

# 病原体検出マニュアル

## 重症熱性血小板減少症候群（SFTS）

第 1 版

令和元年 9 月

# 目次

1. 概説
2. 検体の採取と保存
3. 病原学的検査
  - 3-1. ウイルス分離法
  - 3-2. RT-PCR
4. 血清学的検査
  - 4-1. 間接蛍光抗体法
  - 4-2. 中和試験
5. SFTS の診断基準
6. 連絡先

# 1. 概説

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）は SFTS ウイルス（正式なウイルス名や分類上の位置付けは最新の *Virus Taxonomy* を参照）による新興の急性感染症で、致命率は 20 数%と高い。ウイルスを保有したマダニによる刺傷がヒトへの主な感染源であるが、患者の体液を介したヒトからヒトへの感染、愛玩動物からの感染事例も知られている。日本、中国、韓国およびベトナムで患者の発生報告がある。承認されたワクチンや治療薬は無い。

日本では 2013 年以降、西日本を中心に年間数十名の患者報告がある。発症は夏季が多い。男女比に偏りは無いが多くは高齢である。中国および韓国の年間患者数はそれぞれ数百名・約 200 名と日本より多いが、季節性や患者年齢については日本と同様である。

潜伏期は 6-13 日で、発熱・血小板減少・白血球減少・血中肝酵素上昇等は 1-7 日間程度みられ、血中ウイルス量は  $10^5 \sim 10^6$  copies/mL に達する。回復者ではこれらの数値はその後改善し発症後 2 週間程度で正常値に戻るが、死亡例では経過中数値は悪化を続け、発症後約 9 日（中央値）で死亡する。血中ウイルス量・肝酵素値・サイトカイン量（IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ ）・ケモカイン量（IL-8, MCP1, MIP-1 $\beta$ ）は重篤度と相関する。ウイルスは咽頭スワブ・尿・糞からも検出されるが、これは出血した血液由来のウイルス量を反映したものと考えられる。回復者の抗体は長期にわたり陽性となる。

SFTS ウイルスの遺伝子情報から作製される系統樹では、SFTS ウイルスは中国型や日本型等の異なる遺伝子型に分けることができる。しかし、遺伝子レベルでの差異はあっても数%程度で、抗原性の差は知られていない。

実験室診断はウイルスの分離、RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出、蛍光抗体法・中和試験による抗体の検出で行なわれる。

## 2. 検体の採取と保存

SFTS の実験室診断には、病原学的検査では血清（血漿、血液も可）が最も適するが、咽頭スワブ、気道分泌物、尿等も供することができる。血清学的検査では血清（あるいは血漿）が適し、急性期と回復期に採取されたペア血清を同時に用いることが望ましい。

検体はすぐ（目安として 3 日以内）に実験室診断が実施される場合は冷蔵で保存することが可能である。すぐに実施できない場合は冷凍で保存することが望ましく、その場合に血液は血清（あるいは血漿）として保存すること。

## 3. 病原学的検査

### 3-1. ウイルス分離法

#### 3-1-1. 必要な試薬（同等品で代替可）

DMEM、非働化 FBS、Vero 細胞、細胞培養フラスコ、細胞培養マルチウェルプレート（24 または 48 ウェル等）、PBS、ホルマリン、抗 SFTS ウイルス抗体（抗 SFTSV-NP ウサギ血清等）、蛍光ラベルの二次抗体（Alexa488 Goat anti-Rabbit IgG 等）、Triton X100

#### 3-1-2. 検査方法

##### 3-1-2-1. ウイルスの分離作業

- 3-1-2-1-1. 細胞培養フラスコを用いて Vero 細胞を培養し単層を用意する。
- 3-1-2-1-2. 培養液を 2%FBS-DMEM と交換し、患者血清を接種（5mL の培地あたり 200 $\mu$ L 程度）し培養する。翌日、培養液を新たな 2%FBS-DMEM と交換する。
- 3-1-2-1-3. 5 日-10 日ごとに細胞を継代する。継代の際に後述の手順でウイルスの有無を確認する。
- 3-1-2-1-4. 3 回継代を行なってもウイルスの存在が確認できない場合はウイルス分離の検査は陰性とする。

##### 3-1-2-2. ウイルスの存在の確認

- 3-1-2-2-1. 継代の際に細胞の一部をマルチウェルプレートに撒き、蛍光抗体法による抗原検出用プレートとする。
- 3-1-2-2-2. 1-3 日後に抗原検出用プレートを 10%ホルマリンで固定後、UV 照射で 2 重にウイルスを不活化する。
- 3-1-2-2-3. 抗原検出用プレートを PBS で洗浄後、0.1% Triton X100 を含む PBS を加え室温で 10 分インキュベートする。
- 3-1-2-2-4. PBS で 3 回洗浄する。
- 3-1-2-2-5. 抗原検出用プレートに PBS で 1,000 倍希釈した抗 SFTSV-NP ウサギ血清を加え、室温で 1 時間インキュベートする。
- 3-1-2-2-6. PBS で 3 回洗浄する。
- 3-1-2-2-7. 抗原検出用プレートに PBS で 400 倍希釈した Alexa488 Goat anti-Rabbit IgG を加え、室温で 1 時間インキュベートする。
- 3-1-2-2-8. PBS で 3 回洗浄する。
- 3-1-2-2-9. 蛍光顕微鏡で観察する。

## 3-2. RT-PCR

### 3-2-1. 必要な試薬や機器（同等品で代替可）

RNA 抽出キット（Roche Diagnostics High Pure Viral RNA Kit 等）、分子生物学用エタノール、分子生物学用 DW、PCR 用チューブ、RT-PCR キット（スーパースクリプト III ワンステップ RT-PCR システム等）、サーマルサイクラー、電気泳動装置、電気泳動用アガロース、電気泳動用バッファー、プライマー（下記参照）、マイクロピペット

Primer の配列とターゲット領域

		Sequence (5'-3')	Target gene (position)
プライマー セット1	Forward: SFTSV NP-1F	ATCGTCAAGGCATCAGGGAA	SFTSV NP (202-221)
	Reverse: SFTSV NP-1Rd	TTCAGCCACTTCACCCGRA	SFTSV NP (641-659)
プライマー セット2	Forward: SFTSV NP-2F	CATCATTGTCTTTGCCCTGA	SFTSV NP (168-187)
	Reverse: SFTSV NP-2R	AGAAGACAGAGTTCACAGCA	SFTSV NP (609-628)

### 3-2-2. 検査方法

#### 3-2-2-1. RNA 抽出

- 3-2-2-1-1. RNA 抽出キットのマニュアルに従い、検体 RNA を抽出する。
- 3-2-2-1-2. RNA を直ちに RT-PCR に用いない場合は-80℃で保管する。

#### 3-2-2-2. RT-PCR

- 3-2-2-2-1. スーパースクリプト III ワンステップ RT-PCR システムを用いる場合を示す。抽出された RNA をテンプレートとして、次に示す通りに反応液を調製する。

2×Reaction mix	12.5 μL
Forward primer (10μM)	0.5 μL
Reverse primer (10μM)	0.5 μL
SS III RT/Platinum TaqMix	1.0 μL
DW	8.0 μL
<hr/>	
Total	22.5 μL

- 3-2-2-2-2. PCR 用チューブに 22.5μl ずつ反応液を入れる。陽性コントロール（国立感染症研究所ウイルス第一部では分離ウイルスより抽出した RNA を用いている）、陰性コントロール（DW）を使用する。

- 3-2-2-2-3. 陰性コントロール、陽性コントロールまたは検体 RNA 2.5 $\mu$ L を加える。
- 3-2-2-2-4. PCR チューブに蓋をする。
- 3-2-2-2-5. ウェルの壁についている反応液をスピンドウンする。
- 3-2-2-2-6. PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし以下の条件で RT-PCR を行う。
  - 1 サイクルの 55 $^{\circ}$ C-30 分
  - 1 サイクルの 95 $^{\circ}$ C-2 分
  - 45 サイクルの 94 $^{\circ}$ C-30 秒、52 $^{\circ}$ C-30 秒、68 $^{\circ}$ C-30 秒
  - 1 サイクルの 68 $^{\circ}$ C-5 分
  - 10 $^{\circ}$ Cで維持
- 3-2-2-2-7. Run が終了したら、Gel loading dye と PCR 反応液をよく混合し、1.5%から 2%程度のアガロースゲルにて電気泳動を行う。
- 3-2-2-2-8. UV 照射装置にて写真撮影し、PCR 反応物の有無を確認する。SFTS ウイルス遺伝子陽性の場合、以下のサイズの PCR 反応物が検出される。
  - プライマーセット 1 : 458bp
  - プライマーセット 2 : 461bp

プライマーセット 1 あるいはプライマーセット 2 のどちらか一方でも予想されたサイズの PCR 反応物が検出された場合は SFTS ウイルス遺伝子陽性と判定する。検出されたバンドのサイズが予想されるものと異なると考えられる場合等は必要に応じて PCR 反応物の塩基配列を決定し、SFTS ウイルスの塩基配列だった場合は陽性と判定する。陽性コントロールに予測されるサイズの PCR 反応物が検出されない場合あるいは陰性コントロールに予測されるサイズの PCR 反応物が検出される場合は、再検査を要する。

## 4. 血清学的検査法

### 4-1. 間接蛍光抗体法

#### 4-1-1. 必要な試薬や機器（同等品で代替可）

消毒用アルコール、ディスポ手術用手袋、PBS、トリプシン-EDTA、チューブ、フラスコ（T75 等）、DMEM 培地、FBS、アセトン、アセトン固定用容器（ガラス製）、二次抗体（Alexa Fluor 488 標識抗ヒト IgG、Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG、FITC 標識抗ヒト IgM : Thermo Fisher scientific FITC-Goat anti-human IgM ( $\mu$  chain) 等)、抗 SFTS ウイルス抗体（抗 SFTSV NP ウサギ血清等）、ピペット、低速遠心機、CO<sub>2</sub> インキュベーター（CO<sub>2</sub> 濃度 5%、庫内温度は 37°C 設定）、連続分注ピペット、UV トランスイルミネーター、湿箱（スライドが乾燥してしまうことを防ぐ為に使用する）、蛍光顕微鏡

#### 4-1-2. 検査方法

##### 4-1-2-1. スライドの作製

- 4-1-2-1-1. Vero 細胞を、4 つの T75 フラスコに播種しコンフルエントになるまで培養する。
- 4-1-2-1-2. 4 つの内、1 つのフラスコに MOI=0.1 ( $8 \times 10^6$  の細胞数と見做し、 $8 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> のウイルスを使用する) 相当のウイルスを添加する。
- 4-1-2-1-3. 感染 2 日後に 4 つ全てのフラスコ内の細胞をトリプシン-EDTA で剥離させ、チューブに回収し、PBS で 3 回洗浄する。
- 4-1-2-1-4. 32ml の PBS に浮遊させる。
- 4-1-2-1-5. 浮遊させた細胞をスライドグラス上ウェルにスポットしていく（液量は 1 ウェルあたり 10 $\mu$ L）。
- 4-1-2-1-6. 安全キャビネット内で 2 時間、UV 照射下、風乾によりウェルを完全に乾燥させる。
- 4-1-2-1-7. アセトンを入れた容器にスライドを浸けて 3 分間静置することで細胞を固定する。
- 4-1-2-1-8. スライドをバットから取りだし風乾により乾燥させる。
- 4-1-2-1-9. UV トランスイルミネーターを用いてスライドに UV を 30 秒程度照射する。
- 4-1-2-1-10. スライドは使用するまで -80°C で保管する。

##### 4-1-2-2. 間接蛍光抗体法

- 4-1-2-2-1. 検体を 60°C、30 分間処理し非働化する（あらかじめ処理を行なっておき、

冷蔵保存しておいてもよい)。

- 4-1-2-2-2. スライドを-80℃から取りだし室温に戻しておく。
- 4-1-2-2-3. 検体の希釈系列を作製する。希釈液は PBS、最小の希釈倍率は 10 倍、2 倍ずつの希釈系列で 640 倍まで作製する。一検体あたり 7 つの希釈系列が出来る。
- 4-1-2-2-4. 各希釈済み検体を 20μL ずつウェルにアプライする。
- 4-1-2-2-5. 陽性コントロールとして、抗 SFTSV NP ウサギ血清を 100 倍希釈から 2 倍ずつ 1 4 の希釈系列を調製し、20μL ずつウェルにアプライする。
- 4-1-2-2-6. スライドを湿箱にしまい 37℃の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間反応させる。
- 4-1-2-2-7. PBS の入った洗瓶を用いてスライドを洗浄する。
- 4-1-2-2-8. ウェルが直接接触しないように注意しながらペーパータオル上に軽くスライドを叩きつけて洗浄液を除く。
- 4-1-2-2-9. PBS で 200 倍に希釈した Alexa Fluor 488 標識抗ヒト IgG または FITC 標識抗ヒト IgM をウェルにアプライする。陽性コントロールには Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG を 200 倍希釈して用いる。
- 4-1-2-2-10. スライドを湿箱にしまい 37℃の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間反応させる。
- 4-1-2-2-11. PBS の入った洗瓶を用いてスライドを洗浄する。
- 4-1-2-2-12. カバーガラスを乗せて、蛍光顕微鏡で蛍光を確認する。

#### 判定

その検体に於ける蛍光が確認できる最大の希釈倍率を抗体価とする。陽性コントロールが 12,800 倍以上（作製した抗原スライドのロットによる）の希釈で蛍光シグナルが確認できない場合は、スライドに塗布した抗原の劣化が考えられるため、別のロットで再検査を行なう。

## 4-2. 中和試験

### 4-2-1. 必要な試薬や機器（同等品で代替可）

DMEM、FBS、12 ウェルプレート、Vero 細胞、抗 SFTSV ウイルス抗体（抗 SFTSV-NP ウサギ血清等）、二次抗体 (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP 等)、PBS、Triton X100、Tween20、スキムミルク、ホルマリン、1%メチルセルローズ/2%FBS-MEM、ペルオキシダーゼ染色 DAB キット (nacalai tesque 25985-50)

#### 4-2-2. 検査方法

- 4-2-2-1. 12 ウェルプレートを用いて Vero 細胞を培養し単層を準備する。上清を 0.5mL (1 ウェルあたり) の 2%FBS-DMEM と交換する。
- 4-2-2-2. 2%FBS-DMEM を用いて検体を階段希釈 (10, 40, 160, 640 倍等) する。
- 4-2-2-3. 0.05mL あたり 100 FFU 程度の SFTS ウイルスを含む 2%FBS-DMEM を作製する。
- 4-2-2-4. 4-2-2-2. で作製した検体 0.05mL と 4-2-2-3. で作製したウイルス 0.05mL、あるいは 2%FBS-DMEM (コントロール) と 4-2-2-3. で作製したウイルス 0.05mL を混合し、37°C で 1 時間培養する。
- 4-2-2-5. 4-2-2-1. の Vero 細胞に 4-2-2-4. の混合液を添加し、37°C で 1 時間培養する。
- 4-2-2-6. 混合液を除いて、0.5mL の 2%FBS-DMEM で 1 回 Vero 細胞を洗浄後、1% メチルセルロース/2%FBS-MEM を 1 ウェルあたり 1mL ずつ入れる。
- 4-2-2-7. 37°C で約 7 日間培養する。
- 4-2-2-8. 10%ホルマリンで固定後、UV 照射で 2 重にウイルスを不活化する。
- 4-2-2-9. 0.1% Triton X100 を含む PBS を加え室温で 10 分インキュベートする。
- 4-2-2-10. PBS で 3 回洗浄する。
- 4-2-2-11. 5%スキムミルク/0.5% Tween20/PBS で 1,000 倍希釈した抗 SFTSV-NP ウサギ血清を加え、室温で 1 時間インキュベートする。
- 4-2-2-12. PBS で 3 回洗浄する。
- 4-2-2-13. 0.5% Tween20/PBS で 1,000 倍希釈した HRP Goat anti-Rabbit IgG を加え、室温で 1 時間インキュベートする。
- 4-2-2-14. PBS で 3 回洗浄する。
- 4-2-2-15. ペルオキシダーゼ染色 DAB キットで focus を発色させ、focus 数を数える。
- 4-2-2-16. 平均 focus 数がコントロールの平均 focus 数の半分以下になる検体の最大希釈倍率をその検体の中和抗体価とする。

## 5. SFTS の診断基準

次のいずれかが満たされた場合、SFTS とする。

- 分離・同定による病原体の検出
- RT-PCR 法による病原体遺伝子の検出
- 蛍光抗体法による抗体の検出 (IgM 抗体の検出又はペア血清による抗体陽転若しくは抗体価の有意の上昇)
- 中和試験による抗体の検出 (ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意の上昇)

## 6. 連絡先

国立感染症研究所ウイルス第一部第一室

室長 下島昌幸

TEL: 042-848-7020

FAX: 042-561-2039

e-mail: shimoji-@nih.go.jp