゴキララマダニ、キチマダニ、オオトゲチマダニ、フタトゲチマダニの若ダニでウイルスはマウスへ伝播し、マウスはウイルスに対する抗体産生していた。したがって、日本では、少なくともこれらの 4 種のマダニは媒介ベクターになりうると言える。

3) タカサゴキララマダニ若ダニについては、臓器毎の比較を実施した。Salivary gland(唾液腺)と Midgut(中腸)を観察したところ、人工感染マダニではほとんどウイルス蛋白が検出されなかった一方、感染若ダニを一度マウスに吸血させ、飽血後、脱皮を経ると、唾液腺からもウイルス抗原が検出された。この事から、未吸血状態のマダニにウイルスを接種する人工感染系では、自然感染モデルとは異なる動態を示すが、これをマウスを用いて吸血させることで、より自然感染モデルに近い形でウイルスの動態の検証が可能であることが明らかとなった。

4) マウスにマダニを吸血させ、伝播時間を検証した実験では、吸血中マダニ組織を用いた IFA においてウイルスタンパク陽性唾液腺腺房細胞が多かったマダニに吸血されていたマウスは、SFTS ウイルス抗体陽性を示す傾向が見られた。なお、ウイルス接種後、吸血、脱皮後にマウスに吸血させた実験では、マダニ吸血日数が少ないマウスでも抗 SFTS ウイルス抗体の上昇が見られたが、吸血していたマダニの唾液腺腺房細胞中のウイルスタンパク量が少ない場合は抗 SFTS ウイルス抗体の上昇が見られなかった。

5) 最後に、マダニを寄生させたマウス皮下の免疫組織観察により、皮下のランゲルハンス細胞が最初のウイルスのターゲット細胞になる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤由華、水野純子、下田 宙、早坂大輔、高野 愛
2. 発表標題 マダニ体内におけるSFTSウイルスの局在解析
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	下田 宙 (Shimoda Hiroshi) (40719887)	山口大学・共同獣医学部・准教授 (15501)	
研究分担者	松村 隆之 (Matsumura Takayuki) (50434379)	国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・室長 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------