

## 原 著

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石堂亜希, 重岡 徹, 富永貴元, 末廣泰子, 福士秀悦<sup>1)</sup>,  
下島昌幸<sup>1)</sup>, 西條政幸<sup>1)</sup>, 高橋 徹山口県立総合医療センター血液内科 防府市大字大崎77 (〒747-8511)  
国立感染症研究所ウイルス第一部<sup>1)</sup> 新宿区戸山1-23-1 (〒162-8640)

Key words : 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS), 軽症感染者, 抗SFTSウイルス抗体

## 和文抄録

## 緒 言

届出報告に基づく日本国内の重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) の死亡率が既報より高値である理由のひとつに軽症患者の診断が十分になされていない可能性がある。国内での軽症例を明らかにするため、2008年1月から2013年4月までに38℃以上の発熱があり、かつ血小板減少、白血球減少、肝トランスアミナーゼの上昇のうち1項目以上を有し当科にて入院加療を要した患者のうち、ウイルス感染の関与が疑われた患者について、SFTSウイルス感染の有無を後方視的に調査した。感染の有無は、回復期血清中の抗SFTSウイルス抗体を間接蛍光抗体法、ELISA法、50%プラーク数減少中和試験法にて検討した。対象患者は20代から80代の9例で、年齢は20代2例、30代3例、40代1例、50代1例、60代1例、80代1例であった。患者からの検体採取時期は、発症から5～66ヵ月 (中央値は12ヵ月) であった。抗SFTSウイルス抗体は全例で陰性であった。本研究では軽症感染者を見出すことはできなかったが、軽症例の把握を進め、日本におけるSFTSの疫学を明らかにするためには、SFTSを疑う患者に積極的な調査を継続して行う必要がある。

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であるSFTSウイルスによるマダニ媒介性感染症である。2011年に中国でSFTSと命名された新規感染性疾患が報告されて以来<sup>1)</sup>、中国国内の調査から現在12の省 (遼寧省、山東省、江蘇省、安徽省、河南省、河北省、浙江省など) で患者発生が確認されている<sup>2)</sup>。2012年秋に高熱、血小板減少、白血球減少、下痢や下血といった消化器症状を呈して発症から1週間の経過で死亡した患者 (当院の症例) が、国内で初めてウイルス学的にSFTSウイルス感染と診断され2013年1月に報告された<sup>3)</sup>。その後、レトロスペクティブな感染症例の報告が相次ぎ<sup>4)</sup>、2013年以降は国内でも新規診断例が増えている。

SFTSの致死率は報告により異なるものの、中国では平均8～16%と報告されている<sup>5)</sup>。これに対して、日本におけるSFTSの致死率は32.5%<sup>6)</sup>と中国の報告に比べて高い。SFTSの臨床像が日本<sup>4) 6)</sup>と中国<sup>1) 2)</sup>の患者で極めて類似しているにもかかわらず、日本における死亡率が高い背景には、初期の日本国内での調査対象が死亡や重篤例に限られていたことがある。そのため、軽症例の実態はなお明らかでない。

我々は、SFTSウイルス感染の軽症生存例につい

て実態を明らかにするため、過去にSFTS様の臨床兆候を有し入院治療を必要としたものの自然改善した発熱患者について、SFTS感染の有無を後方視的に調査した。

## 方 法

### 対象患者

2008年1月から2013年4月までに、38℃以上の発熱があり、かつ、次の血小板減少(100,000/mm<sup>3</sup>未満)、白血球減少(4,000/mm<sup>3</sup>未満)、aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH)の上昇(基準値上限を超える)のうち1つ以上を有して当科で入院加療した患者のうち、ウイルス感染の関与が疑われたが原因ウイルスが同定できなかった患者を後方視的に調査した。臨床兆候や検査所見の重症度は問わなかった。この臨床研究はヘルシンキ宣言及び臨床研究に関する倫理指針を遵守し、当該施設の倫理委員会で承認を得た上で、対象患者から書面による同意を得て実施された。

### 抗SFTSウイルス抗体検査

対象患者に同意を得た上で末梢血採血を行い、分離した血清を検体として用いた。

#### 1) 間接蛍光抗体法

SFTSウイルス感染Vero細胞(HB29 strain)を抗原として、10倍希釈から2倍階段希釈した検体20  $\mu$ lを60分反応後、抗ヒトIgG-FITC抗体(Invitrogen, Frederick) (200倍希釈)を60分反応させた。洗浄後、マウントして検鏡した。陽性対照抗体にはウサギ抗SFTSウイルスNP抗体を用い、200倍希釈から2倍階段希釈した20  $\mu$ lを60分反応、洗浄後に抗ウサギIgG-Alexa Fluor抗体(Life Technologies, Eugene) (200倍希釈)を60分反応させた。陽性対照抗体が1:6, 400倍希釈でも蛍光を示した場合に試験が成立したとみなし、1:10倍以上の抗体価を陽性と判断した。

#### 2) ELISA法

SFTSウイルス感染Huh7細胞(SPL004 strain)を抗原として、100倍希釈から4倍階段希釈した検体100  $\mu$ lを120分反応後、抗ヒトIgG-HRP抗体

(Invitrogen, Frederick) (1000倍希釈)を60分反応させた。洗浄後、基質100  $\mu$ lのABTSを加え発色させ、405nmにおける吸光度を測定した。ウイルス非感染細胞を抗原としたものについても同様に行い、バックグラウンド値とした。バックグラウンド値を差し引いて、健常人血清から算出した吸光度+標準偏差 $\times$ 3を上回った場合に陽性と判断した。

#### 3) 50%プラーク数減少中和試験

SFTSウイルス(HB29 strain) 50  $\mu$ lと10倍希釈から2倍階段希釈した検体50  $\mu$ lを60分反応させ、Vero細胞に60分接種した後、1%メチルセルロース添加培地で8日間培養した。細胞をホルマリン固定し、ウサギ抗SFTSウイルスNP抗体(800倍希釈)ならびに抗ウサギIgG-HRP抗体(Invitrogen, Carlsbad) (1000倍希釈)で染色し、DABで発色させた。プラーク数を肉眼で計測し、50%プラーク数減少値を求めて用いて抗SFTSウイルス抗体価を測定した。1:20倍(最終希釈)以上の抗体価を陽性と判断した。

他のウイルス疾患を除外するために、サイトメガロウイルスとEpstein-Barrウイルスの抗体価測定(ELISA法)、HIV抗原抗体検査(CLIA法)を一部の患者で行った。

## 結 果

調査期間中の該当する患者は9名であった。患者背景を表1に示す。9例中7例でサイトメガロウイルスとEpstein-Barrウイルスの抗体価測定がなされたが、全て既感染パターンであった。30代以下の患者5名のうち4名でHIV抗原抗体検査がなされたが全て陰性であった。患者からの検体採取時期は、発症から5~66ヵ月(中央値は12ヵ月)後であった。

間接蛍光抗体法による抗SFTSウイルス抗体の検討では、症例5が80倍希釈で陽性所見を示したが、陽性対照抗体は12800倍以上の希釈でも陽性であり、これと比較すると非常に低値であった。

ELISA法による検討では、症例4においてバックグラウンド値が著しく高く判定不能であったほかは、全ての症例がcut off値(健常人血清から算出したもの)より低値を示し陰性であった。

50%プラーク数減少中和試験では、いずれの症例

も1:20(最終希釈)以下の中和抗体価を示し、陰性の結果であった。

症例5については間接蛍光抗体法で弱陽性であったが、ELISA法と50%プラーク数減少中和試験がともに陰性であったことから、総合的に抗体陰性と判定した。

## 考 察

SFTSウイルスはSFTSの病原ウイルスとして2011年に中国から初めて報告された<sup>1)</sup>。患者発生の地理的分布は中国東北部から中央部にかけてで、感染流行地域の動物より得られたフタトゲチマダニのウイルス保有率が5.4%であったことからマダニ媒介性感染症と考えられた<sup>1)</sup>。日本国内においては、2012年秋に初めてのSFTS患者が発生してから2013年12月末までに後方視的調査も含めて52名の患者が確認されている<sup>4, 6)</sup>。

SFTSにみられる発熱、倦怠感、血小板減少、白

血球減少、下痢、下血などの臨床症状や、肝トランスアミナーゼ、LDH、クレアチンキナーゼの上昇、蛋白尿や血尿といった検査所見は、中国と日本の患者に共通してみられるものである<sup>1, 4, 7)</sup>。しかしながら、より多数例の解析である中国からの報告ではSFTSの死亡率は8-16%<sup>5)</sup>であるのに対し、2013年に国内で発症した患者40例の死亡率は32.5%と明らかに高い<sup>6)</sup>。中国の研究では、研究間で若干の違いはあるものの、病原体が特定されない急性の発熱がある患者のうち、消化器症状や出血症状等の臨床症状、マダニ咬傷歴や農夫といった環境因子、血小板減少や白血球減少の少なくとも1つを有するものをSFTSの疑い症例と定義している<sup>1, 5, 7)</sup>。これに対し、日本においては、厚生労働省が平成25年1月30日付けでSFTS患者に関する情報提供を全国の医療機関に要請した際に作成された患者要件(表2)<sup>8)</sup>がそのままSFTSの症例定義として臨床現場で利用されている。日本の診断基準では全項目を満たすことが要求されているため、重症例や死亡例にはよ

表1 患者背景

症例	年齢	性別	体温 (°C)	PLT (/mm <sup>3</sup> )	WBC (/mm <sup>3</sup> )	消化器 症状	血清酵素 (IU/L)			集中 治療	フェリチン (ng/ml)	CMV	EBV
							AST	ALT	LDH				
1	52	M	39.5	5.3	1600	下痢	37	40	310	なし	722	既感染	既感染
2	82	F	38.0	3.3	6900	なし	61	50	348	なし	250	N/A	N/A
3	31	M	39.0	14.5	2100	なし	62	58	621	なし	4106	既感染	既感染
4	35	F	39.5	29.9	7700	なし	37	42	385	なし	16	既感染	既感染
5	31	M	39.0	13.6	3100	なし	126	80	304	なし	N/A	既感染	既感染
6	66	F	38.6	1.7	300	なし	40	48	147	なし	643	既感染	既感染
7	21	F	39.0	5.7	1500	なし	21	7	276	なし	N/A	既感染	既感染
8	47	F	39.3	7.8	2700	下痢	22	8	239	なし	N/A	N/A	N/A
9	28	M	38.6	12.2	1400	なし	111	190	707	なし	3233	既感染	既感染

Abbreviations: PLT, platelet; WBC, white blood cell; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein-Barr virus; M, male; F, female; N/A, not available

表2 SFTSの症例定義\*<sup>1</sup>

以下の1~7の項目を全て満たす患者

1. 38°C以上の発熱
2. 消化器症状(嘔気、嘔吐、腹痛、下痢、下血のいずれか)
3. 血小板減少(10万/mm<sup>3</sup>未満)
4. 白血球減少(4000/mm<sup>3</sup>未満)
5. AST, ALT, LDHの上昇(いずれも病院の基準値上限を超える値)
6. 他に明らかな原因がない
7. 集中治療を要する/要した、又は死亡した\*<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup>平成25年1月30日厚生労働省健康局結核感染症課長通知における情報提供を求める患者の要件

\*<sup>2</sup>項目7は感染症法においては記載されていない

く当てはまるものの軽症例には必ずしも該当しない。実際に、消化器症状を欠き、多臓器不全や出血症状を有さない軽症診断例の報告もあり<sup>9)</sup>、現行の診断基準では軽症例を見逃している可能性がある。

SFTSはマダニ媒介性感染症であり、潜伏期を考慮した2週間以内のマダニ刺咬歴があれば疾患を疑うのは容易であるが、国内の調査報告ではマダニ刺咬が確認された患者は約半数(21例)にすぎず<sup>6)</sup>、マダニ刺咬がないことをもってSFTSを否定することはできない。さらに、発熱、血球減少、肝障害といった所見も多くのウイルス感染にしばしば伴うものであり、SFTSに特異的な症候ではない。それゆえ、ウイルス感染様の病態を示す患者の中から軽症SFTS患者を見出すことは難しい。今回の検討においては、調査した患者に真のSFTSウイルス感染者はない結果であった。感染陽性者がなかった理由には、調査症例数が9例と少ないこと、SFTSは高齢者を中心に発症者がみられる<sup>6)</sup>なかで本研究の対象患者の半数が30代以下であったことなどが考えられる。軽症感染者の存在を見出すには、さらに症例数を増やした検討が必要である。本研究は対象を入院患者に限定しており、入院を要さなかった軽症例については検討できていない。今後は対象を外来患者にも広げた検討を行う予定である。

SFTSウイルス感染においては、発症2週間頃には抗体が産生され、多くの症例では長期に抗体価が維持されると考えられている<sup>2)</sup>。Yuらの報告においても、発症から1年以上経過した患者7名のうち6名で高力価の抗体が維持されていたことが示されている<sup>1)</sup>。本研究においては回復期の抗SFTSウイルス抗体検査を行うことにより感染の有無を後方視的に検討した。しかし、抗体検査ではどうしても後方視的な結果判定となる。実臨床に役立てるならば、急性期でのリアルタイムな診断が望ましい。急性期SFTSの診断に必須のウイルスRT-PCR検査は、2013年4月以降には各都道府県レベルで実施可能で、最寄りの保健所を通じて検体が提出できる体制が整備されている<sup>10)</sup>。このような優れた診断体制を、症例定義に完全には合致しないが臨床的にSFTSが疑われる患者に対しても積極的に利用できるようになれば、軽症例の把握が進み、日本におけるSFTSの疫学がさらに明らかになるものと考えられる。

## 結 語

SFTS様の症状を有した当院の入院患者においてSFTS感染の有無を後方視的に検討するために抗SFTSウイルス抗体検査を行った。対象患者にはSFTS感染陽性者はみられなかったが、軽症SFTS患者を診断するためには、外来患者にも対象を広げて今後も調査を継続することが必要である。

## 謝 辞

本研究において技術的協力をいただきました山口県立総合医療センター検査部の長弘由美子技師、室谷里美技師長に深謝致します。

著者のCOI (conflict of interest) 開示：下島昌幸，福士秀悦，西條政幸。厚生労働科学研究費補助金「SFTSの制圧に向けた総合的研究」(H25-振興-指定-009)

## 引用文献

- 1) Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1523-1532.
- 2) Liu S, Chai C, Wang C, Amer S, et al. Systematic review of severe fever with thrombocytopenia syndrome: virology, epidemiology, and clinical characteristics. *Rev Med Virol* 2014; **24**: 90-102.
- 3) 西條政幸，下島昌幸，山岸拓也，大石和徳，ほか。国内で初めて診断された重症熱性血小板減少症候群患者。病原微生物検出情報 2013; **34**: 40-41.
- 4) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J Infect Dis* 2014; **209**: 816-827.
- 5) Lam TT, Liu W, Bowden TA, Cui N, et al. Evolutionary and molecular analysis of the emergent severe fever with thrombocytopenia

- syndrome virus. *Epidemics* 2013 ; 5 : 1-10.
- 6) 山岸拓也, 中島一敏, 松井珠乃, 木下一美, ほか. 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-感染症発生动向調査より. 病原微生物検出情報 2014 ; 35 : 38-39.
  - 7) Deng B, Zhou B, Zhang S, Zhu Y, 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* 2013 ; 8 : e80802.
  - 8) 厚生労働省健康局結核感染症課長. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の国内での発生について (情報提供及び協力依頼). 健感発0130号 第1号. 平成25年1月30日.
  - 9) 泉川公一, 宮村拓人, 原信太郎, 住吉 誠, ほか. リケッチア感染症と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. 病原微生物検出情報 2014 ; 35 : 39-40.
  - 10) 惣那賢志, 加藤康幸. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 診療の手引き 第2版. 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. 2013.

## Analysis of Antibodies against Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) Virus in Patients with SFTS-like Symptoms

Aki ISHIDO, Toru SHIGEOKA, Takayuki TOMINAGA, Yasuko SUEHIRO, Syuetsu FUKUSHI<sup>1)</sup>, Masayuki SHIMOJIMA<sup>1)</sup>, Masayuki SAIJO<sup>1)</sup> and Toru TAKAHASHI

Department of Hematology, Yamaguchi Grand Medical Center, 77 Osaki, Hofu, Yamaguchi 747-8511, Japan 1) Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

### SUMMARY

The high fatality rate currently associated with severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in Japan suggests that some mild cases of SFTS have been underdiagnosed. To find mild cases of SFTS in Japan, we retrospectively investigated the status of anti-SFTS virus antibody in hospitalized patients from January 2008 to January 2013, who presented with high fever and one or more characteristics of thrombocytopenia, leukocytopenia, and elevation of liver transaminase. Anti-SFTS virus antibodies in their convalescent period were analyzed using an indirect fluorescent assay, an enzyme-linked immunosorbent assay, and a plaque reduction neutralization test. Nine patients, in the age group of 20-80 year-old were investigated (20's = 2, 30's = 3, 40's = 1, 50's = 1, 60's = 1, and 80's = 1). Blood samples of the patients were taken 5 to 66 months after the onset of illness (the median was 12 months). All the patients tested negative for anti-SFTS virus antibody. Although we could not confirm SFTS in any of the patients in this study, attempts to investigate patients with mild SFTS-like symptoms is necessary to detect the presence of mild cases of SFTS and to promote further understanding of the epidemiology of SFTS in Japan.