

【資 料】

## 岡山県で検出されたSFTSウイルスのリアルタイムRT-PCR法における 蛍光強度の低下について

Decreased Fluorescence Intensity of Real-time RT-PCR Method Using SFTS Virus Detected  
in Okayama Prefecture

鶴海 剛, 土本祐栄, 石井 学, 牧本智恵, 清迫理恵, 佐藤 淳, 石故明衣子, 木田浩司, 木下浩行\*

\*岡山県感染症情報センター

TSURUMI Go, TSUCHIMOTO Sachie, ISHII Manabu, MAKIMOTO Tomoe, SEIZAKO Rie,  
SATO Atsushi, ISHIKO Meiko, KIDA Kouji, KINOSHITA Hiroyuki\*

### 要 旨

重症熱性血小板減少症候群（以下「SFTS」という。）は、患者の予後や医療従事者等の二次感染予防の観点から、早期診断が求められており、SFTSウイルスを迅速に検出、定量し得るリアルタイムRT-PCR法の需要が高まっている。今回我々は、岡山県内で2013年7月から2023年12月までの間にコンベンショナルRT-PCR法で陽性となったSFTS患者から採取した血清又は血しょう30検体について、SFTSウイルスゲノムのS分節を標的としたリアルタイムRT-PCR法を実施したところ、全ての検体が陽性と判定され、コンベンショナルRT-PCR法と同等以上の感度を有することが明らかとなった。しかし、このうち9検体では、陽性対照と比較して低い蛍光強度を示した。そこで、検出されたSFTSウイルスについて、リアルタイムRT-PCR法の標的領域の塩基配列を解読したところ、低い蛍光強度を示した9検体から検出されたSFTSウイルスには、プローブ結合領域にミスマッチが認められた。

[キーワード：SFTS, 岡山県, リアルタイムRT-PCR法, プローブ, ミスマッチ]

[Key words: SFTS, Okayama Prefecture, Real-time RT-PCR, Probe, Mismatch]

### 1 はじめに

重症熱性血小板減少症候群（以下「SFTS」という。）は、2011年に中国で発見されたSFTSウイルスを起因とする重篤なマダニ媒介感染症であり、国内では2013年に初めて患者が報告されて以降<sup>1)</sup>、2024年4月までに963名が報告されている<sup>2)</sup>。2018年には、愛玩動物を介した感染経路が明らかとなり、特に獣医療従事者のリスクの高さが指摘されている<sup>3)</sup>。さらに、2024年には国内で初めてヒト-ヒト感染が報告され<sup>4)</sup>、医療従事者等の二次感染予防の観点からも早期の診断が必要とされている。

SFTSウイルスのゲノムは、マイナス1本鎖の3つの分節のRNAで構成されており、それぞれS、M及びL分節と呼ばれている。一般に、ウイルスのゲノムは、塩基の置換、欠損及び挿入によって変異する。また、分節ゲノムを有するウイルスの場合、異なる株の同時感染により分節の組換えが生じることがあり、このような変異は遺伝子再集合と定義されている。SFTSウイルスにおいても、遺伝子再集合が生じたことが示唆されている<sup>5)</sup>。SFTSウイルスの検出法として、コンベンショナルRT-PCR法、リアルタイムRT-PCR法等が開発されている。

SFTS患者の予後とリアルタイムRT-PCR法で算出した患者の血中ウイルスコピー数には相関があることが報告されており<sup>6)</sup>、検査における血中ウイルス量の定量が可能なリアルタイムRT-PCR法の需要が高まっている。

岡山県におけるSFTS疑い症例の行政検査では、国立感染症研究所監修の病原体検出マニュアル<sup>7)</sup>に従い、SFTSウイルスのS分節のNP遺伝子を標的としたコンベンショナルRT-PCR法を実施している。この検査法は、偽陰性や偽陽性の発生頻度が低い点で優れる一方で、結果判明までに長時間を要し、ウイルス量が定量できないなどの欠点がある。そのため、当センターでは、迅速かつ高感度で定量も可能なリアルタイムRT-PCR法を試験的に導入し、コンベンショナルRT-PCRと併せて実施している。今回我々は、これまでに行政検査でSFTSウイルスが検出された検体を対象に、改めてリアルタイムRT-PCR法を実施し、その検出感度を検証した。その結果、若干の知見を得たので報告する。

2 対象と方法

2.1 対象

2013年7月から2023年12月までの間にコンベンショナルRT-PCRで陽性となった県内のSFTS患者の血清又は血しょう30検体を対象とした。

2.2 方法

2.2.1 RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN社)を用い、検体からウイルスRNAを抽出した。

2.2.2 リアルタイムRT-PCR法

表1 プライマー及びプローブ

| 種類             | 配列 (5'-3')                     | 標的領域 (S分節) | 文献 |
|----------------|--------------------------------|------------|----|
| Forward Primer | TGTCAGAGTGGTCCAGGATT           |            |    |
| Reverse Primer | ACCTGTCTCCTTCAGTTCT            | 1566-1702  | 6) |
| Probe          | FAM-TGGAGTTTGGTGAGCAGCAGC-BHQ1 |            |    |

SFTSウイルスゲノムのS分節のNP遺伝子を標的としたリアルタイムRT-PCR法は、Yoshikawaらの報告<sup>6)</sup>に従い、TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific社)を用いてQuantStudio5リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific社)により実施した。使用したプライマー及びプローブの塩基配列を表1に示す。

2.2.3 プローブ結合領域の塩基配列の解読

表2 設計したプライマー

| 種類             | 配列 (5'-3')           | 標的領域 (S分節) |
|----------------|----------------------|------------|
| Forward Primer | GGAAAGACGCAAGGAGTGA  | 1449-1725  |
| Reverse Primer | CGCCATCAACCTCTTDGACC |            |

GenBankに登録されたSFTSウイルスの塩基配列から、リアルタイムRT-PCR法の標的領域を含むようにプライマーを設計し、RT-PCR法を実施した。設計したプライマーの塩基配列を表2に示す。増幅産物を精製し、3500シリーズジェネティックアナライザ (Thermo Fisher Scientific社)を用いて、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、MEGA7.0 (フリーソフト)を用いて解析した。

3 結果

3.1 リアルタイムRT-PCR法におけるSFTSウイルスの検出

リアルタイムRT-PCR法では、30検体全てが蛍光の立ち上がりを認め、陽性と判定された。しかし、このうち9検体は、陽性対照と比較して蛍光の立ち上がり時の傾きが小さく、低い蛍光強度でプラトーに達した。(図1)

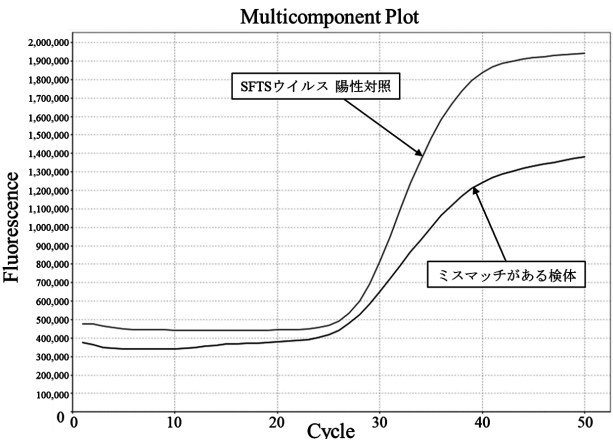


図1 リアルタイムRT-PCR法における蛍光強度

3.2 プローブ結合領域の塩基配列の解読結果

表3 プローブ及びプローブ結合領域の塩基配列

|                    | 配列 (5'-3')            | 検体数 |
|--------------------|-----------------------|-----|
| プローブ結合領域 (ミスマッチなし) | TGGAGTTTGGTGAGCAGCAGC | 21  |
| プローブ結合領域 (ミスマッチあり) | TGGAGTTTGGTGAGCAACAGC | 9   |
| プローブ               | TGGAGTTTGGTGAGCAGCAGC |     |

プローブ結合領域の塩基配列の解読結果を表3に示す。全30検体のうち21検体から検出されたSFTSウイルスのプローブ結合領域の塩基配列は、プローブと完全に一致した。一方で、リアルタイムRT-PCR法で蛍光強度が低かった9検体では、3'末端から5番目の塩基がアデニン (A)であり、プローブのグアニン (G)と異なっていた。

4 考察

我々がSFTSウイルスの検出に用いたリアルタイムRT-PCR法は、その検出原理からTaqManプローブ法とも呼ばれており、ウイルスとプローブの塩基配列にミスマッチが存在すると、検出が困難になることが知られている。そのため、本来陽性となるはずの検体を陰性と判定するおそれがあり、仮に陽性と判定できたとしても正確な定量は不可能となる。本検証では、30検体全てがリアルタイムRT-PCR法で陽性と判定され、コンベンショナルRT-PCR法と同等以上の感度を有することが明らかとなった。しかし、このうち9検体から検出されたプローブ結合領域に1塩基のミスマッチを有するSFTSウイルス (以下「プローブ領域変異株」という。)は、リアルタイムRT-PCR法の蛍光強度が低かった。今回、幸いにもプローブ領域変異株を陽性と判定できた理由として、ミスマッチが21塩基のうち3'末端側から5番目の1塩基のみであり、プローブの結合力が大きく低下しなかったことが考えられる。今回検出されたプローブ領域

変異株が広域に伝播した場合、リアルタイムRT-PCR法において蛍光強度が低下するケースが増加する懸念がある。しかし、三好らの報告<sup>8)</sup>では、SFTSウイルスの遺伝子型の分布には地域性が認められており、SFTSウイルスの主な感染経路がマダニによる媒介であることを勘案すると、プローブ領域変異株の急速な広域伝播の可能性は低いと考えられる。一方、Yoshikawaらの報告<sup>5)</sup>では、SFTSウイルスが、ほかの地域や国をも越えて伝播し、定着する可能性が示唆されており、県外から新たな株が持ち込まれる可能性もある。

リアルタイムRT-PCR法においてウイルスの検出が困難になる要因として、プローブ領域変異株のようなプローブ結合領域のミスマッチのほかに、プライマー結合領域のミスマッチも知られている。リアルタイムRT-PCR法は、コンベンショナルRT-PCR法と比較して特異度及び感度に優れる検査法である一方で、プライマー以外にプローブを使用するためにミスマッチの確率も高くなる。全ての野生株に対してミスマッチのないリアルタイムRT-PCR検査系を構築することは不可能であることから、SFTSウイルスの行政検査においては、別領域を標的とした複数のリアルタイムRT-PCR法を実施することが望ましいと考える。そのため、現在我々は、Yoshikawaらが開発したNP及びGPC遺伝子を標的としたリアルタイムRT-PCR法<sup>6)</sup>を、マルチプレックスで実施することを検討している。

SFTSは新興感染症であり、不明な点も多く、患者の早期診断や医療従事者等の二次感染予防のためには、迅速で正確な検査体制を構築し、適宜改善する必要がある。今後は、検出されたSFTSウイルスの遺伝子型を特定することで県内の分布状況を明らかにするとともに、様々な検査法を検証・導入し、正確で迅速な検査診断に努めたい。

## 文 献

- 1) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, Toru Shigeoka, et al.: The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan, J Infect Dis, 209(6), 816-827, 2014
- 2) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：感染症発生動向調査で届出られたSFTS症例の概要（2024年4月30日更新）  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/SFTS/SFTS-idwrs/12675-SFTS-2.html>（2024.5.7 アクセス）

- 3) Kouji Kida, Yasuhiro Matsuoka, Tetsuya Shimoda, Hiroaki Matsuoka, Haruto Yamada, et al.: A Case of Cat-to-Human Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus, Jpn J Infect Dis, 72 (5), 356-358, 2019
- 4) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：本邦で初めて確認された重症熱性血小板減少症候群のヒト－ヒト感染症例，病原微生物検出情報，45，62-64，2024
- 5) Tomoki Yoshikawa, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushima, Hideki Tani, Aiko Fukuma, et al.: Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan, J Infect Dis, 212(6), 889-898, 2015
- 6) Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushima, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, et al.: Sensitive and Specific PCR Systems for Detection of Both Chinese and Japanese Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Strains and Prediction of Patient Survival Based on Viral Load, J Clin Microbiol, 52 (9), 3325-3333, 2014
- 7) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 重症熱性血小板減少症候群（SFTS）第2版
- 8) 三好めぐみ，松浦 裕，西田倫子，三浦美穂，吉野修司ら：SFTS ウイルスの遺伝子型と県内分布状況について，宮崎県衛生環境研究所年報，31，54-58，2020