

次世代シーケンサーを用いた SFTSV の全ゲノム解析法の開発

令和 5 年度全国公衆衛生獣医師協議会（令和 5 年 9 月 1 日 東京都）

宮崎県衛生環境研究所 成田 翼、三浦 美穂、吉野 修司

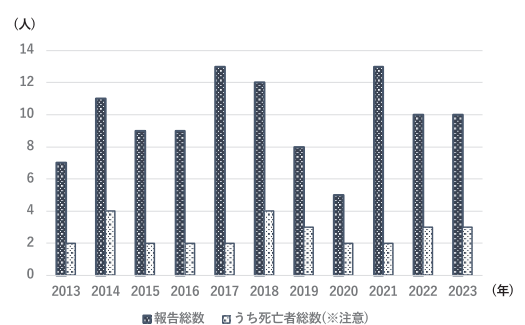
宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター 岡林 環樹

1 はじめに

重症熱性血小板減少症候群（以下 SFTS）は 2011 年に中国で発見されたフェヌウイルス科バンダウイルス属の重症熱性血小板減少症候群ウイルス（以下 SFTSV）によって引き起こされる感染症であり、マダニによって媒介される人獣共通感染症である。国内では 2013 年に SFTS 患者 1 例目が報告されてから 2023 年 4 月 30 日までに 835 人の患者と 97 名の死亡（発生届出時点での死亡者数）が確認されている。発症者及び死亡者は高齢者を中心に発生しており、致死率は 6.3%-30%と考えられている。宮崎県は全国で SFTS 患者発生数が最も多い県であり、2013 年の 1 例目から 2023 年 7 月 2 日までに 107 名の感染者と 29 名の死亡者（発生届出後も含む）が確認されている（第 1 図）。SFTS の患者発生地域は少しずつ北上しており、2019 年には東京でも患者が確認されている。SFTS は治療薬がなく、治療は対症療法が中心となっているため、SFTS の感染の仕組みを理解することは、患者及び死亡者数の減少のために重要な課題となっている。また、近年、犬や猫などの伴侶動物にも SFTSV 感染事例が相次いで報告され、SFTS は人獣共通感染症としても重要になってきている。

SFTSV は 3 分節の 1 本鎖マイナス RNA で構成され、L(6368bp)、M(3378bp)、S(1746bp)の 3 つの分節に分かれており、L 分節は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを、M 分節はエンベロープ糖タンパク (Gn 及び Gc) を、S 分節は核タンパク (NP) と非構造タンパク (NSs) をコードしている。

過去に行われた SFTS の研究では、SFTS は中国に多い C1-C5 と日本に多い J1-J3 の 8 つの型に分類される事が判明している。



第1図:宮崎県のSFTS患者数と死亡者数(2013年-2023年7月)

2019 年に発生した新型コロナウイルス感染症(COVID-19)により、新型コロナウイルスの解析を行うために全国の地方衛生研究所には次世代シーケンサー(以下 NGS)が導入された。これにより、当所においても Illumina 社の iSeq 及び Nanopore 社の MK1C が配備され、遺伝子解析技術が飛躍的に向上した。一方で、全ゲノム解析はシーケンスをかけるまでの Wet 工程と解析を行うための Dry 工程があり、新型コロナウイルスを解析する Dry 工程は専用の国立感染症研究所のシステム(COG-JP)で行われていたため、多くの地方衛生研究所では新型コロナウイルス以外の病原体の全ゲノム解析を行う事が困難であった。

本研究では、新型コロナウイルスの解析法に準じた方法で、細胞培養を行う事なく、SFTS 患者血清の抽出検体から直接全ゲノム解析を行い、Galaxy を用いて解析を行う方法を確立したので報告する。この方法を用いることで、地方衛生研究所の職員に馴染みのある新型コロナウイルス感染症の検査手法を用いて SFTSV を解析できると考える。

2 材料及び方法

NGS 解析は L 分節、M 分節、S 分節を別々に行った。

(1) 検体

2016 年から 2023 年の間に PCR で SFTS 陽性が確定した検体（血清）を検査対象とした。このうち、2023 年 7 月までに解析に供されたのは、L 分節 46 検体、M 分節 58 検体、S 分節 62 検体である。

(2) プライマー作成

プライマーは Primal scheme を用いて作成した。Primal scheme はウイルスの multiplex PCR プライマー作成用のサイトである。これを用いることで、参照配列から multiplex PCR 用のプライマーを作成できる。Primal scheme により L 分節(20 対)、M 分節(11 対)、S 分節(8 対)のプライマーを作成した。

(3) Illumina 社 iSeq によるシーケンス

血清から抽出された検体は LunaScript RT SuperMix Kit(NEB 社)を用いて、逆転写反応を行った後、Q5 Hot Start Hi-Fi 2X Master Mix(NEB 社)を用いて multiplex PCR を行い、QIAseq FX DNA Library Kit(Qiagen 社)を用いてライブラリー作成を行った。ライブラリーは iSeq(Illumina 社)を用いて解析を行い、Fastq データを取得した。

(4) Nanopore 社 MK1C によるシーケンス

MK1C による解析は iSeq の解析において解読が不十分なものに対して、iSeq での解析で作成した multiplex PCR 後の検体を用いて解析を行った。End-prep 反応、バーコード結合、Adapter Ligation を行った後、MK1C を用いて解析を行い、Fastq データを取得した。

(5) Galaxy による解析

Galaxy による解析はクオリティーチェック、余分な配列の除去、de novo assemble(バラバラな遺伝子配列を組み合わせて塩基配列を作成する方法)、readmapping(参照配列に NGS から出力されたデータを当てはめて塩基配列を作成する方法)、再アラインメント、igvtool (readmapping により生じた全ゲノム配列を視覚化するツール) による遺伝子配列の確認、参照配列を基準とした塩基の変異解析を行った。de novo assemble により参照配列の 95%以上のカバレッジを確認できるもの、または readmapping で参照配列の 95%以上カバレッジが確認でき、readdepth(配列読み取り回数)が 10 以上かつ作成された遺伝子配列にギャップが無いものを解読成功とした。iSeq で解読できなかった検体については、MK1C を用いて解析を行った後、解読不能な部分を MK1C の解析データで補完することとした。

(6) 系統解析

解読されたデータは MEGA X を用いて系統樹を作成した。

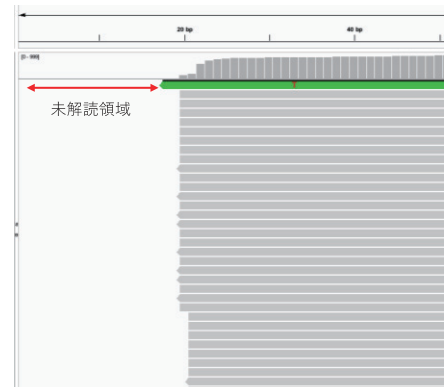
3 結果

iSeq による解析は、正確である一方、両末端数 bp-数十 bp の readdepth が低くなる傾向があった(第 2 図)。実際、解読が失敗に終わった検体の多くが、末端の read のカバレッジが低いことが原因であった。一方で、MK1C による read は正確性の上では iSeq に劣るものの両末端の読み取りには優れ

ていた。iSeq で解読ができたほとんどの検体で 99% 以上のカバレッジが実現できていたが、より完全長に近い読み取りをするために、MK1C の併用が有用であると思われた。

系統解析の結果、L 分節 24、M 分節 32、S 分節 52 の全ゲノム配列が確定した。いずれの配列においても J1 及び J3 型のクレードが確認され、その他のクレードは検出されなかった。また、リアソートメントが疑われる検体は存在しなかった。

S 分節では、44 検体が J1、8 検体が J3、M 分節は 26 検体が J1、6 検体が J3 であり、L 分節は 21 検体が J1、3 検体が J3 であった(図 3)。J3 の検体は、宮崎県南部の一部の地域で感染したと思われる検体に限定されており、宮崎の一部地域で J3 の遺伝子を持つ SFTSV が保存されている事が窺われた。



第2図：末端未読領域の例(S分節)

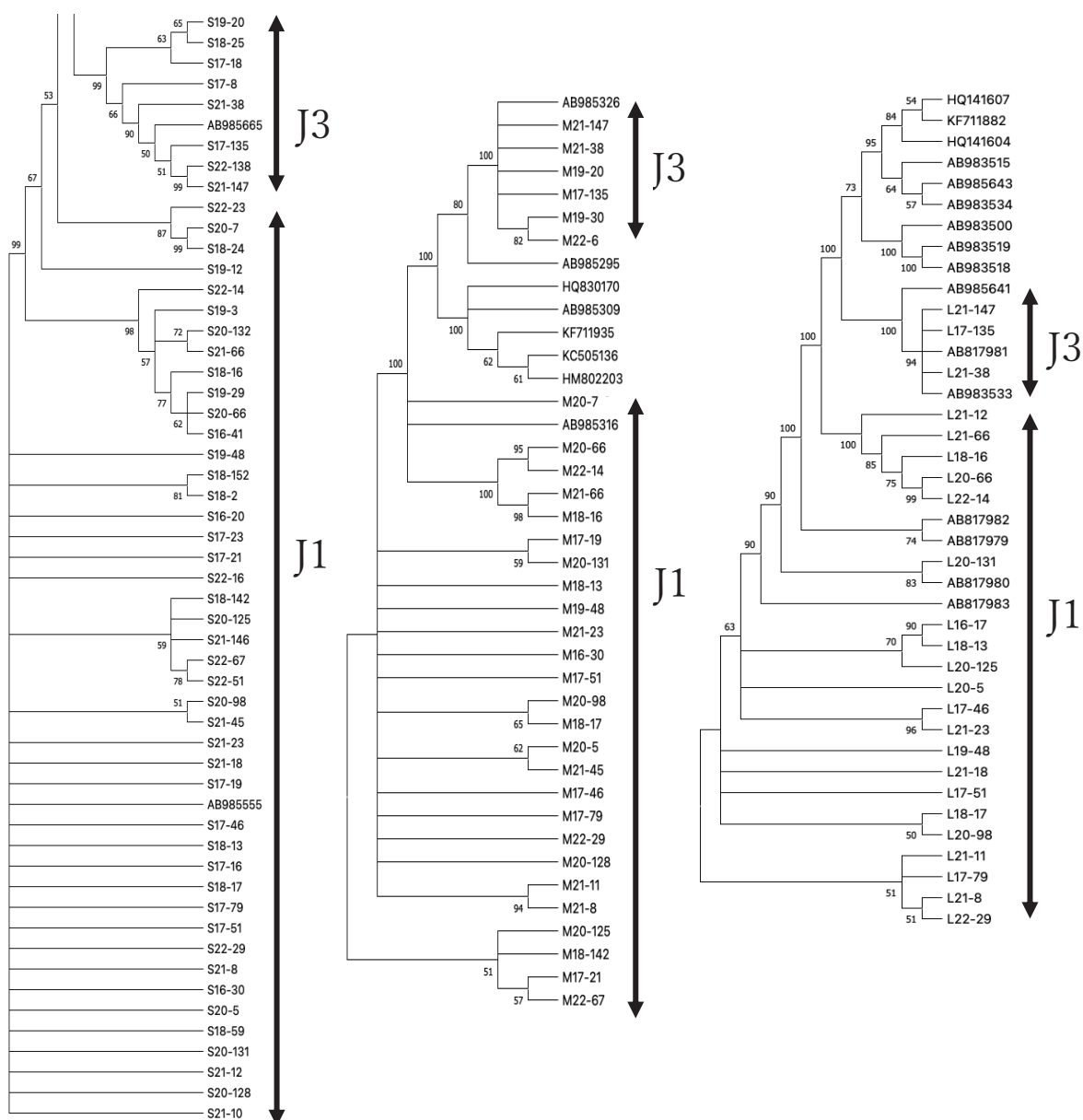
4 考察及びまとめ

全ての分節における SFTSV の全ゲノム解析手法が確立できたことにより、当所で以前行っていた S 分節およそ 400bp のサンガー法によるシーケンスに比べ、広範囲のゲノム構造を解析できるようになった。このことは、リアソートメントの確認やアミノ酸変異を調べる上で大いに役立つと考えている。現在、SFTS の重症化の原因が宿主側にあるのか、ウイルス側にあるのか、また、その両方にあるのかは明確にわかっておらず、アミノ酸配列の変異を調べることで、SFTS の重症化の要因を理解できる可能性があると考えている。

本研究では、抽出検体から培養を経ずに、特異的プライマーを用いて増幅を行うことで、NGS による解析を行った。培養はウイルス量を増加させ、NGS の解析成功率が上がる一方、培養中に変異が起きてしまう可能性がある。特に変異が起きやすい RNA ウイルスでは、解析結果（特に変異解析）に影響が出てしまう可能性があるため、今回抽出検体から直接解析を行う方法を選んだ。multiplex PCR にランダムプライマーでなく、特異的プライマーを用いたのも同様の理由である。一方で今後、培養による変異のリスクが評価されることで、培養検体から解析を行えるようになると考えている。

今回行った全ゲノム解析では、J1 と J3 のみが検出された。J3 は以前より宮崎県のごく一部で検出される事がわかっていたが、J3 の遺伝子がどのような経緯で宮崎県に分布しているかは不明な点が多い。今後、SFTSV の分子進化を調べていくことで、J3 のウイルスの詳細がわかると考えている。

本研究で利用した Primal scheme は人の検体中の SFTSV の全ゲノム解析には有用である事が示された。一方で、マダニ中の SFTSV や伴侶動物の検体中の SFTSV の検出に本プライマーが有用であるかどうかは不明であり、今後の検証が必要であると考え。現在、当所では宮崎大学産業動物防疫リサーチセンターとの連携を行っている。大学との連携を強化していくことで、人以外の SFTSV についても詳細を明らかにしていきたいと考えている。



第 3 図:SFTSV 各分節の系統樹