

東京都内で初めて検出された重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) の 遺伝学的解析

河上 麻美代^a, 熊谷 遼太^a, 吉田 勲^b, 根岸 あかね^a, 北村 有里恵^a, 加來 英美子^a, 浅倉 弘幸^a, 永野 美由紀^a,
矢尾板 優^a, 長谷川 道弥^a, 林 志直^a, 長島 真美^a, 千葉 隆司^a, 貞升 健志^c

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は, SFTS ウイルス (SFTSV) によるマダニ媒介性感染症で, 西日本を中心に患者が報告されている. 東京都ではこれまで患者の報告はなかったが, 2019年5月, 都内で初めて SFTS 患者の発生が確認された. 今回, 本患者血清から SFTSV 遺伝子を検出するとともに細胞培養法によりウイルス分離を行った. 分離株由来 RNA を用いて, 次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を行った結果, SFTSV のほぼ全領域の塩基配列が得られた. また, 系統樹解析を行ったところ, 3 分節すべて国内で検出される genotype J1 に分類された.

キーワード: 重症熱性血小板減少症候群, SFTS, SFTSV, 次世代シーケンス, NGS, NGS解析, 血清検体

はじめに

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は, SFTS ウイルス (SFTSV) によるマダニ媒介の急性感染症である. 本症は発熱や消化器症状を主徴とするが, 重症化すると意識障害や出血症状を呈し, 致死率は 10~30%程度である. 我が国では 2013 年 1 月に初めて患者が報告されて以降¹⁾, 517 人 (2020 年 5 月 27 日現在) の患者が報告されている²⁾.

原因ウイルスである SFTSV はフェニウウイルス科バンヤンウイルス属の一本鎖 RNA であり, S 鎖, M 鎖, L 鎖の 3 分節から構成されている. SFTSV の genotype は Chinese クレド (C) と Japanese クレド (J) の 2 つに分類され, さらにこれら 2 つのクレドはそれぞれ C1~C5 と J1~J3 の 8 つに分けられる³⁾.

我が国における SFTS 患者は, マダニの活動が活発になる 5 月から 10 月にかけて多く発生しており, 国内において確認された株の大多数は genotype J1 に属し, genotype J2, J3 に属する株は少数である³⁾. その一方で, ごく一部の地域においては genotype C3~C5 に属する株も報告されている. これらは西日本を中心に報告されており, 2019年4月まで東日本では確認されていなかったが, 2019年5月, 東京都内で初めて SFTS 患者の発生が報告された.

今回, 我々は積極的疫学調査により患者検体の検査対応を行い, 患者血清から SFTSV 遺伝子を検出するとともに, 細胞培養法によりウイルス分離を行った. さらに, 分離株由来の RNA を用いた次世代シーケンサー (NGS) による RNA-Seq 解析を行い, 全領域の塩基配列の取得を試みた. そして取得した塩基配列をもとに SFTSV の 3 分節 (S 鎖, M 鎖, L 鎖) の系統樹解析を行ったので, その概要を

報告する.

実験方法

1. 供試材料 (患者概要)

患者は都内在住の 50 代男性である. 都外旅行中に感染したと推定され⁴⁾, 発症後都内医療機関を受診した. そこで SFTS が疑われたため, 当センターに血清検体が搬入され, 積極的疫学調査として検査を実施した.

2. 供試材料からの RNA 抽出

患者血清 140 μ L から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行い, RNA 抽出液 60 μ L を作製した.

3. SFTSV 検出方法

1) Conventional RT-PCR 法

SFTS ウイルス検出マニュアル⁵⁾に準拠して, 2 領域 (set1 と set2) のプライマーを用いて, 標的遺伝子の増幅を以下の手順で行った (表 1). RNA 抽出液 5 μ L を用い, QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を使用し (最終反応量 25 μ L), 50°C40 分, 95°C15 分反応させた後, 94°C 30 秒, 52°C30 秒, 72°C40 秒のサイクルを 35 回繰り返した. PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し, Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) によるシーケンシング反応を行った. 反応産物は, Centri-Sep Spin Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用いて精製し, ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (サーモフィッシャー) により塩基配列を決定した. 得られた塩基配列について, BLAST 検索によりウイ

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

表1. SFTSVの検出に用いたConventional PCRとReal-time PCRのプライマーとプローブ

方法	名称	種類	塩基配列 (5'-3')							領域 (S鎖NP領域)	出典		
Conventional PCR	SFTSV NP-1F	Fp, Sp	ATC	gTC	AAg	gCA	TCA	ggg	AA	202-221	国立感染症研究所 ⁵⁾		
	SFTSV NP-1Rd	Rp, Sp	TTC	AgC	CAC	TTC	ACC	CgR	A	641-659			
	SFTSV NP-F	Fp, Sp	CAT	CAT	TgT	CTT	TgC	CCT	gA	168-187			
	SFTSV NP-2R	Rp, Sp	AgA	AgA	CAg	AgT	TCA	CAg	CA	609-628			
Real-time PCR	SFTSV-S2-237s	Fp	gCA	ACA	AgA	TCg	TCA	Agg	CAT	CAg	237-261	国立感染症研究所 ⁶⁾	
	(1) SFTSV-S3-400a	Rp	TgC	TgC	AgC	ACA	TgT	CCA	AgT	gg	378-400		
	SFTSV-S2-317MGB	Probe	FAM-	CTg	gTT	gAg	Agg	gCA	-MGB		317-331		
	SFTSV-S3-291s	Fp	TgA	Tgg	CAC	TCC	AAg	AgA	AAT	ATg	g	291-314	国立感染症研究所 ⁶⁾ より改変
	(2) SFTSV-S3-357a	Rp	ACA	ggA	gTg	ATT	gAg	AgC	CTg	g	336-357		
	SFTSV-S2-317MGB	Probe	FAM-	CTg	gTT	gAg	Agg	gCA	-MGB		317-331		
	SFTSV_NS-F2	Fp	gTC	AgA	gTg	gTC	CAg	gAT	TgC			46-66	福岡ら ⁷⁾ より改変
	(3) SFTSV_NS-R2	Rp	CTC	gCR	AAA	TCY	TCA	AgC	TCA	g	99-120		
	SFTSV_NS-P2	Probe	FAM-	ggA	gTT	Tgg	TgA	gCA	gC-MGB		69-86		
	SFTSV_CS-F	Fp	gCT	CAC	CAA	ACT	CCA	CTg	CAA			1663-1683	本研究
	(4) SFTSV_CS-R	Rp	gAA	AgA	CgC	AAA	ggA	gTg	ATC	A	1702-1723		
	SFTSV_CS-P	Probe	VIC-	CCT	ggA	CCA	CTC	TgA	-MGB		1685-1699		

*) Fp:Forward primer, Rp:Reverse primer, Sp:Sequencing primer

ルスの種類を同定した。

2) Real-time PCR 法

SFTSVの検出には国立感染症研究所獣医科学部が作成したマダニからのSFTSVウイルス検出マニュアル⁶⁾に準拠して実施した(表1-(1))。RNA抽出液5 μL, 各プライマー100 μM 0.5 μL, プローブ10 μM 0.25 μLおよびQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を使用し(最終反応量25 μL), 50°C40分, 95°C10分反応させた後, 95°C15秒, 62°C1分15秒のサイクルを45回繰り返した。なお検出機器としてQuantiStudio 12K Flex Real-time PCR System (サーモフィッシャー) を使用した。

マダニからの検出マニュアル⁶⁾とIASRに掲載の検出法⁷⁾をもとに改良したプライマーおよびプローブを用いて, それぞれ50°C40分, 95°C10分反応させた後, 95°C15秒, 57°C1分15秒のサイクルを45回繰り返した(表1-(2),(3))。

当センターにおいてChineseクレードのSFTSVを特異的に検出するプライマーとプローブをPrimer Express v.3.0.1 (サーモフィッシャー) を用いて設計し, 動作確認を行った(表1-(4))。標準DNAとしてプライマーとプローブの塩基配列を含む合成DNAを作製し, 3.0×10⁰ copies/μLから3.0×10⁶ copies/μLまでの10倍段階希釈系列を作製した。

3) 供試材料からのウイルス分離

培養細胞によるウイルス分離にはVero細胞, Vero9013細胞およびVero E6細胞を用いた。患者血清を接種し, 細胞変性効果 (cytopathic effect ; CPE) を観察した。CPEが確認された場合に培養上清を回収し, Real-time PCR法によりSFTSVの同定を行った。

4. 次世代シーケンサーによるRNA-Seq解析

培養上清から抽出したRNAを用いて, SMARTer Stranded RNA-Seq Kit (Takara Bio) によりライブラリーを調製し, MiSeq (illumina) を使用して塩基配列を取得した。

5. 系統樹解析

分離株のS鎖, M鎖およびL鎖の系統樹解析には参照株としてS鎖42株, M鎖44株, L鎖44株を用いた³⁾。解析については, Molecular Evolutionary Gene Analysis (MEGA) ver. 7を用い, 最尤法 (Maximum-Likelihood法) で系統樹解析した。

結果と考察

1. SFTSVの検出および検出系の改良と構築

1) SFTSVの検出

Conventional RT-PCR を行った結果, set1, set2ともに患者検体 (F19-81) において目的の位置にバンドを検出した(図1)。

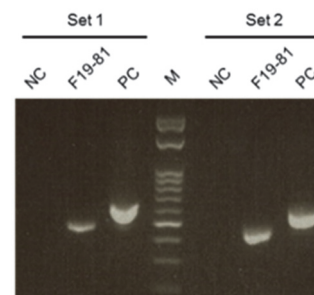


図1. Conventional RT-PCR 法による SFTSV の検出

Set1 : 目的バンド 458bp, PC 584bp

Set2 : 目的バンド 461bp, PC 587bp

NC : Negative Control, PC : Positive Control, M : marker

また, Real-time PCR の結果, 患者検体から Ct 値 37.2 サイクルで SFTSV 遺伝子を検出した(図2a)。さらに, シークエンス解析により塩基配列を決定したのち BLAST 検索したところ, miyazaki2014 株 (Accession NO. AB985574.1) の配列と 100%一致した。これらのことから患者検体から検出した遺伝子は, SFTSV 由来の塩基配列であることを確認した⁴⁾。

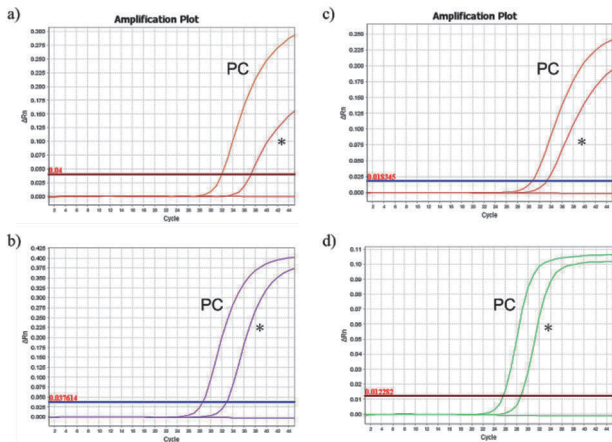


図 2. Real-time PCR 法による SFTSV の検出
 PC : Positive Control, *患者検体 (F19-81)
 a) 表 1-(1), b) 表 1-(2), c) 7), d) 表 1-(3)

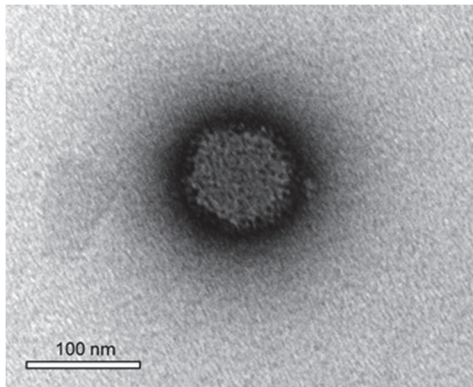


図 3. Vero9013 細胞により分離された SFTSV

さらに、患者血清を培養細胞に接種し、ウイルス分離試験を実施した結果、Vero 9013 細胞、Vero 細胞および Vero E6 細胞において CPE を確認し、Real-time PCR 法により培養上清中から SFTSV を同定した。また、透過型電子顕微鏡により Vero 9013 細胞の培養上清中のウイルス粒子を確認した (図 3)。

2) Real-time PCR法によるSFTSV検出系の改良

検出感度の向上を目的にReal-time PCR法の改良を試みた。既報⁶⁾を参考にプライマーおよびプローブの設計をしたところ、従来法の37.2サイクル (図2a) と比較してCt値が約5サイクル早い、Ct値32.8サイクルで患者血清からのSFTSVを検出した (図2b)。

また、IASRに掲載されていたSFTSウイルス検出法⁷⁾を参考に、プライマーとプローブの構築を試みた。その結果、従来法のCt値33.2サイクル (図2c) よりも約4サイクル早いCt値28.8サイクルでSFTSVを検出した (図2d)。これらのことから、当センターで設計したReal-time PCR法は既報^{6,7)}と比較して検出感度が高く、かつ迅速に結果が得られることが確認された。

3) Real-time PCR法によるChineseクレード検出系の構築

Chineseクレード株を特異的に検出する目的で、Chineseクレード用のReal-time PCRのプライマーおよびプローブ

を設計し (表1-(4))、動作確認を行った。Real-time PCR法の検出感度について、10倍段階希釈した標準DNAを用いて検討した結果、3.0 copies/μLでは増幅曲線が認められなかったが、3.0×10¹ copies/μLから3.0×10⁶ copies/μLの範囲内において、増幅曲線が得られた (データは示していない)。このことから、検出感度は3.0×10¹ copies/μLであると推定された。よって、今回設計したReal-time PCR法のプライマーとプローブは、Chineseクレードの検出手段として有効であることが示唆され、Chineseクレードの検出法を整備することができたと考える。

2. 次世代シーケンサーによるRNA-seq解析

Vero 9013 細胞のウイルス上清を回収後、RNA を抽出しNGS を行った結果、SFTSV のほぼ全領域の塩基配列が得られた。3 分節において得られた塩基配列は S 鎖 : 1,693 /1,746 bp (Accession NO. LC549337) , M 鎖 : 3,328 /3,378 bp (Accession NO. LC549338) , L 鎖 : 6,333 /6,368 bp (Accession NO. LC549339) であった。これらの塩基配列を用いて領域別に系統樹解析を行ったところ、3 分節すべて genotype J1 に分類され、国内で確認されている genotype J1 と近縁であることが判明した (図 4, 5)。

これまでに東京都では、都内におけるマダニのSFTSV保有状況を調査してきたが、現在のところSFTSV陽性の

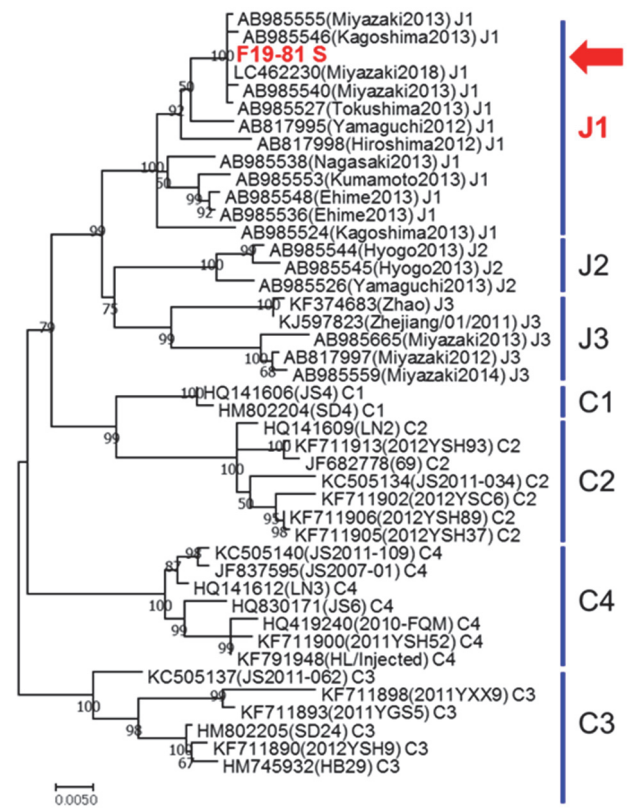


図 4. 最尤法を用いた SFTSV の S 鎖における系統樹解析
 矢印 : 分離株由来の SFTSV (F19-81 S)

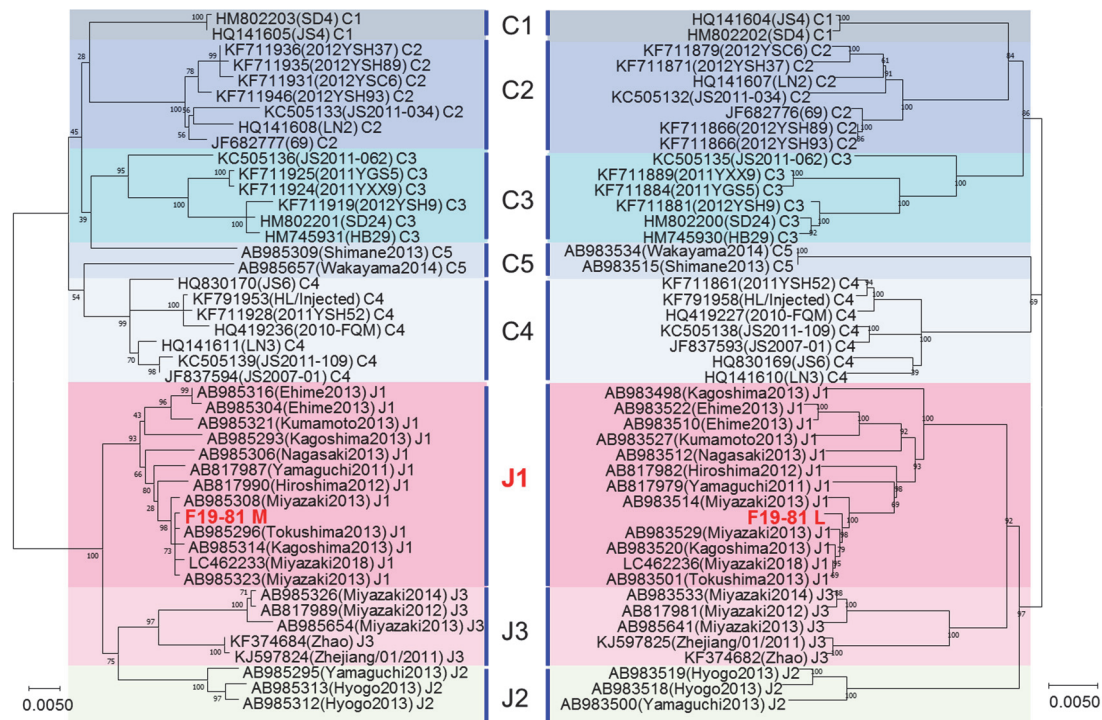


図 5. 最尤法を用いた SFTSV の M 鎖および L 鎖における系統樹解析

左図：SFTSV の M 鎖遺伝子，右図：SFTSV の L 鎖遺伝子，分離株由来の SFTSV (F19-81 M および F19-81 L)

マダニは確認されていない^{8,9)}。本患者発生と同時期には、推定感染地である長崎県において、県内在住の男性が SFTS を発症した事例が報告されており、推定感染地では SFTSV を保有したマダニが生息していたことが示唆された。

ヒトの往来の活発な東京都においては、今回の事例のように都外で感染した SFTSV 感染者が都内で発症する可能性がある。そのため、SFTS 疑いの患者が都内で発生した際に、迅速かつ正確に SFTSV を検出できる検査体制を整備することが求められる。

今回、我々は Real-time PCR 法による SFTSV の Japanese クレードの検出系を改良し、加えて新たに Chinese クレード特異的な検出系も構築した。これにより SFTSV の迅速かつ高感度な検出が可能になると考えられる。

ま と め

2019 年 5 月に都内で初めて SFTS 患者の発生が確認された。今回、本患者血清から SFTSV 遺伝子を検出するとともに細胞培養法によりウイルス分離を行った。分離株由来 RNA を用いて、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を行った結果、SFTSV のほぼ全領域の塩基配列が得られた。系統樹解析を行ったところ、3 分節すべて国内で検出される genotype J1 に分類された。

文 献

- 1) Takahashi, T., Maeda, K., Suzuki, T., *et al.*: *J. Infect. Dis.*, **209**, 816-827, 2014.

- 2) 国立感染症研究所：感染症発生動向調査で届出られた SFTS 症例の概要
<http://www.niid.go.jp/niid/ja/sfts/sfts-idwrs/7415-sfts-nesid.html> (2020 年 8 月 21 日現在。なお本 URL は変更または末梢の可能性がある)
- 3) Yoshikawa, T., Shimojima, M., Fukushi, S., *et al.*: *J. Infect. Dis.*, **212**, 889-898, 2015.
- 4) 神田宏平, 木下典子, 奥濱絢子, 他：病原微生物検出情報, **40**, 114-115, 2019.
- 5) 病原体検出マニュアル 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)：国立感染症研究所
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/SFTS20200812.pdf> (2020 年 8 月 21 日現在。なお本 URL は変更または末梢の可能性がある)
- 6) 岩元由佳, 山本真実, 中堂園文字, 他：鹿児島県保健報, **16**, 55-57, 2017.
- 7) 福間藍子, 吉河智城, 福士秀悦, 他：病原微生物検出情報, **37**, 45-47, 2016.
- 8) 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 他：東京健安研七年報, **68**, 61-64, 2017.
- 9) 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 他：東京健安研七年報, **69**, 65-69, 2018.

Genetic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) first detected in Tokyo

Mamiyo KAWAKAMI^a, Ryota KUMAGAI^a, Isao YOSHIDA^a, Akane NEGISHI^a, Yurie KITAMURA^a, Emiko KAKU^a,
Hiroyuki ASAKURA^a, Miyuki NAGANO^a, Yuu YAOITA^a, Michiya HASEGAWA^a, Yukinao HAYASHI^a,
Mami NAGASHIMA^a, Takashi CHIBA^a, and Kenji SADAMASU^a

Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is a tick-borne infection caused by the SFTS virus (SFTSV), and patients have been reported mainly in western Japan. Although no patients have ever been reported in Tokyo, the first case of SFTS in Tokyo was confirmed in May 2019. We detected the SFTSV sequences from the serum of the patient and isolated SFTSV. As a result of RNA-Seq analysis of the virus using a next-generation sequencer, the nucleotide sequence of almost the entire region of SFTSV was obtained. A phylogenetic tree analysis revealed that all three segments were classified as genotype J1 detected in Japan.

Keywords: severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS, SFTSV, next-generation sequencing, NGS, NGS analysis, patient's serum

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan