



福島医発第3032号(地)

平成25年3月29日

各 医 師 会 長 殿

福 岡 県 医 師 会

会長 松 田 峻一良

(公 印 省 略)

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）のウイルス検査キットの配布について

標記の件につきまして、厚生労働省健康局結核感染症課より日本医師会を通して通知がありましたのでお知らせします。

四類感染症として届け出対象となった重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の検査につきましては、これまで国立感染症研究所においてのみの実施が可能でしたが、今般、厚生労働科学研究班においてウイルス検査キットが開発され、別添の検査マニュアルとともに各地方衛生研究所へ順次配布されることとなりました。

つきましては、貴会におかれましても本件についてご了解いただきますようよろしくお願い申し上げます。

小郡三井医師会より

感染症対策担当理事 白石恒明
会長 蒲池 壽

平成25年3月13日

都道府県医師会

感染症危機管理担当理事 殿

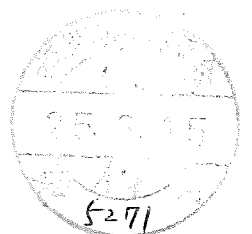
日本医師会感染症危機管理対策室長

小 森 貴

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）のウイルス検査キットの配布について

四類感染症として届け出対象となった重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の検査につきましては、これまで国立感染症研究所においてのみの実施が可能でありましたが、今般、厚生労働科学研究班においてウイルス検査キットが開発され、別添の検査マニュアルとともに各地方衛生研究所へ順次配布されることとなり、厚生労働省より各都道府県等衛生主管部（局）宛事務連絡がなされましたので情報提供いたします。

つきましては、貴会におかれましても本件についてご了知のうえ、郡市区医師会、関係医療機関等に対する周知方について、ご高配のほどよろしくお願い申し上げます。



事 務 連 絡
平成 25 年 3 月 12 日

各 { 都 道 府 県
保健所設置市
特 別 区 } 衛生主管部（局） 御中

厚生労働省健康局結核感染症課

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）のウイルス検査キットの配布について

日頃より感染症対策にご協力賜りありがとうございます。

本年 3 月 4 日より感染症法上の四類感染症として届出対象となった重症熱性血小板減少症候群（SFTS）にかかる検査については、これまで、国立感染症研究所においてのみ実施が可能となっておりましたが、今般、厚生労働科学研究班においてウイルス検査キットが開発され、別添の検査マニュアルとともに、3 月 13 日（水）より各地方衛生研究所へ順次配布されることとなりましたので、お知らせいたします。

当面は、別添の検査マニュアルにあるとおり、各地方衛生研究所においての検査に加えて、結果が陽性となった場合は国立感染症研究所でも検査を行う二重チェック体制となりますので、ご承知おきください。

以上、よろしくお願いいたします。

平成 25 年 3 月 13 日

SFTS ウイルス検査マニュアル

RT-PCR 法により、SFTS ウイルス 核蛋白質(NP)遺伝子の特異的に検出・同定する検査法を解説する。本法は、1 本の反応チューブ内で逆転写反応・遺伝子増幅を連続的に行い、SFTS ウイルス遺伝子を増幅し検出する、いわゆるワンステップ RT-PCR 法である。本法で SFTS ウイルス遺伝子陽性と判定された場合には、検体および抽出 RNA を国立感染症研究所 村山庁舎ウイルス第一部に送付し、判定結果を二重にチェックすることとしたい。なお、ワンステップ RT-PCR 法を採用するのは、実験室内コンタミネーションを極力避けるためである。

【注意事項】

中国での研究から、SFTS ウイルスは感染した場合の発症率が高いことがわかっており、ウイルス分離作業を行う場合には BSL3 実験室対応が必須である。さらに、国内の SFTS ウイルスの実験室感染リスクが現時点では不明であることから、検体の取り扱いには細心の注意が必要である。(なお、SFTS ウイルスは、3 月 4 日付けで感染症法上の三種病原体に指定されていることから、分離したウイルスを所持する場合は 7 日以内に厚生労働大臣に届け出るとともに、三種病原体等取り扱い施設の基準等を満たしている必要がある。)

国内のウイルスの遺伝的多様性を明らかにし、遺伝子検出検査法を改良するためには、ウイルス分離及び遺伝子配列解析が必要なことから、RT-PCR法で陽性となった検体は可能な限り国立感染症研究所ウイルス第一部に送付願いたい。(患者検体および抽出RNAについては、感染症法に基づく特定病原体等の管理規制の対象とはならないが、輸送途中で漏出等の事故を起こし公衆衛生上の危害を及ぼすことのないよう、「感染症発生動向調査事業等においてゆうパック により検体を送付する際の留意事項について」(平成24年3月15日付け健感発0315第1号厚生労働省健康局結核感染症課長通知)等を参考に、検体等の安全な輸送に万全を期されたい。)

【操作法】

1. 検体の採取と保存

遺伝子診断のための検体は、急性期全血あるいは血清などである。全血の場合、ヘパリン添加により PCR が阻害される可能性があるため、抗凝固剤を使用しないか、あるいは EDTA 採血が推奨される。原則として、検体は冷蔵で保存する。検体採取後、速やかに検査しない場合は、血液の場合は血清分離後その血清を、血清の場合はそのまま冷凍保存する。冷凍保存は、-80℃のフリーザーを行うことが望ましい。ウイルス分離を行う場合は、バイオセーフティに十分留意した上で行う。

2. RNAの抽出

広く使用されている QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた方法を示すが、他のウイルス RNA 抽出キット（例えば、Roche Diagnostics 社製 Viral RNA purification kit 等）を用いてもよい。

2-1 材料、機器、器具および試薬

1) 機器・器具

冷却遠心機、1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機、1.5ml エッペンドルフチューブ用卓上遠心機、e-Ice Bucket などサンプルを氷冷するためのもの、ボルテックスミキサー、チューブ

2) 試薬

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN、Cat.No.52904)、エタノール、Distilled water [Deionized、Sterile、autoclaved、DNase free、RNase free、和光純薬工業、Cat No. 318-90105 など（以下 DDW）]

2-2 操作上の注意

1) 検体は、他のウイルス検査と同様に、BSL2 検査室の安全キャビネット内で取り扱う。操作中は手袋・マスクなどの personal protective equipment (PPE) を着用し、チューブの蓋を開ける時には遠心し、チューブオープナーなどを用い、エアロゾルの発生を極力防止する。

2) 実験室内遺伝子コンタミネーション防止と RNase の混入防止に細心の注意を払う。コンタミネーション防止には、試薬調製場所と PCR 産物などサンプルを扱う場所を物理的に分けることが望ましい。できない場合は、それぞれの操作を別々のキャビネット内で行う。

2-3 QIAamp Viral RNA Mini キットによるRNAの抽出

1) 使用前に行う試薬の調製等

(1) サンプルを室温（15～25℃）に戻す。

(2) Carrier RNA 溶液 1 μ g/ μ l の調製

310 μ g の Carrier RNA（凍結乾燥品）入ったチューブに Buffer AVE を 310 μ l 添加し、1 μ g/ μ l の溶液を調製する。Carrier RNA 溶液は、-20℃保存で、凍結融解 3 回までなので、適した量に分注して保存する。Buffer AVL が沈殿を生じていた場合は、80℃でインキュベートし、沈殿を溶解した後、調製に使用する。

(3) Buffer AVL/Carrier RNA 混和物の調製

1 サンプルあたり Buffer AVL 560 μ l、Carrier RNA 溶液 5.6 μ l になるように Buffer AVL/Carrier RNA 混和物を調製する（詳細はキット添付の Handbook Table 1. を参照）。2～8℃で保存すると沈殿物が生じるので、使用直前に 80℃でインキュベートし溶解する。このインキュベートは、5 分以内とする。なお、Buffer AVL/Carrier RNA

混和物は、あらかじめ 560 μ l ずつ分注し、-20℃に保存しておく。

(4) Buffer AW1、Buffer AW2 の調製

Buffer AW1 (Kit Cat.No. 51104) に 96~100%エタノールを 25ml 加える。

Buffer AW2 (Kit Cat.No. 51104) に 96~100%エタノールを 30ml 加える。

2) 操作手順

以下の操作はすべて室温で行う。

(1) 1.5ml チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560 μ l を入れる。

(2) (1)に検体 140 μ l を加え、15 秒間 vortex にかき、室温 (15~25℃) で 10 分間静置する。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 μ l をチューブに加え、15 秒間 vortex をかけた後、チューブをスピンドウンする。

(4) (3)の液 630 μ l を QIAamp スピнкаラム (2ml コレクションチューブ中) 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 2ml のコレクションチューブに移し、残りの(3)の液 630 μ l を入れ、同様に遠心し、全ての液がなくなるまで行う (この操作は 2 回で終わる)。

(5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 を 500 μ 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 2ml 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 μ l 入れる。蓋を閉め、20,000 $\times$ g (14,000 rpm)、3 分間遠心する。スピнкаラムとろ液等が接触することがないように静かに取り出す。接触した時には(7)の操作を行う。

(7) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml 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 (20,000 $\times$ g) で 1 分間遠心する。

(8) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5ml 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 μ l 入れ、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000 $\times$ g (8,000 rpm)、1 分間遠心し、ろ液を回収する。なお、抽出 RNA を保存するときは-80℃が望ましい。

3 One-step RT-PCR 法による SFTS ウイルス遺伝子検出法

スーパースク립ト III ワンステップ RT-PCR システム (Invitrogen) を用いた反応条件を表 1 に示す。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行うことが望ましい。

3-1 必要な器具と試薬

1) 器具

サーマルサイクラー PCR 機器、マイクロピペット、チューブ、0.2ml PCR 用チュー

ブ、UV 照射写真撮影装置、電気泳動装置（例：ミューピッド；アドバンス社）

2) 試薬

スーパースクリプトⅢワンステップ RT-PCR システム（Invitrogen 社 cat# 12574-018）、プライマー（プライマーセット 1 および 2 の 2 種類の PCR を行う）、DDW、電気泳動用アガロース、電気泳動用バッファー

		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)

なお、2 種類の PCR を行うのは、どちらか一方では増幅できないウイルス株がある可能性が考えられるためである。今後、遺伝子配列情報を蓄積し、遺伝子検出法を改良することにより、一つのプライマーセットで対応できると思われる。

3-2 反応プレートの準備と解析

1) 抽出された RNA をテンプレートとして、表に示す通りに反応液を調製する。

表 1 One-step RT-PCR 反応液の調製

2×Reaction mix	12.5 μl
Forward primer (10 μM)	0.5 μl
Reverse primer (10 μM)	0.5 μl
SS III RT/Platinum TaqMix	1.0 μl
DDW	8.0 μl
Template RNA	2.5 μl
Total	25 μl

2) 0.2 ml PCR 用チューブに 22.5 μl ずつ反応液を入れる。陽性コントロール、no template control (NTC) を使用する。陽性コントロール用は、実験室内コンタミネーションを起こした場合に、判別可能な外来塩基配列（EcoRI サイトおよび約 120bp の陽性コントロールチェック用の配列）を挿入してあるので、配布したコントロールを必ず用いる（図 1 参照）。なお、陽性コントロール用には 100 倍濃度に調製した DNA が配布されている。反応液には精製水で 100 倍希釈してから用いる。

- 3) RNA 2.5 μl を加える（検体）。
- 4) 陽性コントロールを 2.5 μl 加える（陽性コントロール）。
- 5) NTC として DDW 2.5 μl を加える（NTC）。
- 6) PCR チューブに蓋をする。

- 7) ウェルの壁についている反応液をスピンドウンする。
- 8) 反応条件を以下のように設定する。
- 1 サイクルの 55°C-30 分、95°C-2 分
- 45 サイクルの 94°C-30 秒、52°C-30 秒、68°C-30 秒
- 1 サイクルの 68°C-5 分
- 10°Cで維持
- 9) Run を開始する。
- 10) Run が終了したら、6×Gel loading dye 2μl と PCR 反応液 10μl をよく混合し、1.5-2%アガロースゲルにて電気泳動を行う。
- 11) 泳動後、エチジウムブロマイドなどで染色する (10-20 分間)。染色後、アガロースゲルを 1 分間水洗し、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 (図 2)。
- プライマーセット 1 : 458bp
- プライマーセット 2 : 461bp

また、陽性コントロールは、以下のサイズの PCR 反応物が検出される (図 2)。

プライマーセット 1 : 584bp

プライマーセット 2 : 587bp

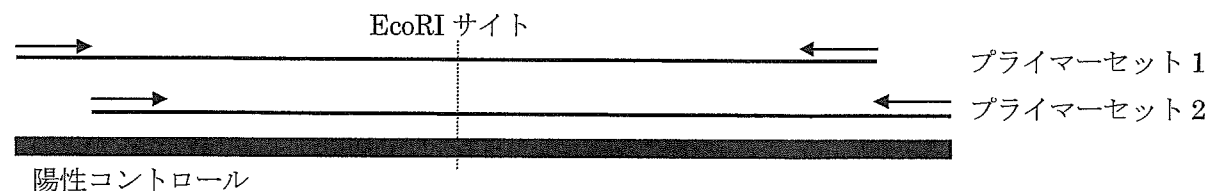


図 1 陽性コントロールについて (模式図)

● Positive II

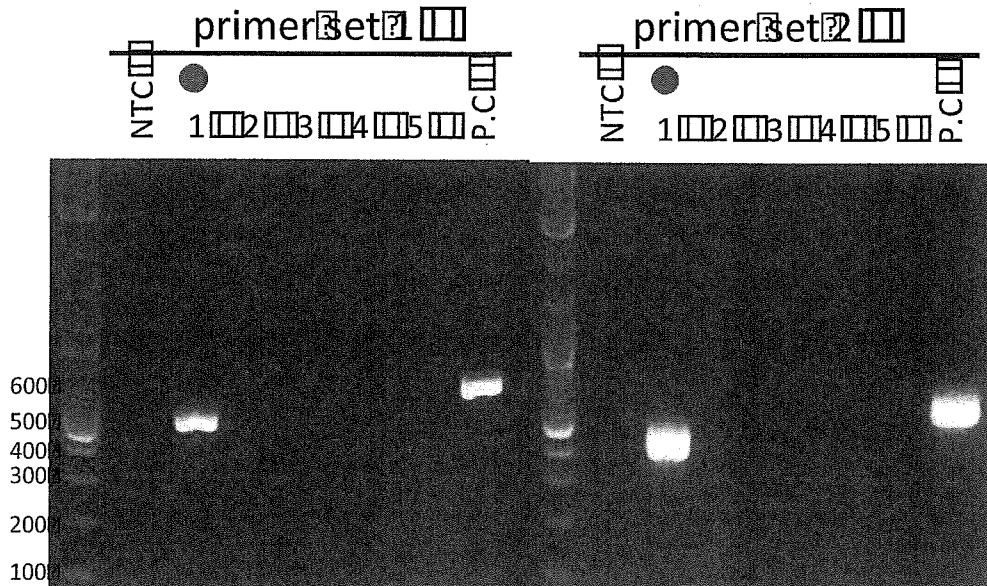


図2 PCR 反応物の電気泳動（例）

12) 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。判定結果を二重にチェックする必要があるため、検体を（可能であれば抽出RNAとともに）国立感染症研究所村山庁舎ウイルス第一部宛に送付する。検体が冷蔵保存されてある場合は冷蔵便で、凍結保存されてある場合は、冷凍便で送付する。（患者検体および抽出RNAについては、感染症法に基づく特定病原体等の管理規制の対象とはならないが、輸送途中で漏出等の事故を起こし公衆衛生上の危害を及ぼすことのないよう、「感染症発生動向調査事業等においてゆうパックにより検体を送付する際の留意事項について」（平成24年3月15日付け健感発 0315 第1号厚生労働省健康局結核感染症課長通知）等を参考に、検体等の安全な輸送に万全を期されたい。）

4 実験室内コンタミネーションが疑われた場合の対処法

PCR 法は高感度であるため、陽性コントロールや検体由来DNA が実験室内コンタミネーションにより擬陽性を呈することに留意する必要がある。コンタミネーション防止には、実験室の配置やサンプルの取り扱いにおいて十分留意する。

配布された陽性コントロールは、SFTS ウイルス遺伝子とは異なるサイズのPCR 増幅産物を示す。検体から検出されたPCR 増幅産物のサイズが陽性コントロールのサイズを示す

場合は、コンタミネーションかどうか確かめる必要がある。陽性コントロールには人工的に遺伝子配列（EcoRI の認識配列）が挿入されているため、制限酵素（EcoRI）処理により判別することができる。なお、制限酵素（EcoRI）処理を行う際も PCR 増幅産物を取り扱うため、その場合においても細心の注意を払い、実験室内コンタミネーションに十分注意する。また、PCR 増幅産物の塩基配列を決定することにより、コンタミネーションかどうか確認することも可能である。

4-1 必要な器具と試薬

1) 器具

マイクロピペット、チューブ、UV 照射写真撮影装置、電気泳動装置（例：ミューピッド；アドバンス社）、恒温装置（37℃で温度を保持できるヒートブロックなど）

2) 試薬

EcoRI（タカラバイオなど）、1×TAE buffer、6×Gel loading buffer、分子量マーカー（タカラバイオなど）、電気泳動用アガロース（ニッポンジーンなど）、エチジウムブロマイド

4-2 制限酵素（EcoRI）処理により判別する方法

制限酵素処理により、増幅された遺伝子の由来を確認する場合には、必ず制限酵素を添加したサンプルと添加しないサンプルの2種類について電気泳動を行い確認すること。

1) 試薬を表3に従って作成する。

表3 EcoRI 処理反応液の調製

10×H Buffer	1 μ l
EcoRI (10U/ μ l)	1 μ l
RT-PCR 増幅産物	8 μ l
Total	10 μ l

2) 37℃で60分間反応させる。

3) 制限酵素処理後、6×Gel loading dye 2 μ l と反応液 10 μ l をよく混合し 1.5-2.0% アガロースゲルにて電気泳動する。

4) 泳動後、エチジウムブロマイドなどで染色する（10-20分間）。染色後、アガロースゲルを1分間水洗する（前もって染色液をアガロースゲルに入れておく場合はこのステップは不要である）。UV 照射装置にて写真撮影する。

5) EcoRI で制限酵素処理を行った場合、プライマーセット1で増幅した陽性コントロールでは、347bp と 327bp に消化される。プライマーセット2で増幅した陽性コントロールでは、316bp と 271bp に消化される。サンプルに陽性コントロールのコンタミネーシ

ヨンがあった場合には制限酵素により消化されるが、増幅された遺伝子が SFTS ウイルス由来である場合には消化されない。

検査依頼先

- ・ 全国都道府県/政令市衛生研究所
- ・ 国立感染症研究所村山庁舎 ウイルス第一部

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

Phone:042-848-7020, Fax:042-561-2039

執筆者

国立感染症研究所ウイルス第一部

下島 昌幸 (shimoji@niid.go.jp)

福士 秀悦 (fukushi@niid.go.jp)

西條 政幸 (msaijo@niid.go.jp)

同獣医科学部

森川 茂 (morikawa@niid.go.jp)