

- ◆山形県衛生研究所
- ◆東京都健康安全研究センター
- ◆愛知県衛生研究所
- ◆京都府保健環境研究所
- ◆広島県立総合技術研究所保健環境センター
- ◆徳島県立保健製薬環境センター
- ◆長崎県環境保健研究センター

これまでに、
野兔病、ブルセラ症、狂犬病、炭疽
の診断・病原体検出法のEQAを実施



獣医科学部

森川茂 部長

井上智、奥谷晶子、野口章、今岡浩一、木村昌伸、堀田明豊

H26年度 狂犬病：遺伝子診断系の検証

方法等

「病原体検査マニュアル(感染研HP掲載)」に準じる。

検体RNAと遺伝子検出用のプライマーを送付

各地衛研で使用されている試薬・機器等を使用して、
検査マニュアルの検証を行うことが目的。

動物由来感染症レファレンスセンター地衛研

- ◆山形県衛生研究所
- ◆東京都健康安全研究センター
- ◆愛知県衛生研究所
- ◆京都府保健環境研究所
- ◆広島県立総合技術研究所保健環境センター
- ◆徳島県立保健製薬環境センター
- ◆長崎県環境保健研究センター

会議参加等 連携衛生研究所（16自治体）

北海道、岩手県、新潟県、富山県、
千葉県、長野県、名古屋市、三重県、
滋賀県、兵庫県、広島県、姫路市、
愛媛県、福岡県、熊本県、沖縄県

成績

One step RT-PCR

| | 感染研 | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K *1) | L | M | N | O | P |
|--------------|-----|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|-------|---|---|-------|---|---|
| サンプル-1 | - | - | - | NT | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| サンプル-2 | + | + | + | NT | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| サンプル-3 | + | + | + | NT | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| 陽性対照RNA | + | + | + | NT | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - *2) | + | + |
| 陰性対照(tempなし) | - | - | - | NT | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

陽性対照RNAは所定量で溶解したものを 10^{-5} 希釈で使用

*1) K: 初回に陰性。追試により陽性となる。

*2) N: 送付陽性対照 10^{-3} 希釈では陽性であったが、 10^{-4} 以上希釈で陰性となった。

Two step RT-PCR

| | | 感染研 | A | B | C | D | E | F *3) | G | H | I | J | K *4) | L | M | N | O | P |
|---------|----------|-----|---|---|---|----|---|-------|---|---|----|---|-------|---|---|---|---|----|
| サンプル-1 | RT(x1) | - | - | - | - | NT | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | NT |
| | RT(x10) | - | - | - | - | NT | - | - | - | - | NT | - | NT | - | - | - | - | - |
| サンプル-2 | RT(x1) | + | + | + | + | NT | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | NT |
| | RT(x10) | + | + | + | + | NT | + | + | + | + | NT | + | NT | + | + | + | + | + |
| サンプル-3 | RT(x1) | - | - | - | - | NT | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - | + | NT |
| | RT(x10) | - | - | - | - | NT | - | - | + | + | NT | - | NT | + | - | - | + | - |
| 陽性対照RNA | RT(x1) | + | + | + | + | NT | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | NT |
| | RT(x10) | + | + | + | + | NT | + | + | + | + | NT | + | NT | + | + | + | + | + |
| 陰性対照 | (tempなし) | - | - | - | - | NT | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

RT(TaKaRa) RT(Wako)

*3) F: 2種類のRT試薬を使用して異なる成績を得た。

*4) K: 初回に陰性。追試により陽性となる。

結果

1. 各地衛研で通常使用している機器・試薬を使用して、病原体マニュアルに準じた遺伝子診断(RT-PCR)が可能であることを検証できた。
2. 配布している陽性対照遺伝子の有効性を検証することができた。

課題

3. 野外検体(脳材料等)からのウイルス抽出を含めた診断系の検討が必要と考えられた。
4. リアルタイムPCR法の確立が望まれた。

アセトン固定に関する論文 (Description about the acetone-fixation in papers)

✓ アセトン固定で狂犬病ウイルスを不活化可能 (ある条件下)

- WHO. 1996. Laboratory techniques in rabies. 4th ed.
- JCM. 16, 253, 1982. Inactivation of rabies virus in reagents used for the fluorescent rabies antibody test.
- Bull Wild Hlth Org. 34, 293, 1966. An intracerebral assay procedure in mice for chemical inactivation of rabies virus.

✓ アセトン固定で狂犬病ウイルスは十分に不活化できない

- Rabies diagnosis manual. Southern and eastern African rabies group.
- J.gen.Virol. 1, 537, 1967. Some properties of fixed rabies virus.

安全で簡易な陽性対照標本の作製にHEP-Flury株を使用

| | 街上毒 | 固定毒 | |
|-------|--------|----------|--------------------------|
| | | CVS-11株 | HEP-Flury株 |
| 感染症法 | 三種病原体 | 基準一部適用除外 | 規制除外病原体 |
| BSL | 3 | 2 | 2 |
| 抹消感染力 | +++ | + | — |
| 脳内接種 | Killed | Killed | Survived (例外: 乳飲みマウス) |

狂犬病陽性対照標本を地方衛生研究所に配布

“ガンマ線照射”と“アセトン固定”を併用した不活化

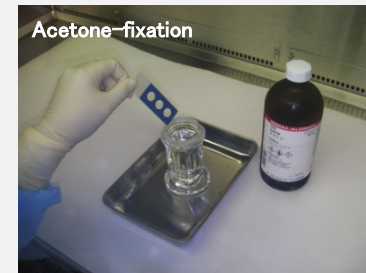
⁶⁰Coガンマ線を 0 Gy - 80 kGy 照射



⁶⁰Co Gamma-ray irradiation system
(⁶⁰Coガンマ線照射装置)



冷アセトン固定 (-20°C, 24 hrs)



- 固定毒(HEP株)を利用して塗抹標本を作成

今年度の動物由来感染症 レファレンスセンターの活動



1. アンケート

- 案1：4年前に行った野兔病の検査法のバリデーション等を再度実施
- 案2：SFTSに関して、野生動物や愛玩動物などの血清疫学用の検査法の供与とバリデーション

2. SFTSウイルスの動物の抗体検査法（案2）に決定

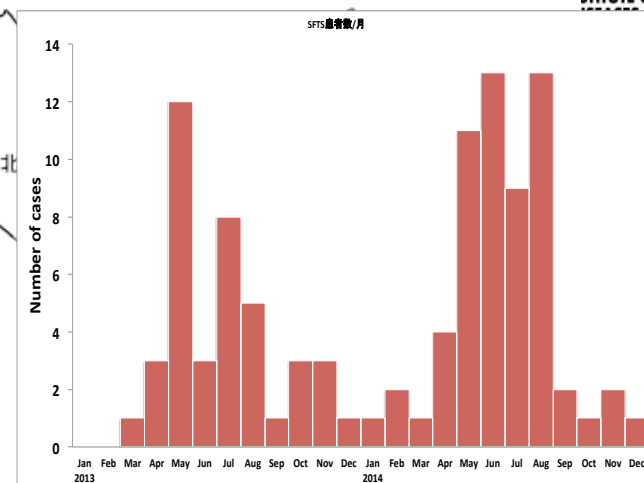
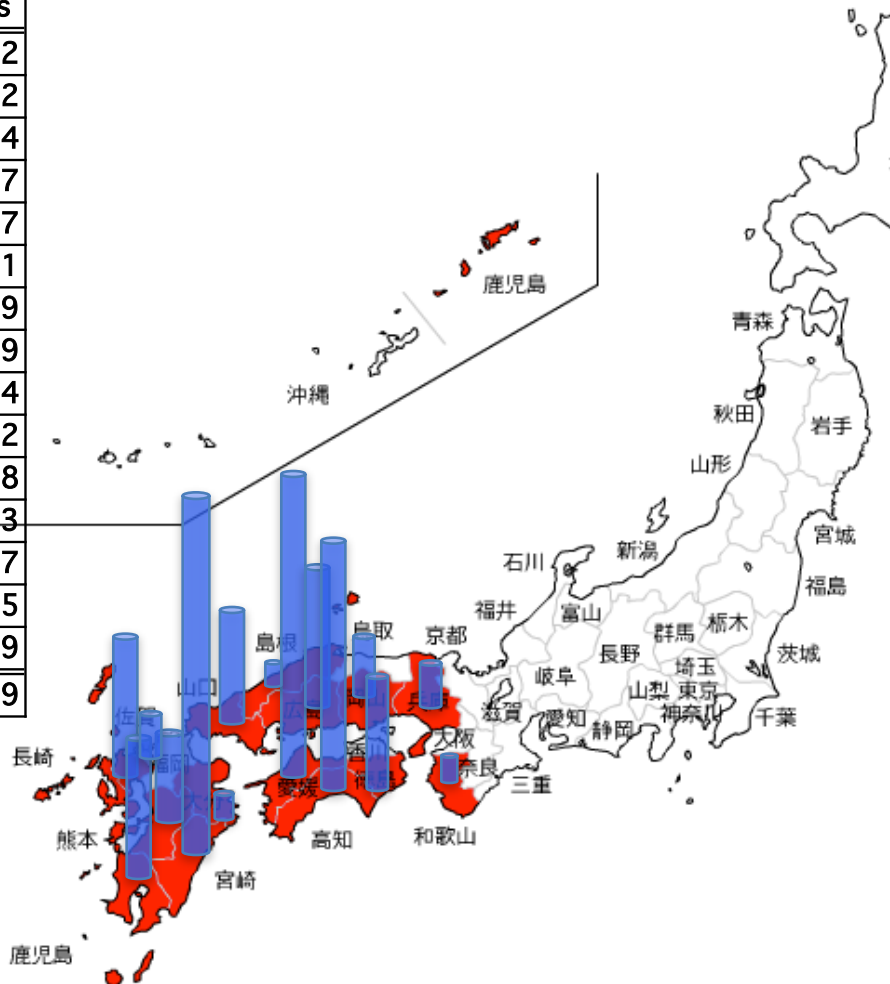
1. 参加自治体：山形県、東京都、愛知県、京都府、広島県、徳島県、長崎県；アドホックで参加（北海道、茨城県、静岡県、広島市、富山県、福岡県、福岡市、熊本県、大分県、宮崎県、沖縄県）の合計18衛研

3. 今後の予定

1. SFTSV抗体検査ELISA用抗原、試薬、陽性対照血清、パネル検体（陽性、陰性を含む）とプロトコールの配布
2. 成績を国立感染症研究所で集計しバリデーションする

Confirmed SFTS patients in Japan

| prefecture | cases |
|------------|-------|
| Wakayama | 2 |
| Hyogo | 2 |
| Okayama | 4 |
| Hiroshima | 7 |
| Yamaguchi | 7 |
| Shimane | 1 |
| Tokushima | 9 |
| Ehime | 19 |
| Kochi | 14 |
| Oita | 2 |
| Miyazaki | 18 |
| Saga | 3 |
| Nagasaki | 7 |
| Kumamoto | 5 |
| Kagoshima | 9 |
| tital | 109 |



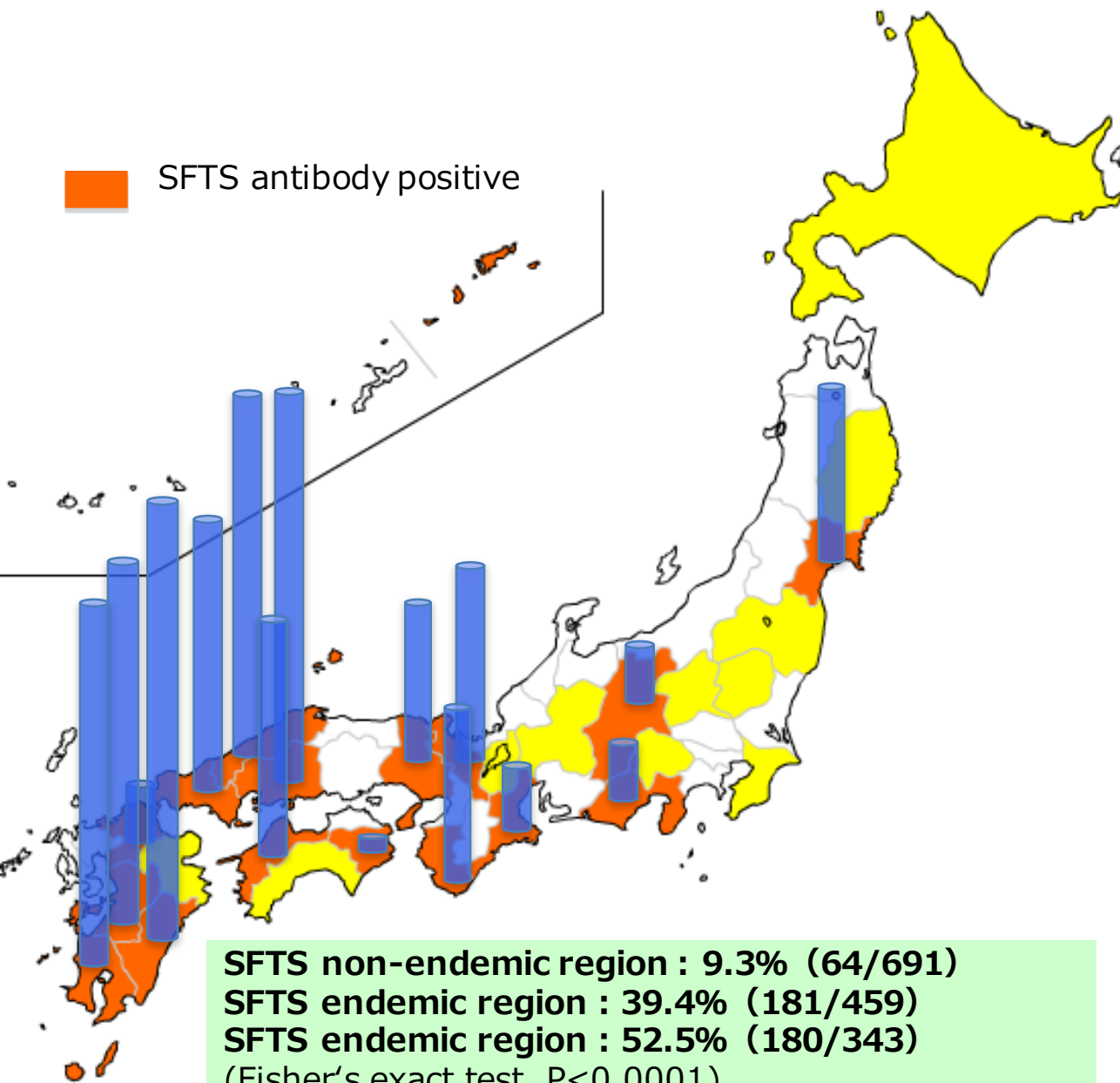
2013 (42cases) 2014 (60cases)

| | | fatal cases | CFR | |
|--------|-------------|-------------|-------|--------------|
| gender | male | 12 | 47 | |
| | female | 18 | 57 | |
| age | median (71) | (80.5) | (73) | |
| | 20th | 0 | 1 | 0.0% |
| | 30th | 0 | 1 | 0.0% |
| | 40th | 0 | 2 | 0.0% |
| | 50th | 2 | 7 | 28.6% |
| | 60th | 5 | 31 | 16.1% |
| | 70th | 8 | 29 | 27.6% |
| 80th | 14 | 32 | 43.8% | |
| 90th | 3 | 6 | 50.0% | |
| | | 32 | 109 | 29.4% |

SFTS cases may be underestimated since CFR of 30 % is significantly higher than that in China (10%).

SFTSV Ab prevalence in wild Japanese deer

 SFTS antibody positive



SFTS non-endemic region : 9.3% (64/691)
SFTS endemic region : 39.4% (181/459)
SFTS endemic region : 52.5% (180/343)
 (Fisher's exact test $P < 0.0001$)

(2007-2014年)

| 道府県 | ELISA陽性 | 検体数 | 陽性率 (%) |
|-----------|---------|------|---------|
| Hokkaido | 0 | 54 | 0 |
| Iwate | 0 | 71 | 0 |
| Miyagi | 14 | 47 | 30 |
| Fukushima | 0 | 4 | 0 |
| Tochigi | 1 | 51 | 2 |
| Gunma | 1 | 45 | 2 |
| Chiba | 0 | 5 | 0 |
| Yamanashi | 0 | 58 | 0 |
| Nagano | 6 | 78 | 8 |
| Gifu | 1 | 51 | 2 |
| Shizuoka | 9 | 51 | 18 |
| Mie | 9 | 41 | 22 |
| Wakayama | 12 | 36 | 33 |
| Kyoto | 10 | 38 | 26 |
| Shiga | 7 | 53 | 13 |
| Hyogo | 18 | 52 | 35 |
| Hiroshima | 4 | 5 | 80 |
| Tottori | 3 | 14 | 21 |
| Shimane | 40 | 55 | 73 |
| Yamaguchi | 85 | 160 | 53 |
| Ehime | 6 | 13 | 46 |
| Tokushima | 1 | 116 | 1 |
| Kochi | 0 | 1 | 0 |
| Fukuoka | 3 | 30 | 10 |
| Oita | 0 | 3 | 0 |
| Miyazaki | 9 | 10 | 90 |
| Kumamoto | 3 | 4 | 75 |
| Kagoshima | 3 | 4 | 75 |
| 合計 | 245 | 1150 | 21 |

今年度の動物由来感染症 レファレンスセンターの活動



1. アンケート

- 案1：4年前に行った野兔病の検査法のバリデーション等を再度実施
- 案2：SFTSに関して、野生動物や愛玩動物などの血清疫学用の検査法の供与とバリデーション

2. SFTSウイルスの動物の抗体検査法（案2）に決定

1. 参加自治体：山形県、東京都、愛知県、京都府、広島県、徳島県、長崎県；アドホックで参加（北海道、茨城県、静岡県、広島市、富山県、福岡県、福岡市、熊本県、大分県、宮崎県、沖縄県）の合計18衛研

3. 今後の予定

1. SFTSV抗体検査ELISA用抗原、試薬、陽性対照血清、パネル検体（陽性、陰性を含む）とプロトコルの配布
2. 成績を国立感染症研究所で集計しバリデーションする