

事務連絡  
令和6年10月15日

地方獣医師会会長 各位

公益社団法人 日本獣医師会  
専務理事 伏見啓二

### 「病原体検出マニュアル（動物由来検体）」の作成について

このたび、令和6年10月9日付け事務連絡により厚生労働省健康・生活衛生局感染症対策部感染症対策課から本会あてに情報提供がありましたのでお知らせします。

このたびの通知は、厚生労働行政推進調査事業費及び日本医療研究開発機構研究費において、「病原体検出マニュアル（動物由来検体）」が作成され、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）について公開されたことをお知らせするものです。

つきましては、内容について了知の上、会員への周知方お願いいたします。

本件のお問合せ先

公益社団法人 日本獣医師会

事業担当：岡本、中村、松岡

TEL:03-3475-1601

E-mail: [okamoto@nichiju.or.jp](mailto:okamoto@nichiju.or.jp)

事務連絡  
令和6年10月9日

公益社団法人 日本獣医師会 御中

厚生労働省健康・生活衛生局感染症対策部感染症対策課

「病原体検出マニュアル（動物由来検体）」の作成について

今般、厚生労働行政推進調査事業費及び日本医療研究開発機構研究費において、「病原体検出マニュアル（動物由来検体）」が作成され、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）について公開されたのでお知らせします。つきましては、内容について御了知の上、貴会会員にご周知いただきますよう、お願いいたします。

本マニュアルについては、SFTS以外の感染症についても、今後準備が整い次第、順次公開される予定です。

なお、同内容について都道府県等宛てに通知しておりますことを申し添えます。

（参考）

別添：「病原体検出マニュアル（動物由来検体）」重症熱性血小板減少症候群（SFTS）

国立感染症研究所HP：獣医科学部トップページ

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vet/2450-vet-top.html>

病原体検出マニュアル  
(動物由来検体)  
重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス

第1版  
令和6年3月

## 1. 概説

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は、38°C以上の急性発熱、血小板減少、白血球減少、多臓器機能不全などの臨床症状を呈する人獣共通感染症である。SFTSの原因ウイルスは2011年に中国で最初に発見され<sup>1)</sup>、2013年以降、日本、韓国、ベトナム、台湾、タイを含む多くの国から報告されている<sup>2-5)</sup>。我が国における第1例の公表に伴い、2013年3月に感染症法における四類感染症に分類され全数把握疾患となった。また、近年、感染したイヌ、ネコなどの伴侶動物との接触による獣医師及び飼い主等の感染リスクが明らかとなりその対策が課題となっている<sup>6-12)</sup>。

ヒト検体を検査するためのマニュアルはすでに整備され、国立感染症研究所のHPに掲載されている<sup>13)</sup>が、動物検体の検査方法は、国立感染症研究所獣医科学部により検討され一部ヒト用とは異なるPCR法が採用されており、今回、令和5年度新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「愛玩動物由来人獣共通感染症の対策を目指した総合研究」においてマニュアルを作成した。これらのマニュアルの作成に関しては、令和3年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「野生動物及び愛玩動物が保有する動物由来感染症の国内サーベイランスシステムの構築に資する研究」が基礎となり、更にマニュアルの公開に関しては令和5年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「ワンヘルス動物由来感染症サーベイランスの全国展開に向けた基盤構築に資する調査研究」により推進された。

ここで採用している S7 primer set は、少なくとも動物由来検体で検証した限り、従来ヒト用に用いられてきたPCRよりも感度が高い一方、増幅領域が短いため系統樹解析等には不向きである。リアルタイムPCR法はヒト検体にも使用可能であるが、プローブ領域に変異がある場合ウイルスを検出できず偽陰性となるリスクがあるというリアルタイムPCRに共通の欠点があることに注意が必要である。

### 1-1 病原体

原因ウイルスは、フェヌイウイルス科、バンダウイルス属の *Bandavirus dabieense* であり、一般に重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)と呼ばれる。SFTSVゲノムは、3本の一本鎖RNAからなり、RNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)をコードするLセグメント、受容体との結合や細胞内への侵入に重要な役割を果たすエンベロープ糖タンパク質(GP)GnとGcをコードするMセグメント、そしてヌクレオカプシドタンパク質(Np)とインターフェロンシグナル伝達経路と相互作用し、自然免疫の回避に重要な役割を果たす非構造タンパク質(NSs)の両方をコードするSセグメントを含んでいる。

日本、中国、韓国で分離されたSFTSウイルス遺伝子の系統樹解析により、東アジアに分布するSFTSウイルスは主に中国系統と日本系統の二つの系統に分類される<sup>13)</sup>。

### 1-2 疫学

**ヒト：**患者の発生は春から秋に多く、マダニの活動時期と関連があると考えられる。年間100名以上の患者報告があり、その多くは西日本で発生している。2017年以降、東海地方、千葉県<sup>14)</sup>、富山県でも報告されており<sup>15)</sup>、感染地域は東へ拡大する傾向にある。患者の多くは野外においてマダニに刺されることにより感染するが、SFTSVに感染した動物からも感染することが明らかとなっている。

**動物：**SFTSVの自然宿主はマダニ及びイノシシ、シカなどの野生の哺乳動物であると思われるが、伴侶動物であるイヌ、ネコにも感染することが知られており、SFTSV感染症のイヌ、ネコにおける発

生は 2017 年以降、西日本を中心に認められている<sup>16-19)</sup>。特にネコの発生が多く、屋外に出る動物にリスクがあると考えられる。

### 1-3 臨床症状及び検査所見

**ヒト：**潜伏期間は 6 日から 2 週間であり、発熱、頭痛、全身倦怠感を認め、マダニによる刺咬を確認できない場合も多い。続いて食欲低下、嘔吐、下痢、腹痛など消化器症状、時に刺咬部の所属リンパ節腫大が見られる。意識障害、皮下出血や下血等の出血傾向を認める場合がある。血液検査では白血球減少、血小板減少、逸脱酵素(AST、ALT、LDH)の上昇が多くの症例で認められ、しばしば血球貪食候群を合併する<sup>1,2)</sup>。SFTS に対する有効な治療薬は開発されておらず、患者の多くは高齢者であり、意識障害、出血傾向を伴う場合は予後が悪く、我が国の 2013-17 年における平均致死率は、27%と極めて高い<sup>20)</sup>。

**伴侶動物：**ネコの SFTSV 感染症は、有症状であること、血液検査所見、死亡率が高いことなど、ヒト SFTS に類似している<sup>21,22)</sup>。初期の症状は急激な活動性の低下、食欲不振、発熱であり、約半数の症例が嘔吐を伴い、一部では下痢が認められることもある。また黄疸が認められることが多い。血液検査では白血球減少、血小板減少、総ビリルビン値の上昇(ネコ)、炎症性タンパク質である SAA(ネコ)や CRP(イヌ)の上昇が認められ、筋組織の逸脱酵素である CPK の上昇を伴うことが多い。肝由来の逸脱酵素(ALT や AST など)は一部で著しく上昇することがあるが、正常値であることも多い。症状は急激に進行し重症化する傾向にある。ネコの致死率は約 60%と高く、重症化例では発症からの生存日数は 7 日程度である。発症から回復期にかけて動物の体液(血液、唾液、涙)や排泄物(糞、尿)中にウイルスが排出され、体液、排泄物との接触、咬傷によってヒトや他の動物への感染源となる可能性がある。SFTSV 感染症のイヌやネコから飼主や獣医療従事者が感染したことが疑われる事例が複数報告されており、伴侶動物の SFTSV 感染症を早期に診断し、速やかな感染防護策を開始することが重要である。ただし、現時点では、動物の SFTSV 感染症を診断しても届出について法律上の規定はない。

**野生動物：**国内ではイノシシ、ニホンシカ、アライグマ、マングース、イヌおよびネコの SFTSV 感染状況について血清疫学調査が愛媛県、山口県、和歌山県、大分県、長崎県、鹿児島県、宮崎県および沖縄県で行われており、ヒト患者が多い地域における野生動物の抗体陽性率は高い傾向が示されている<sup>23-29)</sup>。特にヒトの SFTS 患者発生とニホンシカの抗体保有率には正の相関がみられることから、発生リスクのモニタリングとして野生動物の血清疫学調査が有用であると考えられる。

## 2. 検査の準備

### 2-1 検査材料の取り扱い

SFTSV は感染症法に規定する三種病原体等取扱施設(BSL3 施設相当)で取り扱う必要があるが、SFTSV が含まれていると確定される前の検体は BSL2 施設での取り扱いも可能である。しかし、その際には、手袋等適切な PPE(Personal Protective Equipment)を着用し、飛沫および接触感染予防策を講じて取り扱う必要がある。

### 2-2 検査材料の採取

SFTSV は通常、血清からウイルス遺伝子を検出するが、血液だけでなく口腔内拭い液、糞便、尿等からも検出されるため、それらの検体も検査に供することができる。発症動物の検体は高濃度のウイルスを含んでいる可能性があるため、検体採取の際は適切な感染予防策を講じることが重要である。

### 2-3 検査材料の保管・運搬

採取した検体は、検査に供するまでは冷蔵(4℃以下)保管する。ただし、長期に保管する場合は、冷凍(-20℃以下)保管が望ましい。また、検体が血液の場合は遠心分離を行い、血漿または血清の状態にして保管する。

運搬の際には保冷状態を保ち、凍結融解が起こらないようにする。

### 3. 検査の進め方

SFTSV 感染の有無を確認するには、SFTSV の分離・同定、SFTSV 遺伝子の検出(RT-PCR 法)及び SFTSV 抗体の検出(IgM 抗体の検出また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)がある。選択する検査方法は各施設の判断であるが、飼育動物が SFTS を発症した場合、飼主や診療にあたる獣医療従事者は感染するリスクが高く、早期に感染症予防策を講じることが重要になるため、診断には迅速かつ特異性、感度ともに高い RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出が有用である。ただし、採材時期によってはウイルス遺伝子が検出されないこともあるので注意する。

抗体の検出も診断には有用である。抗 SFTSV 抗体は発症後 1 週間で検出可能で、IgG 抗体は約 5 年間検出できる。抗体の検出にはウイルス中和試験や ELISA、蛍光抗体法などがあるが、SFTSV は三種病原体なので所持には届出が必要であり、中和試験を実施する際には BSL3 施設で行う必要があるため、ここではより簡便な ELISA 法を記載する。また、動物の SFTSV 抗体検査は、診断に用いるほか、地域における SFTSV の浸淫状況を把握し感染リスクを知る上でも有用な指標となる。ただし、ELISA 法は非特異反応が検出されやすいので結果の解釈に注意が必要である。

ウイルス分離の手法については、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 月を参照のこと。

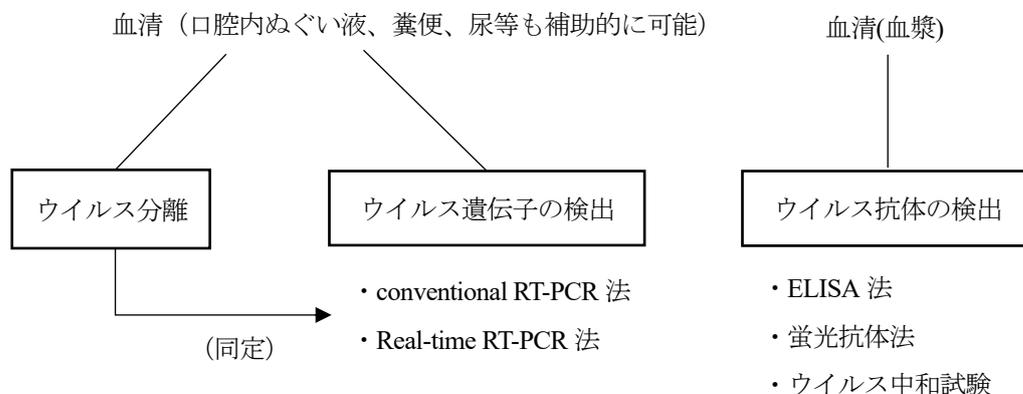


図 1. SFTSV 検査の概要

## 4. SFTSV 遺伝子の検出 (RT-PCR 法)

### 4-1 RNA 抽出

#### 4-1.1 必要な器具と試薬 (同等品で代替可)

RNA 抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini Kit : QIAGEN 社等)、分子生物学用エタノール、遠心機、マイクロピペット、1.5 ml チューブ、フィルター付きマイクロピペット用チップ

#### 4-1.2 方法

RNA 抽出には多くの方法があり、抽出キットも多数市販されている。各施設で目的に応じて良いと判断した方法にて RNA 抽出を行っても問題ない。なお、詳細については各キットに付属のマニュアルを参照すること。

本マニュアルでは例として QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN 社)による方法を示す。

- 1) 使用前にキットに付属しているマニュアルに従い、Carrier RNA 溶液 1 $\mu$ g/ $\mu$ l、Buffer AVL/Carrier RNA 混和物、Buffer AW1、Buffer AW2 を調製する。検体は、室温(15~25°C)に戻してから使用する。
- 2) 操作法  
以下の操作はすべて室温で行う。
  - (1) 1.5 ml チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560  $\mu$ l を入れる。
  - (2) 検体 140  $\mu$ l を入れ、Buffer と充分混合するため 15 秒間ボルテックスした後、室温(15~25°C)に 10 分間置く。チューブの壁面等に付着している液体を落とすため卓上遠心機で数秒間遠心する(スピンドウン)。
  - (3) エタノール(96~100%)560 $\mu$ l をチューブに加え、15 秒間ボルテックスした後、チューブをスピンドウンする。
  - (4) (3)の液 630  $\mu$ l を QIAamp スピнкаラムに入れ、蓋を閉め、6,000 $\times$ g(8,000 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、残りの (3)の液 630  $\mu$ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う。
  - (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 を 500  $\mu$ l 入れる。蓋を閉め、6,000 $\times$ g(8,000 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
  - (6) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW2 を 500  $\mu$ l 入れる。蓋を閉め、20,000 $\times$ g(14,000 rpm) で 3 分間遠心する。スピнкаラムとろ液等が接触することが無いよう静かに取り出す。必要に応じて(7)を行う。
  - (7) QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。フルスピードで 1 分間遠心する。
  - (8) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5 ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE を 60  $\mu$ l 加え、蓋を閉めて

1 分間置いた後、6,000×g(8,000 rpm)で 1 分間遠心する。

(9) このろ液が抽出 RNA であり、抽出 RNA は-80°Cでの保存が望ましい。

## 4-2 conventional RT-PCR 法

### 4-2.1 必要な器具と試薬 (同等品で代替可)

Onestep RT-PCR 試薬(QIAGEN OneStep RT-PCR Kit : QIAGEN 社)、プライマー(下記参照)、RNase free 水、電気泳動用アガロース、電気泳動用バッファー、DNA 検出用蛍光試薬、分子量マーカー、サーマルサイクラー、電気泳動装置、トランスイルミネーター、遠心機、マイクロピペット、1.5 ml チューブ、PCR 用チューブ、フィルター付きマイクロピペット用チップ

### 4-2.2 conventional RT-PCR 反応 <sup>29)</sup>

#### 1) Primer の配列とターゲット領域

	プライマー名	領域	部位	増幅断片(bp)	プライマー配列(5'-3')
No.1	SFTSV-S7F	S 分節	S1028-1048	125	GCCATCTGTCTTCTTTTTGCG
	SFTSV-S7R		S1131-1152		AGTCACTTGCAAGGCTAAGAGG
No.2	SFTSV-S2F	S 分節	S1347-1369	201	TGCTGCAGCACATGTCCAAGTGG
	SFTSV-S2R		S1524-1496		GACACAAAGTTCATCATTGTCTTTGCCCT

#### 2) 試薬の調整

RT-PCR に使用する反応液を作製する。なお、PCR 反応に使用する試薬は、多数販売されているので、各施設で感度や反応条件などを検討の上、試薬を選定しても問題ない。

RT-PCR 反応液		
試薬	No.1	No.2
	容量 (μl)	容量 (μl)
RNase free water	15	13
5×QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5	5
dNTP Mix (10 mM each)	1	1
Forward primer (10μM)	0.5	1.5
Reverse primer (10μM)	0.5	1.5
QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix I	1	1
Template RNA	2	2
Total	25	25

#### 3) RT-PCR 反応

No.1 (SFTSV-S7 primer)

50°C	30 min	
95°C	15 min	
94°C	30 sec	40 サイクル
52°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	
4°C		

#### No.2 (SFTSV-S2 primer)

50°C	30 min	
95°C	15 min	
94°C	30 sec	40 サイクル
60°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C		

#### 4) 電気泳動

PCR 産物 5 µl を、1.5～2.0%アガロースゲルを用いて泳動する。泳動後ゲルを DNA 検出用蛍光試薬で 10 分から 20 分間染色する。

#### 5) 写真撮影、バンドの確認

染色したゲルはトランスイルミネーターで写真撮影し、バンドの確認を行う。2 種類のプライマーセットのうち 1 つでも予想されたサイズの PCR 産物が検出された場合は SFTSV 遺伝子陽性と判定する。また、必要に応じて PCR 反応物の塩基配列を決定する。検出感度は SFTSV-S7 primer の方が良い傾向にあるが、SFTSV-S2 primer にのみ反応する場合もあるため、2 種類のプライマーを用いて検査を実施することを推奨する。

#### 6) 検査系成立条件

陽性コントロールのバンドが予想されるサイズに検出されること及び陰性コントロールにバンドが検出されないことを確認する。

### 4-3 Real-time RT-PCR 法

#### 4-3.1 必要な器具と試薬 (同等品で代替可)

Onestep リアルタイム RT-PCR 試薬(QuantiTect Probe RT-PCR kit : QIAGEN 社)、プライマーおよびプローブ(下記参照)、RNase free 水、マイクロピペット、遠心機、リアルタイム PCR 装置、1.5ml チューブ、96well リアルタイム PCR 反応プレート、8 連ストリップキャップまたはプレートシール、フィルター付きマイクロピペット用チップ

#### 4-3.2 Real-time RT-PCR 反応 <sup>30)</sup>

##### 1) Primer、Probe の配列

領域	名称	配列(5'-3')
S 分節	S segment forward primer	TGTCAGAGTGGTCCAGGATT
	S segment reverse primer	ACCTGTCTCCTTCAGCTTCT
	qPCR-S-TaMn (FAM) probe	(FAM)TGGAGTTTGGTGAGCAGCAGC(MGB)
M 分節	M segment forward primer	GGCAGCTACATGCAGACATA
	M segment reverse primer	CCTATCACCCCCAGAATCCA
	qPCR-M-TaMn(C-FAM) probe	(FAM)GCCCTGTTTGGCAATGGGCT(MGB)
	qPCR-M-TaMn(T-FAM) probe	(FAM)GCCTTGTTTGGCAATGGGCT(MGB)
PC check	PC Check probe (VIC-comp)	(VIC)AGTAGCTTGCTCTTTCATCTGTTACG(MGB)

##### 2) スタンダード RNA 配列

国立感染症研究所より配付のある陽性コントロールの塩基配列は以下のとおり。

S 分節のスタンダード：

TGTCAGAGTGGTCCAGGATTGCAGTGGAGTTTGGTGAGCAGCAGCTCAATTTGACTGAGCTTGAA  
GATTTTGCAGAGAGAGCTGGCCCGTAACAGATGAAAGAGCAAGCTACTCATCAAGAAGCTGAAGGA  
GACAGG

M 分節のスタンダード：

GGCAGCTACATGCAGACATATCATAGTTCTGTACCCACAGGAGTAGCTTGCTCTTTCATCTGTTACG  
GGCTGAATGCCCTGTTTGGCAATGGGCTGAGTAGGTGGATTCTGGGGGTGATAGG

下線：プライマー結合部位、二重下線：プローブ結合部位、網掛け：PC チェック結合部位

##### 3) 10×primer/probe mix の調整

試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

S 分節用 10×primer/probe mix

	Final Conc. (μM)
S segment forward primer	4
S segment reverse primer	4
qPCR-S-TaMn (FAM) probe	2
PC Check probe (VIC-comp)	2
RNase-free Water	

M 分節用 10×primer/probe mix

	Final Conc. ( $\mu\text{M}$ )
M segment forward primer	4
M segment reverse primer	4
qPCR-M-TaMn (C-FAM) probe	2
qPCR-M-TaMn (T-FAM) probe	2
PC Check probe (VIC-comp)	2
RNase-free Water	

#### 4) 試薬の調整

Real-time RT-PCR に使用する反応液を作製する。PCR 反応に使用する試薬は、多数販売されているので、各施設で感度や反応条件などを検討の上、試薬を選定しても問題ない。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

陽性コントロールについては、初回は  $10^7 \sim 10^1$  コピー/ $4\mu\text{l}$  を作製し増幅することを確認する。2回目以降は、各分節において Ct 値 40 以内に検出できた希釈倍数 1well おけば十分である。（通常、 $10^3$  あるいは  $10^2$  コピー/ $4\mu\text{l}$ ）。

Real-time RT-PCR 反応液		
試薬	容量 ( $\mu\text{l}$ )	Final Conc.
RNase free water	3.8	
2× QuantiTect Master Mix	10	×1
10× primer/ probe mix	2	0.4 $\mu\text{M}$ forward primer 0.4 $\mu\text{M}$ reverse primer 0.2 $\mu\text{M}$ probe
QuantiTect RT Mix	0.2	
Template RNA	4	
Total	20	

#### 5) 反応条件

使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度等の確認をしておく必要がある。以下に、試薬に QuantiTect® Probe RT-PCR Kit : QIAGEN 社、リアルタイム PCR 装置に QuantStudio 5 リアルタイム PCR システム、Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム : Applied Biosystems 社または LightCycler 480 : Roche Diagnostics 社を使用する場合の反応条件を示した。

(Standard mode)

50°C      30 min

95°C	15 min	45 サイクル
94°C	15 sec	
52°C	60 sec	

## 6) 判定

S 分節または M 分節の FAM シグナルに増幅が確認された場合、SFTSV 遺伝子陽性と判定する。ただし、検体に PC check 用 VIC シグナルの増幅が確認された場合は陽性コントロールの混入が疑われるため再検査を要する。

Real-time RT-PCR 法は低コピー数まで検出可能ではあるが、プライマー・プローブが結合する配列の変異等があると、検出できない可能性があるため Real-time RT-PCR 法で SFTSV 陰性であっても臨床症状等から SFTSV 感染症が強く疑われる場合には、conventional RT-PCR 法による遺伝子検出や抗体検出法を追加で実施する等の検討を行う。

## 5. SFTSV 抗体の検出 (ELISA 法)

### 5-1 必要な器具と試薬 (同等品で代替可)

SFTSV 抗原(SFTSV 感染 Huh7 細胞溶解液)、mock 抗原(Huh7 細胞溶解液)、HRP 標識抗体(各動物種 IgG あるいは IgM に対する抗体、Protein A/G)、ブロッキング剤(ブロックエース)、ABTS 発色試薬 (KPL ABTS® Peroxidase Substrate System 2-Component : SeraCare Life Sciences, Inc 社)、発色停止液、96well ELISA 用プレート、プレートシール、プレートミキサー、マイクロプレートリーダー、1.5ml チューブ、マイクロピペット、8 連式マイクロピペット、マイクロピペット用チップ、リザーバートレー

### 5-2 試薬の調整 (同等品で代替可)

10×PBS(-)

NaCl 80 g

KCl 2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 29 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g

D.W.で 1000ml にメスアップ

滅菌し、4°Cで保存

1×PBS(-)

10×PBS(-) 100 ml

D.W. 900 ml

滅菌し、4°Cで保存

#### Coating buffer

NaHCO <sub>3</sub>	2.856 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.696 g
D.W.	500 ml

滅菌し、4°Cで保存

#### ブロックエース溶解液

ブロックエース粉末(DS ファーマバイオメディカル社)	4 g
D.W.	100 ml

#### Blocking buffer ※用時調整 (1 plate : 約 20 ml)

1×PBS(-)に 1/3 量のブロックエース溶解液を添加し混合

#### Washing buffer (T-PBS) ※用時調整

1×PBS(-)に 1/2000 量の Tween-20 を添加し混合

#### Dilution buffer

T-PBS に 1/10 量のブロックエース溶解液を添加し混合

#### 発色停止液(1%SDS 溶液) (1 plate : 約 20 ml)

SDS を D.W.で 1%になるよう調整

### 5-3 ELISA 法

#### 1) 抗原のコーティング

- (1) SFTSV 抗原および mock 抗原を Coating buffer で 5 µg/ml になるよう希釈し(1 plate : 約 5 ml)、96well ELISA 用プレートに 100 µl/well ずつ分注する。

チューブヤリザーバートレーへのタンパク質の吸着を防ぐため、抗原希釈液は 1 種類ずつ作成し、作製後直ちにプレートへ分注する。

- (2) プレートシールをして、37°Cで 2 時間インキュベートした後、一晚 4°Cに置く。

翌日に使用しない場合は、使用時まで 4°Cで保管する(1~2 ヶ月は保存可能)。

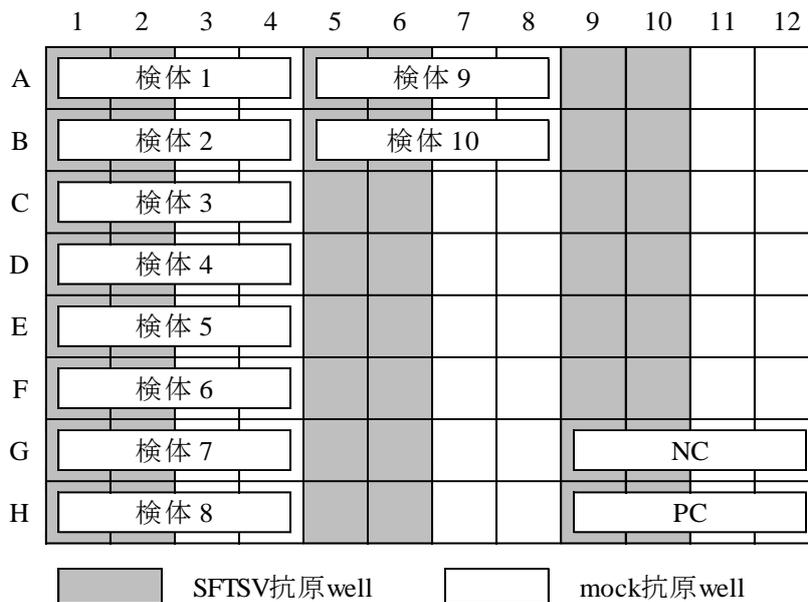


図2 ELISA用プレートレイアウト(例)

## 2) ブロッキング

- (1) 抗原液(コーティング液)を除去する。
- (2) Blocking buffer を 200  $\mu$ l/well 添加する。
- (3) プレートをシールして、37°Cで 30 分間インキュベートする。

## 3) 一次抗体の添加

- (1) 一次抗体(被検血清または血漿)を 60°C で 30 分間インキュベートして非働化する。
- (2) (1)で非働化した一次抗体を Dilution buffer で希釈する(通常 100 倍希釈)。
- (3) Blocking buffer を除去し、Washing buffer 300  $\mu$ l/well で 3 回洗浄する。
- (4) (2)で作製した一次抗体、陽性コントロール及び陰性コントロール(Dilution buffer)を、SFTSV 抗原及び mock 抗原をコーティングしたウェル、それぞれ 2 well に 100  $\mu$ l/well 添加する。
- (5) プレートをシールして、37°Cで 30 分間インキュベートする。

## 4) 二次抗体(HRP 標識抗体)の添加

- (1) 二次抗体を Dilution buffer で使用する抗体に応じた濃度になるよう希釈する。
- (2) 一次抗体を除去し、Washing buffer 300  $\mu$ l/well で 3 回洗浄する。
- (3) (1)で作製した二次抗体を 100  $\mu$ l/well 添加する。
- (4) プレートをシールして、37°Cで 30 分間インキュベートする。

## 5) 発色

- (1) 発色液を作製する。(KPL ABTS® Peroxidase Substrate System 2-Component を使用する場合は、A 液と B 液を 1:1 で混合する。)
- (2) 二次抗体を除去し、Washing buffer 300  $\mu$ l/well で 3 回洗浄する。
- (3) (1)で作製した発色液を 100  $\mu$ l/well 添加する。

(4) マイクロプレートミキサーで攪拌しながら室温で30分間インキュベートする。

6) 発色停止、測定

(1) 発色停止液を100 µl/well 添加し、数十秒間攪拌する。

(2) マイクロプレートリーダーを用いて405 nm の波長で吸光度を測定する。

7) 判定

(SFTSV 抗原に対する OD405 値)－(mock 抗原に対する OD405 値)を算出し、カットオフ値以上であれば陽性と判定する。

各動物種におけるカットオフ値は異なる。感染研で決定しているカットオフ値および試薬は下記のとおり。

動物種	カットオフ値	二次抗体と希釈倍率
イヌ	IgM >0.410	Anti-IgM(µ), Dog, Goat-Poly, HRP(Bethyl Laboratories, A40-116P) 5,000 倍希釈
	IgG >0.646	Anti-IgG(H+L), Dog, Goat-Poly, HRP(Bethyl Laboratories, A40-123P) 5,000 倍希釈
ネコ	IgM >0.580	Goat anti-Feline IgM Secondary Antibody HRP(Novus biologicals, NB7260) 2,000 倍希釈
	IgG >0.742	Goat anti-Feline IgG Fc Secondary Antibody HR (Novus biologicals, NB7270) 2,000 倍希釈
アライグマ	≧0.564	Pierce™ Recombinant Protein A/G, Peroxidase Conjugated(Thermo Fisher Scientific 32490) 20,000 倍希釈

6. 問い合わせ・連絡先

陽性コントロール、SFTSV 抗原及び mock 抗原の分与やその他の問い合わせは下記のとおり。

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所 獣医科学部

前田 健

e-mail [kmaeda@niid.go.jp](mailto:kmaeda@niid.go.jp)

TEL 03-5285-1111

FAX 03-5285-1179

## 7.参考文献

1. Yu XJ, et al., Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med.* 2011, Apr 21;364(16):1523-32.
2. Takahashi T, et al., The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* 2014 Mar;209(6):816-27.
3. Shin J, et al. Characteristics and Factors Associated with Death among Patients Hospitalized for Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2015 Oct;21(10):1704-10.
4. Tran XC, et al., Endemic Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2019 May;25(5):1029-1031.
5. Lin, T.-L. et al., The First Discovery of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Taiwan. *Emerg. Microbes Infect.* 2020, 9, 148–151.
6. Tsuru M, et al., Pathological Characteristics of a Patient with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) Infected with SFTS Virus through a Sick Cat's Bite. *Viruses.* 2021 Jan 29;13(2):204. doi: 10.3390/v13020204. PMID: 33572914; PMCID: PMC7912689.
7. Kirino Y, et al., Seroprevalence of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Small-Animal Veterinarians and Nurses in the Japanese Prefecture with the Highest Case Load. *Viruses.* 2021 Feb 2;13(2):229.
8. Mekata H, et al., Possible Transmission of Severe Fever with the Thrombocytopenia Syndrome Virus to an Individual Who Buried an Infected Cat. *Jpn J Infect Dis.* 2023 May 24;76(3):211-214.
9. Miyauchi A, et al., Suspected Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus from a Cat to a Veterinarian by a Single Contact: A Case Report. *Viruses.* 2022 Jan 24;14(2):223.
10. Yamanaka A, et al., Direct Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus from Domestic Cat to Veterinary Personnel. *Emerg Infect Dis.* 2020 Dec;26(12):2994-2998.
11. Ando T, et al., Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Cats and Its Prevalence among Veterinarian Staff Members in Nagasaki, Japan. *Viruses.* 2021 Jun 14;13(6):1142.
12. 平成 29 年 7 月 24 日付 健感発 0724 第 3 号厚生労働省健康局結核感染症課長通知「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)に係る注意喚起について
13. Yoshikawa, T., et al., 2015. Phylogenetic and geographic relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis* 212: 889-898.
14. 平良雅克ら、関東地方で初めて感染が確認された重症熱性血小板減少症候群の 1 例 (速報掲載日 2021/6/22)(IASR Vol. 42 p150-152: 2021 年 7 月号)
15. 坂東彬人ら、富山県で初めて確認された重症熱性血小板減少症候群の 1 例 (IASR Vol.44 p42-43: 2023 年 3 月号)
16. Kimura T, et al., Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in

- humans and animals in Ehime prefecture, Japan, an endemic region of SFTS. *J Infect Chemother.* 2018 Oct;24(10):802-806.
17. 前田健ら、動物における SFTSV 感染の疫学調査 (IASR Vol. 40 p116-117:2019 年 7 月号)
  18. Hashimoto T, et al., Distribution of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus and Antiviral Antibodies in Wild and Domestic Animals in Oita Prefecture, Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 2022 Feb 28;106(5):1547-51. doi: 10.4269/ajtmh.21-1130.
  19. Matsuu A, et al., Increased Risk of Infection with Severe Fever with Thrombocytopenia Virus among Animal Populations on Tsushima Island, Japan, Including an Endangered Species, Tsushima Leopard Cats. *Viruses.* 2022 Nov 25;14(12):2631.
  20. Kobayashi Y., et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, Japan, 2013–2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26:692–699.
  21. Irie M, et al. Diagnosis of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in a cat with clinical findings resembling lymphoma. *J Vet Med Sci.* 2022 May 17;84(5):675-679.
  22. Park ES, et al. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus causes lethal viral hemorrhagic fever in cats. *Sci Rep.* 2019 Aug 19;9(1):11990.
  23. Hayasaka, D., et. al (2016). Seroepidemiological evidence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infections in wild boars in Nagasaki, Japan. *Tropical Medicine and Health*, 44, 6.
  24. Lundu, T., et. al. (2018). Serological survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in Sika deer and rodents in Japan. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 66, 21–28.
  25. Seroepidemiological study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in animals and humans in Okinawa, Japan.
  26. Kuba Y, Kyan H, Azama Y, Fukuchi Y, Park ES, Kakita T, Oyama M, Maeshiro N, Miyahira M, Nidaira M, Maeda K, Morikawa S, Taniguchi K. *Ticks Tick Borne Dis.* 2021 Nov;12(6):101821.
  27. Kaneko C, et al., Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in medium-sized wild mammals in Miyazaki, Japan. *Ticks Tick Borne Dis.* 2023 Mar;14(2):102115.
  28. Kirino Y, et al., Serological and molecular survey of tick-borne zoonotic pathogens including severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in wild boars in Miyazaki Prefecture, Japan. *Vet Med Sci.* 2022 Mar;8(2):877-885.
  29. Eun-sil Park, et al., Diagnostic system for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus RNA from suspected infected animals PLOS ONE | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238671> January 28, 2021
  30. Tomoki Yoshikawa, 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.* 2014 Sep; 52(9): 3325–3333. doi: 10.1128/JCM.00742-14

## 執筆者一覧

国立感染症研究所	前田健、朴ウンシル、石嶋慧多 下島昌幸
群馬県衛生環境研究所	塚越博之
静岡県環境衛生科学研究所	鈴木秀紀、浅井希
大阪健康安全基盤研究所	青山幾子
島根県保健環境科学研究所	藤澤直輝
岡山県環境保健センター	木田浩司
山口県環境保健センター	川崎加奈子、亀山光博、岡本玲子、織田弥生、松本知美、調恒明
愛媛県立衛生環境研究所	河瀬曜、四宮博人
高知県衛生環境研究所	佐藤亘
熊本県保健環境科学研究所	平野孝昭
宮崎県衛生環境研究所	成田翼、三浦美穂、吉野修司
動物由来感染症リファレンスセンター	

【謝辞】本マニュアルは、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 (JP23fk0108615h0703)の補助金を受けて作成された。本マニュアルは令和3年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「野生動物及び愛玩動物が保有する動物由来感染症の国内サーベイランスシステムの構築に資する研究」(21HA2006)の研究内容が基礎になっており、更に令和5年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「ワンヘルス動物由来感染症サーベイランスの全国展開に向けた基盤構築に資する調査研究」(23HA2010)により公開が推進された。