

令和元年度 衛生微生物技術協議会  
動物由来感染症レファレンスセンター

担当：国立感染症研究所 獣医科学部

# これまでの活動

## 動物由来感染症診断法の External Quality Assessment (EQA)

H21	野兔病	H26	狂犬病
H22	野兔病	H27	SFTS
H23	ブルセラ症	H28	野兔病
H24	炭疽	H29	ブルセラ症
H25	炭疽	H30	炭疽

まず、H30年度の結果報告から、

# 平成30年度 炭疽EQA実施内容について

## 炭疽菌DNAを用いた遺伝子検査

### ブラインド・テストおよび検出限界算定

- 炭疽菌および近縁菌種由来のDNAを用いた conventional PCR法による遺伝子検出
- 炭疽菌由来DNAの10倍階段希釈液を用いた conventional PCR法による遺伝子検出限界の算定

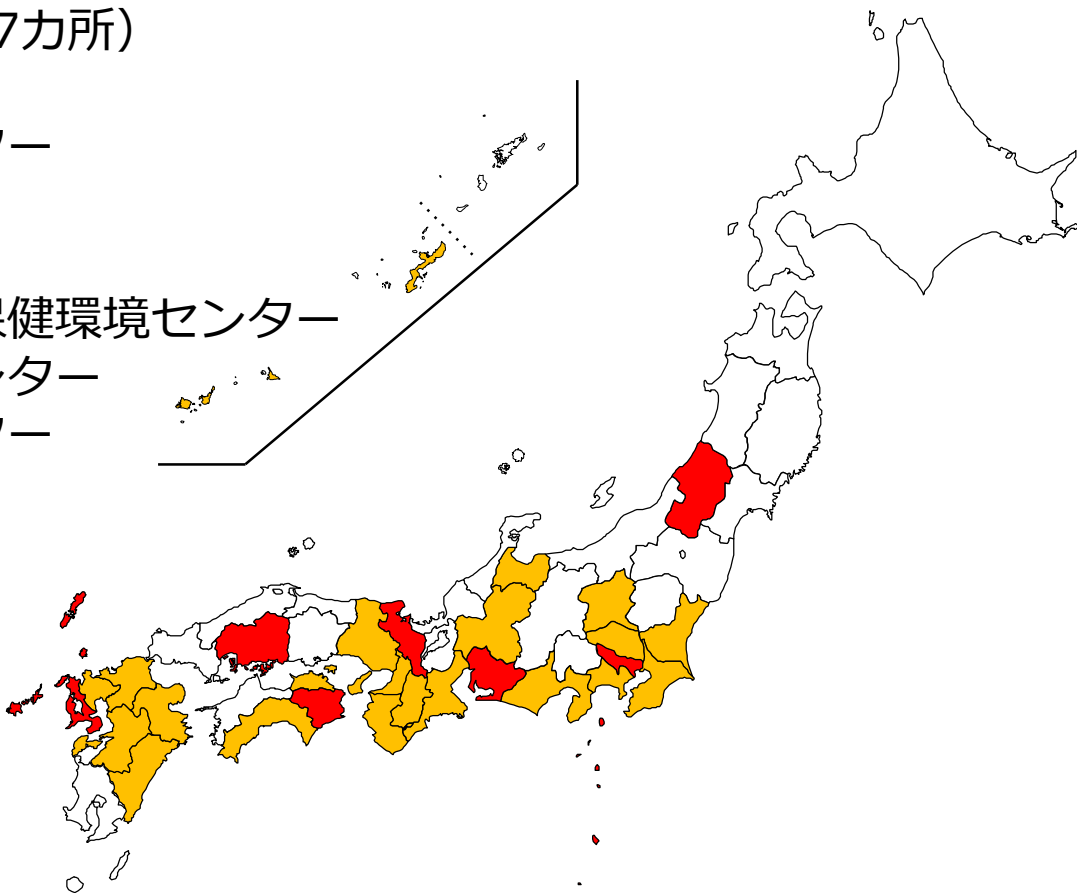
DNAおよびプライマーを配布して、  
各研究所の所有機器で検査を実施

# 平成30年度 炭疽EQA実施機関

平成30年度 参加衛生研究所(37カ所)

- ◆ 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

など



平成30年10月中旬に一斉配布。  
平成31年1月末日 提出締め切り。

# 炭疽菌PCRの概要

◇ 使用菌株 (炭疽菌を含む2菌種、2株)

炭疽菌 (*B. anthracis* 臨床分離株 :  $1 \times 10^7$  CFU/ml)

10倍階段希釈列

( $10^{-1}$ から $10^{-7}$ まで :  $1 \times 10^6 \sim 10^0$  CFU/ml)

セレウス菌 (*B. cereus* 院内感染由来株)

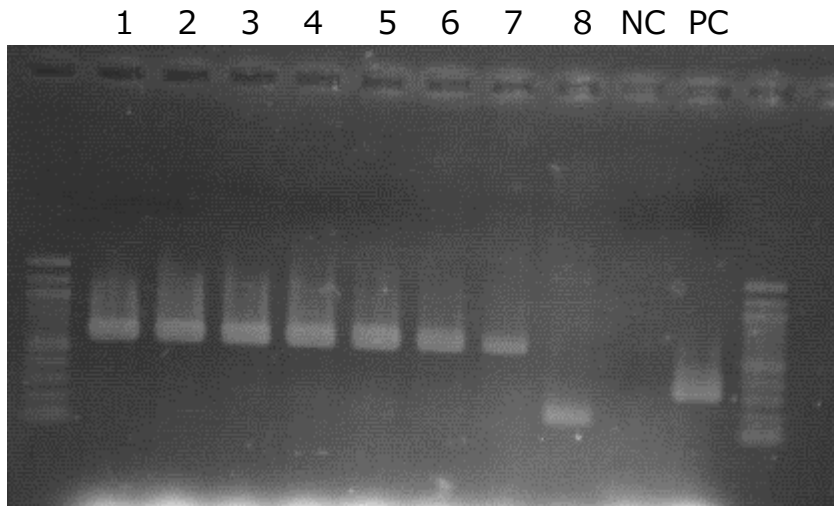
◇ 検査法 : 病原体検出マニュアルに準じる

◇ PCR陽性の判断

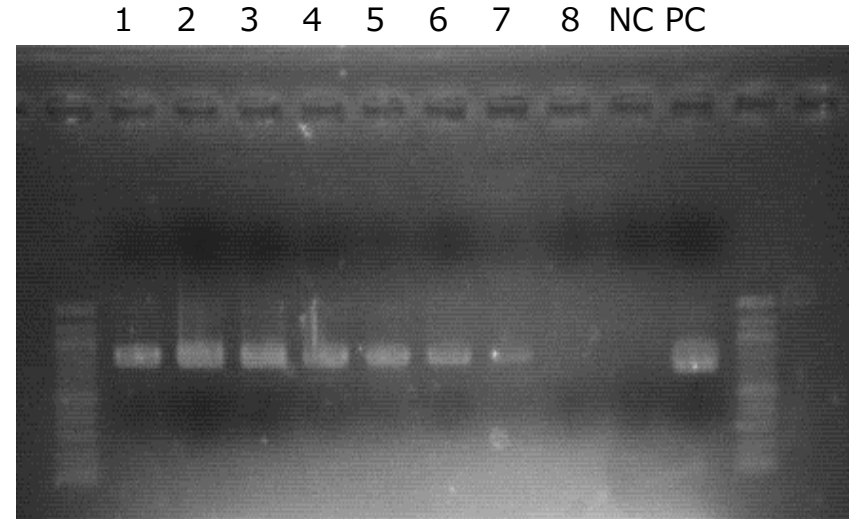
標的遺伝子	鋳型の増幅遺伝子	増幅サイズ	
<i>pag</i> 遺伝子	<i>B. anthracis</i> 由来DNA	⇒ <u>596bp</u>	毒素プラスミド (pXO1)
	陽性対照DNA	⇒ <u>322bp</u>	
<i>cap</i> 遺伝子	<i>B. anthracis</i> 由来DNA	⇒ <u>846bp</u>	莢膜プラスミド (pXO2)
	陽性対照DNA	⇒ <u>720bp</u>	

# 配布した検体のPCR結果

*pag*遺伝子



*cap*遺伝子



アニーリング温度 52℃に設定

レーン	1	2	3	4	5	6	7	8
検体	炭疽菌DNA							セレウス菌DNA
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-1}$

# 炭疽菌*pag*遺伝子/*cap*遺伝子の conventional PCRの検出限界濃度

	検出限界 (DNA希釈濃度) と 提示機関数		
標的遺伝子	10 <sup>-5</sup> 希釈	10 <sup>-6</sup> 希釈	10 <sup>-7</sup> 希釈
<i>pag</i> 遺伝子	3 (機関)	17	17
<i>cap</i> 遺伝子	3	15	19

DNA polymerase

Thermal Cycler

検出限界  
cap/pag

アニーリング温度

TaKaRa ExTaq 5Unit/uL	Applied Biosystems Veriti200	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	55°C
KAPA2G Fast HotStart with dye	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa ExTaq	Applied Biosystems Veriti	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	50°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Simpli Amp	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	ThermoFischer Scientific Pro Flex 3x32 PCR system	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TOYOBO Blend Taq Plus	ThermoFischer Scientific Pro Flex	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	50, 52, 55°C
TaKaRa ExTaq	Applied Biosystems Veriti	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa ExTaq	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700 (pag) TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (cap)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	52°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Bio-RAD T100	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Veriti	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa Tks Gflex DNA polymerase	Astec PC-320	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	50°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa Emerald Amp PCR Master Mix	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice mini TP100	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	50°C
TaKaRa	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa ExTaq	ThermoFischer Scientific Pro Flex	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP650	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa ExTaq	Astec Gene Atlas G	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa	Bio-RAD T100 Thermal Cycler	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TOYOBO Quick Taq HS DyeMix	Applied Biosystems Veriti	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
KAPA Taq Extra Hot Star Ready Mix with Dye	Applied Biosystems Veriti	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Veriti	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Veriti	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	ThermoFischer Scientific Pro Flex	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Veriti	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Bio-RAD Engine Tetrad2	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	50°C
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
TaKaRa ExTaq	ThermoFischer Scientific Pro Flex	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C
Promega Go Taq Hot Start Green Master Mix	Bio-RAD PTC-200	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	55°C
Promega Go Taq Hot Start Green Master Mix	TaKaRa PCR Thermal Cycler Fast	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	50°C
TaKaRa ExTaq	Eppendorf Mastercycler nexus gradient	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	55°C

各参加機関別の  
Polymerase,  
ThermalCycler,  
Endpoint,  
Annealing温度

- \* TaKaRa EX Taq  
Hot Start version
- \* Applied Biosystems
- \* Annealing temp. 55°C

が多い



# 考 察

1. 各参加機関の間でみられたconventional PCR検査系での検出限界の差は、

- ▶ 使用したサーマルサイクラー
- ▶ 使用酵素の活性やPCR反応条件
- ▶ 増幅産物の確認方法

の違いによるものと考えられる。

2. 炭疽発症患者あるいは動物由来の検体中には、通常 $10^6$ CFU/ml以上の炭疽菌が存在していることから、今回検証された検査系においては、参加機関全てで十分な検出限界を有していると考えられる。

# R1年度の実施項目は…

## 1. SFTSの検査：

動物サンプルを想定した特異的遺伝子検出

## 2. 感染症の早期発見のために：

死亡野生動物サーベイランスシステムの  
紹介と試行

## 3. ニパウイルス感染症の検査：

ELISAによる抗ニパウイルス抗体検出

(ただし、一部は衛微協の枠外として実施)

参加申込は、獣医科学部まで

以下、概略・・・

令和元年度 - 1

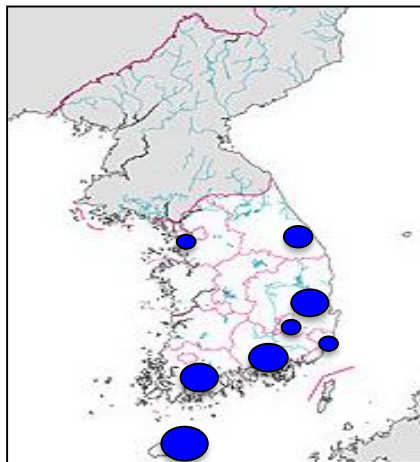
SFTS疑い動物検体からの  
特異的遺伝子検出の実施

# 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome)



**症状：**発熱、消化器症状（食欲低下、嘔気、嘔吐、下痢、腹痛）時に頭痛、神経症状、呼吸障害、出血症状、重症化による死亡

中国：2009-10年に患者6例  
(初報告は2011年)  
2010-14年：3,500名  
(致命率：約10%)

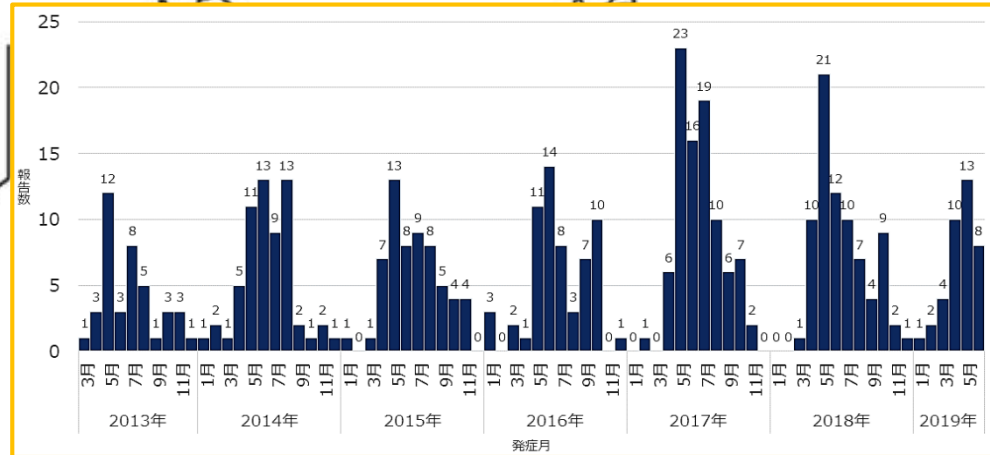
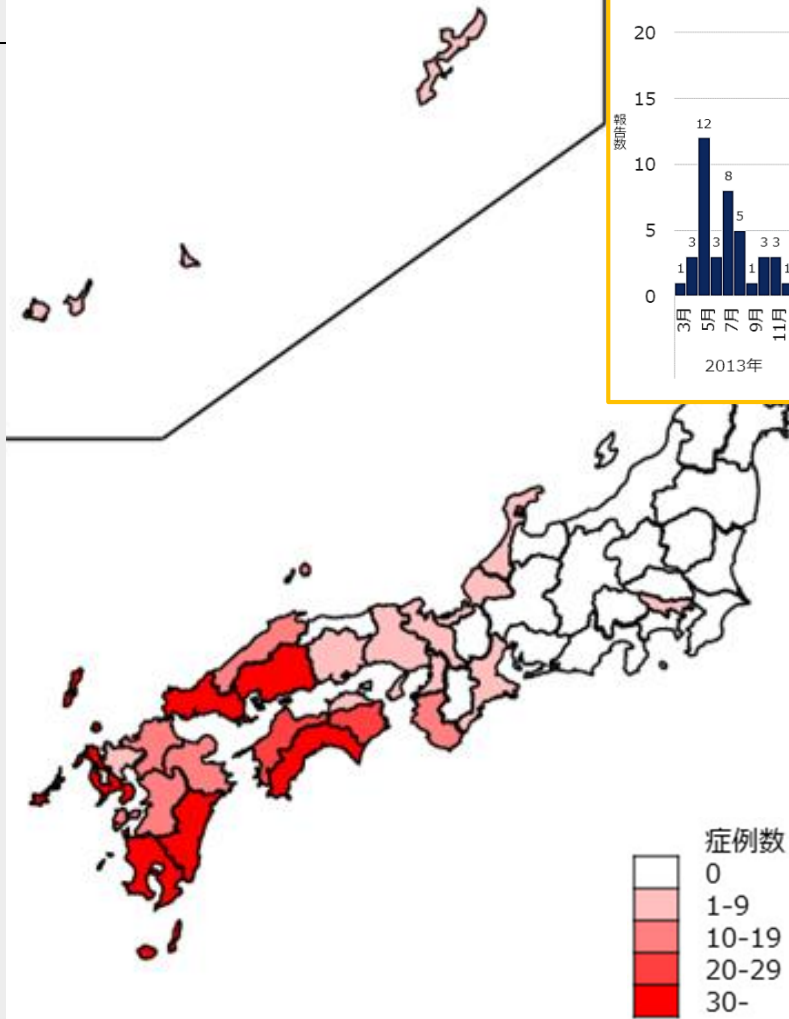


韓国：2013: 36 (死亡17)  
2014: 55 (死亡15)  
(致命率：35.2%)  
神経症状出現率高い。  
2008年にすでに患者が確認。

ベトナム：  
2017.10～2018.3 - 2名患者確認

# 日本の確定診断されたSFTS患者 (~2019.6.26)

届出都道府県	症例数
東京都	1
石川	2
福井	2
三重	7
京都	6
大阪	2
兵庫	3
和歌山	18
島根	16
岡山	8
広島	36
山口	40
徳島	28
香川	6
愛媛	29
高知	38
福岡	13
佐賀	6
長崎	33
熊本	14
大分	18
宮崎	65
鹿児島	42
沖縄	1
合計	434



	生存例	死亡例	合計	
報告数	368	66	434	
性別	男	177	212	
	女	191	222	
年齢	中央値	73歳	80.5歳	74歳
	~20代	5	0	5
	30代	8	0	8
	40代	10	0	10
	50代	24	3	27
	60代	98	11	109
	70代	116	18	134
80代	92	29	121	
90代~	15	5	20	

さかのぼり調査では2005年にはSFTS患者が発生していたことが確認されている。  
SFTS患者は西日本を中心に24都府県で確認されている。

# 愛玩動物が感染源に・・・

健感発 0724 第3号  
平成 29 年 7 月 24 日

各 { 都道府県  
保健所設置市  
特別区 } 衛生主管部(局)長 殿

厚生労働省健康局結核感染症課長  
(公印省略)

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) に係る注意喚起について

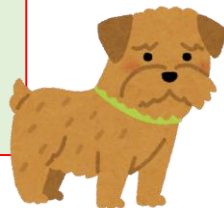
参考：重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) について

<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000169522.html>

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) に関する Q&A (第4版)

[http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou19/sfts\\_ga.html](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou19/sfts_ga.html)

ペットのイヌ・ネコ  
— 発熱と衰弱などの症状  
血小板減少



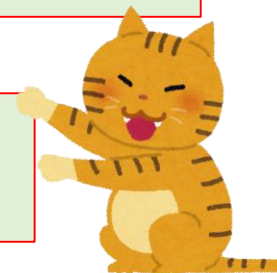
血液・糞便からSFTS ウイルス検出

動物病院勤務者の感染リスクと感染報告あり

イヌ・ネコの感染報告と  
ネコ咬症後のSFTS  
発症・死亡例

SFTS を発症し死亡したヒト

体調不良のネコから  
の咬傷歴があった



2017.7: 動物園のチーター  
2頭が感染して死亡

ネコ科の動物は感染すると  
重篤化する？



感染疑いイヌ・ネコの調査—  
抗体陽性は西日本中心

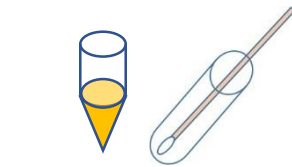
	抗体陽性 (死亡)	致死率 (%)
ネコ	47 (23)	49
イヌ	4 (1)	25

2019.4まで：ネコ120, イヌ7 感染を確認

# EQA: 動物由来のSFTSV RNAを抽出し、 RT-PCR反応により遺伝子を検出する

## 動物検体からSFTSV遺伝子を検出できるRT-PCR法

検体	検出率 (%)
血清 (血漿)	100
口腔内スワブ	58.3
肛門スワブ	90.9



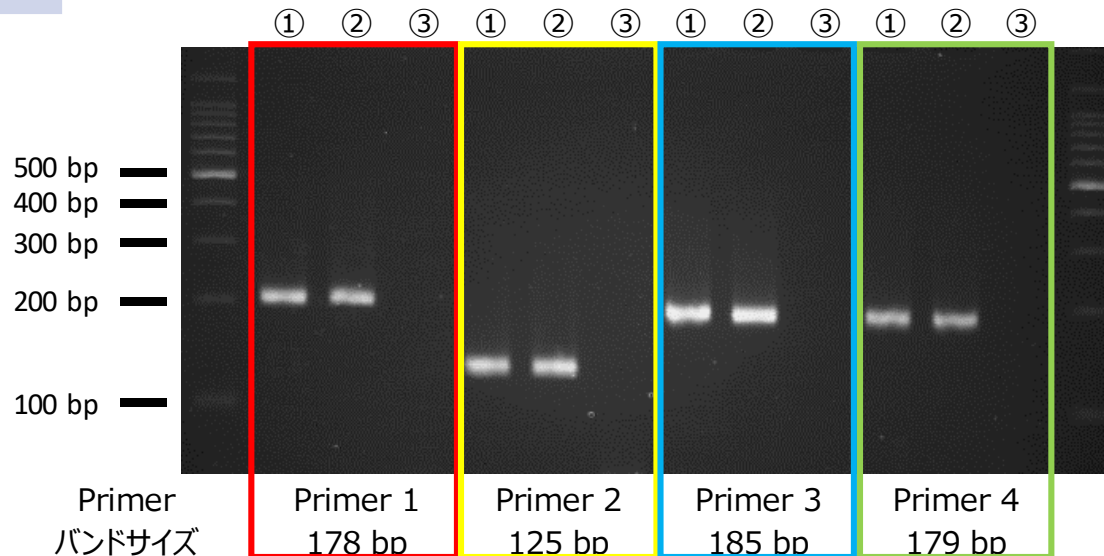
RNA抽出  
(ISOGEN等)



One-step RT-PCR



電気泳動で確認



- ① ネコ血清
- ② 陽性対照
- ③ 陰性対照

令和元年度 - 2

野生動物の死亡状況を把握するための  
Webシステムの試用



# 野生動物死亡状況調査の体制

## 野生動物の死亡個体数をモニタリング

統括

厚生労働省 結核感染症課



国立感染症研究所

データ解析

報告書の作成

調査システム

登録されたデータは自動的に集計され、随時閲覧可能。

報告機能：週間および四半期の定期報告（希望ユーザのみ）、緊急報告（全ユーザ）



都道府県および  
政令指定都市

現在のところ約10自治体が調査協力

調査協力

データ入力



検疫所・公園事務所  
その他協力機関

現在のところ約3検疫所が調査協力

死亡動物調査

データ入力

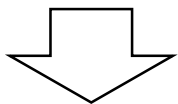
有事の際  
迅速な情報の共有化

ウエストナイル熱や狂犬病等の早期流行を把握及び制御

# 新システム【死亡動物調査(DAS)システム】の構成

## 新規登録

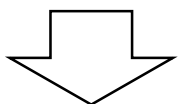
所属種別  
(選択)



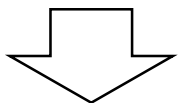
所属部署  
(記入)

メールアドレス  
(記入)

メール配信希望  
(選択)



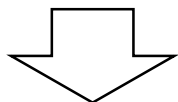
確認



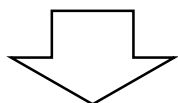
パスワード  
発行

## ログイン認証

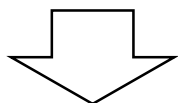
### 死亡動物数の報告



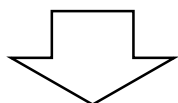
発見日  
(選択)



発見場所  
(〒番号)



動物種・数  
(記入)



確認

### 集計データ

都道府県別死亡数

- カラス
- その他鳥類
- その他動物

動物種別集計

年間死亡数の推移

- カラス
- その他鳥類
- その他動物

種別比率

- カラス
- その他鳥類
- その他動物

死亡動物の変動 (年別)

- カラス
- その他鳥類
- その他動物

死亡動物数の変動 (年月別)

- カラス
- その他鳥類
- その他動物

### 報告書

週間報告メール

四半期報告メール

### ユーザ情報の編集

ユーザ情報の変更

ユーザ情報の削除

### 管理者用ページ

# 野生動物の死亡状況調査について

## 【背景】

ウエストナイル熱や狂犬病など、現在国内で確認されていないが、海外では継続した流行が確認されている疾患がある  
野生動物を介した侵入や拡大、定着のリスクがある  
侵入や流行を早期に察知するには、野生動物死亡数調査も有効

## 【課題】

どのようにしてデータを集積して行くか？  
問合せ？ 報告依頼？  
頻度は（毎日、毎週、毎月）？  
集積したデータを、どの様に管理するのか？  
集積したデータから得られる情報の共有方法は？

## 【解決】

登録・データ集積機能を有する調査システムの構築  
インターネットを活用する

## 【目的】

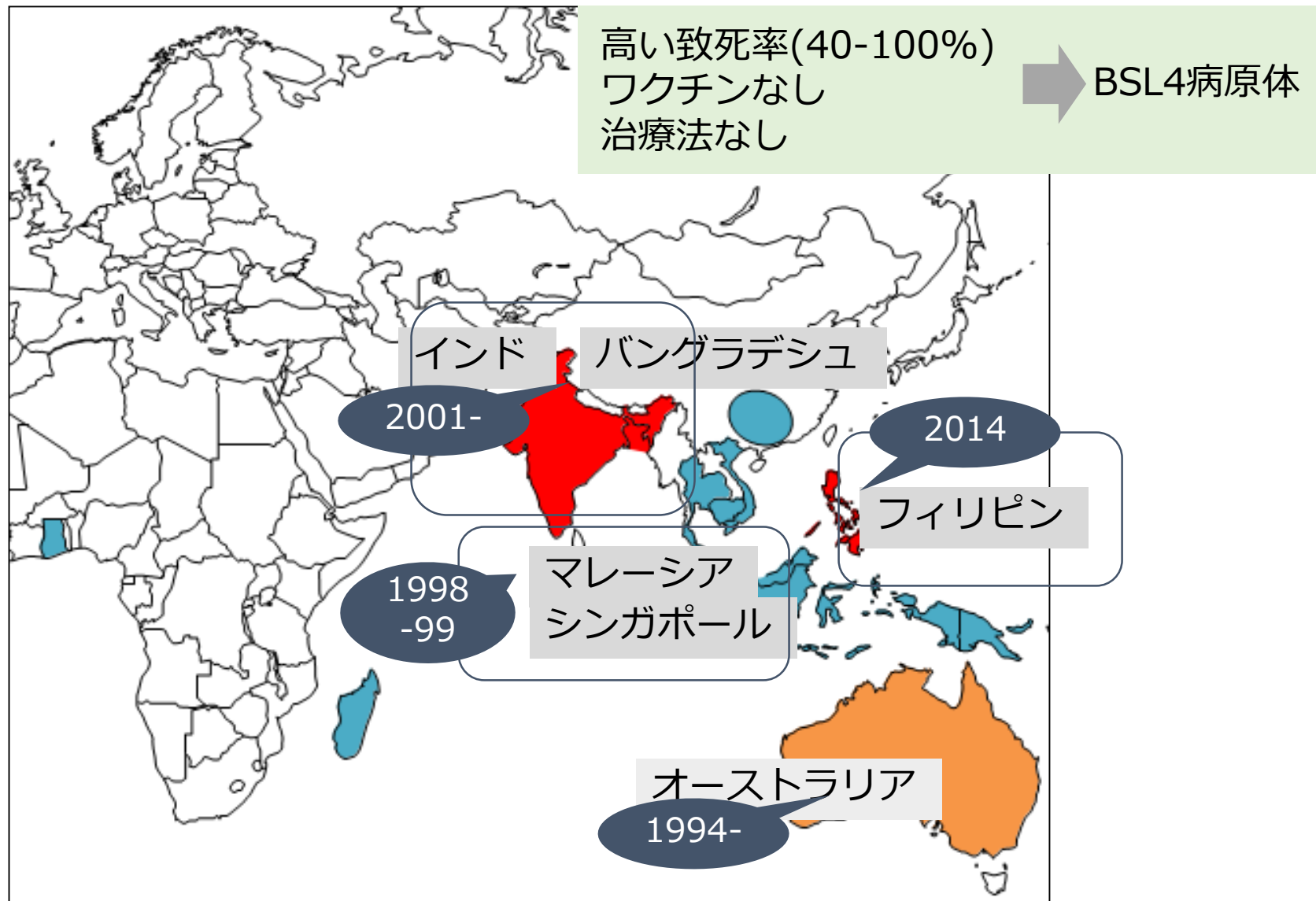
野生動物の死亡個体数調査し、様々な情報を、  
関係機関と効率的に共有できる環境を構築する  
DAS (Dead animal surveillance) システムの開発と運用

- \* まず、システムの試用により内容を確認してもらう
- \* 将来的な参加を検討してもらう
- \* 同時に、問題点を指摘してもらい、システムの改良へつなげる

令和元年度 - 3

ニパウイルス感染症における  
抗体検査法(ELISA)の実施

# ニパウイルス感染症

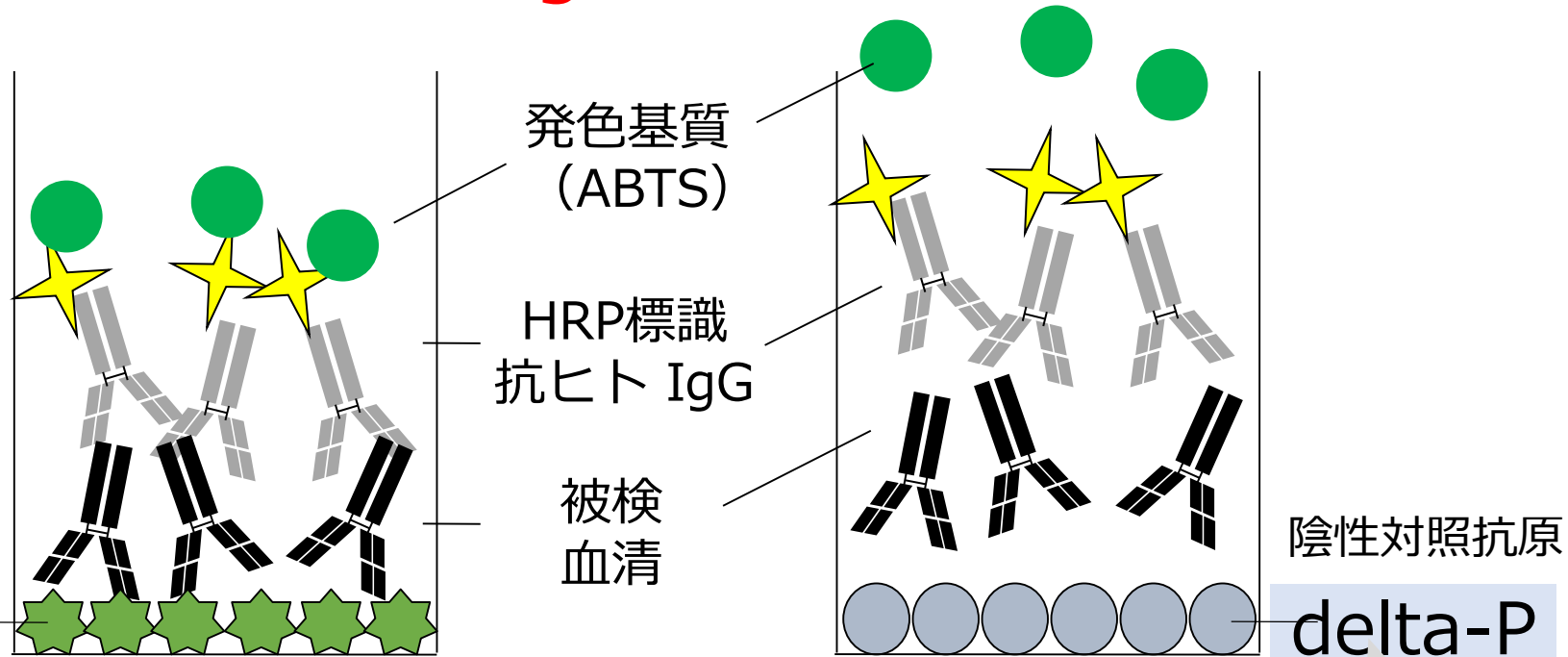


ニパ発生国

ヘンドラ発生国

オオコウモリから  
ヘニパ抗体(+ )確認

# ニパウイルス IgG検出ELISA 模式図



NiV-N発現  
バキュロウイルス  
感染細胞より調製

OD値の差を測定

ポリヘドリン欠損  
バキュロウイルス  
感染細胞より調製

$[NiV-N]OD_{405}$ の平均  
-  $[delta-P]OD_{405}$ の平均

$> 0.2$   
 $\leq 0.2$

ELISA-reactive

ELISA-non-reactive

中和試験で  
確定診断へ  
(感染研)

- 1) 検討事項 1～3 より、実施可能な物、実施してみたい物を選択  
(必ずしも全て実施する必要はない)
- 2) 実施期間は、9月～11月中を予定
- 3) 参加希望は、感染研 獣医科学部  
担当者まで

以上