

(参考資料1)

『感染症流行予測調査事業』への協力をお願い

1. はじめに

感染症流行予測調査事業では、ワクチンで予防ができる病気に対して免疫を持っているかどうかを地域別や年齢別など、いろいろな面から比較・検討しています。また、お子さまの下痢便にロタウイルスが含まれていないかどうかを確認しています。

これらの結果をその他のいろいろな情報と併せて検討することにより、長期的視野で病気の流行を予測でき、例えば、風しんや麻しん（はしか）に対して免疫を持っていない人の数（感受性人口）の推計や、定期接種の対象、予防接種スケジュールを決定するための参考資料となっているなど、日本の予防接種政策に反映されています。これらはいずれも世界で類を見ない優れた科学的調査法となっています。

2. 調査方法について

本事業では、以下の内容の調査を行っています。調査にあたって提供いただいた血液又は便などの検体は、抗体測定又はウイルスや細菌の分離・同定に利用され、年齢や性別、採取都道府県名、採取年月及び予防接種歴・罹患歴のデータとともに、今後の予防接種計画の作成や感染症の流行を予測するための資料の作成に活用されます。また、上記検体の情報及び予防接種歴・罹患歴のデータは、国・都道府県の規定により適切に管理されます。

なお、ご提供いただいた血液や便などの所有権は放棄いただきます。

【病気に対する免疫の有無を調査】

全国の様々な年齢の健康な方からいただいた血液から血清を分離して、免疫の有無を調べます（抗体価の測定）。今回いただいたあなたの血清では、[ポリオ、インフルエンザ、日本脳炎、風しん、麻しん、ヒトパピローマウイルス感染症、水痘、B型肝炎、新型コロナウイルス感染症]（○印の付いた病気）について調査を行います。

【予防接種歴、罹患歴を調査】

これまでの予防接種歴や感染症にかかったことがあるかの情報も併せてお伺いすることで、長期的な予防接種の効果を見ることができます。

【ロタウイルスの有無を調査】

ロタウイルスは、小児の下痢症の代表的な原因ウイルスですが、2020年10月からロタウイルスワクチンが定期の予防接種に導入されました。この調査では、下痢を認めるお子さまから便をいただき、ロタウイルスやノロウイルス、サポウイルスなど下痢を起こす代表的なウイルスがないかどうかについて調査（PCR検査）を行います。

3. 調査結果について

調査結果をお知りになりたい場合は、担当者（下記の問い合わせ先を参照）にその旨をお伝えください。また、場合によっては、結果が出るまでに数か月以上かかる場合がありますので御了承ください。

なお、集計・解析された結果は『感染症流行予測調査報告書』として厚生労働省から発行され、今後の予防接種計画の作成や感染症の流行を予測するための資料として利用されています。また、国立感染症研究所のホームページ（<https://www.niid.go.jp/niid/ja/yosoku-index.html>）にも公開し、広くご覧いただけるようになっています。なお、本調査にご協力いただいた場合でも、個人が特定される情報が発表されることは決してありません。

以上のことをご理解いただき、本事業への協力に御承諾いただけましたら、別紙の同意書に御署名をお願いいたします。なお、調査への協力についての判断は自由意志に基づくものであり、（例：同意後〇日以内）であれば撤回することができます。また、協力の意思を途中で撤回しても、何ら不利益を受けることはありません。

問い合わせ先

◎本事業に関するお問い合わせ：

厚生労働省健康・生活衛生局感染症対策部感染症対策課
〒100-8916 東京都千代田区霞が関1-2-2
TEL 03-5253-1111（代）（内線2036）

国立感染症研究所感染症疫学センター第十一室
〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
TEL 03-5285-1111（代）（内線 2059、2533）

◎調査結果、地域の状況に関するお問い合わせ：

〇〇県〇〇課（住所、電話番号）
〇〇県衛生研究所〇〇部（住所、電話番号）

(申請者用)

『感染症流行予測調査事業』への協力についての同意書

国立感染症研究所長 殿

〇〇県衛生研究所長 殿

私は血液又は便などを『感染症流行予測調査事業』のために提供することについて、口頭及び文書を用いて説明を受け、以下の項目についてその内容を十分に理解しました。

- 1 『感染症流行予測調査事業』に提供する血液又は便などが抗体測定又はウイルスや細菌の分離・同定に利用され、供与者の年齢、性別、採取都道府県名、採取年月及び予防接種歴・罹患歴のデータとともに、今後の予防接種計画の作成や感染症の流行を予測するための資料の作成に活用されること。また、上記検体の情報及び予防接種歴・罹患歴のデータは、国及び都道府県の規定により適切に管理されること。
- 2 提供した血液又は便などの所有権は放棄すること。
- 3 調査結果の公表にあたっては、個人が特定されない形で公表されること。
- 4 この同意書で表明した『感染症流行予測調査事業』への協力についての判断は自由意思に基づくものであり、(例：同意後〇日以内)であれば撤回することができること。
- 5 『感染症流行予測調査事業』への協力の意思を途中で撤回しても、何ら不利益を受けることはないこと。

その上で、感染症流行予測調査事業に協力することに、

- a. 同意します。
- b. 同意しません。(a、bいずれかを選択していただき、○で囲んでください)

令和 年 月 日

自筆署名

保護者署名 (未成年者の場合)

説明者署名又は記名押印

(採血番号貼付欄)

(献血者用)

『感染症流行予測調査事業』への協力についての同意書

国立感染症研究所長 殿

〇〇県衛生研究所長 殿

私は血液又は便などを『感染症流行予測調査事業』のために提供することについて、口頭及び文書を用いて説明を受け、以下の項目についてその内容を十分に理解しました。

- 1 『感染症流行予測調査事業』に提供する血液又は便などが抗体測定又はウイルスや細菌の分離・同定に利用され、供与者の年齢、性別、採取都道府県名、採取年月及び予防接種歴・罹患歴のデータとともに、今後の予防接種計画の作成や感染症の流行を予測するための資料の作成に活用されること。また、上記検体の情報及び予防接種歴・罹患歴のデータは、国及び都道府県の規定により適切に管理されること。
- 2 提供した血液又は便などの所有権は放棄すること。
- 3 調査結果の公表にあたっては、個人が特定されない形で公表されること。
- 4 この同意書で表明した『感染症流行予測調査事業』への協力についての判断は自由意思に基づくものであり、(例：同意後〇日以内)であれば撤回することができること。
- 5 『感染症流行予測調査事業』への協力の意思を途中で撤回しても、何ら不利益を受けることはないこと。

その上で、感染症流行予測調査事業に協力することに、

- a. 同意します。
- b. 同意しません。(a、bいずれかを選択していただき、○で囲んでください)

令和 年 月 日

自筆署名

保護者署名 (未成年者の場合)

説明者署名又は記名押印

ご存じですか？ 感染症流行予測調査事業

【調査の目的について】

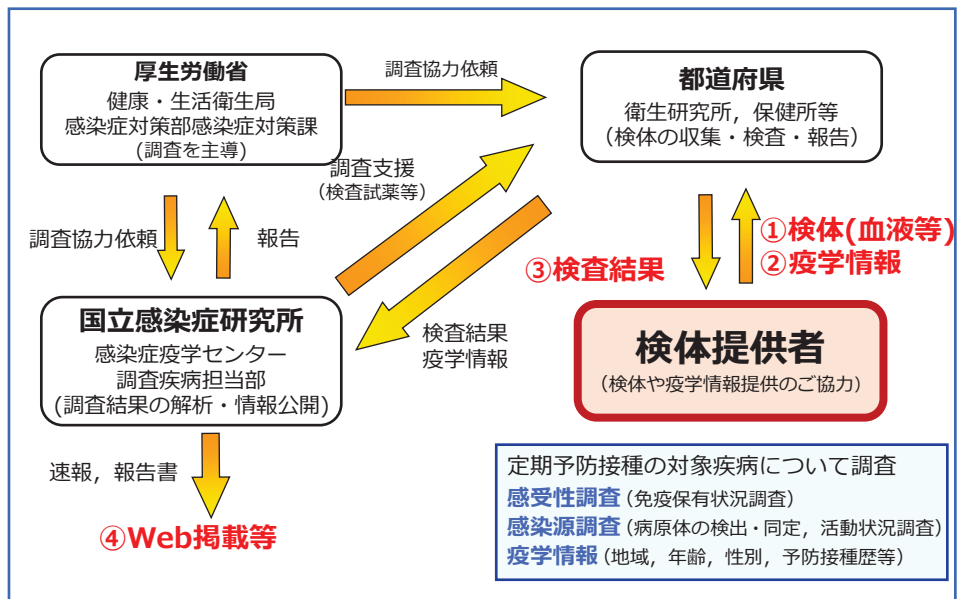
感染症流行予測調査事業では、定期/臨時予防接種の対象疾病（ポリオ、インフルエンザ、日本脳炎、風しん、麻しん、ヒトパピローマウイルス感染症、水痘、百日咳、ジフテリア、破傷風、インフルエンザ菌感染症、肺炎球菌感染症、ロタウイルス感染症、新型コロナウイルス感染症（2021年2月から追加））について、我が国の国民がこれらの病気に対する免疫をどれくらい保有しているか（集団免疫の現状把握：感受性調査）、どのような型の病原体が流行しているか（病原体の検索：感染源調査）などの調査を行い、これらの結果と他のいろいろな情報（地域、年齢、性別、予防接種歴など）を併せて検討して、予防接種が効果的に行われていることを確認し、さらに長期的な視野で病気の流行を予測することを目的としています。具体的には、風しんや麻しんに対する免疫を持っていない人の数の推計や持ってない人が多い年代の特定、予防接種スケジュールを決定するための参考資料など、日本の予防接種政策の基礎資料として有効に活用されています。

【実施機関について】

厚生労働省が主体となり、国立感染症研究所、都道府県並びに都道府県衛生研究所、保健所、医療機関等が協力して実施しています。調査には、それぞれの地域に住んでいる健康な方にこの調査の目的を説明して、同意が得られた場合に協力していただいています。なお、平成25年度（2013年度）からは予防接種法に基づく事業となっています。

【調査の概要について】

- 1) **感受性調査：集団免疫の現状把握**
同意が得られた方から血液を採取し(図内①)、対象となる病気に対する免疫の有無について調査します。
- 2) **感染源調査：病原体の検索**
対象となる病気の患者に加え、ブタあるいは環境から採取した材料を用いて、病原体の有無や種類について調査します。
- 3) **その他の情報**
地域、年齢、性別、予防接種歴等の情報(図内②) について上記の調査結果と併せて検討します。

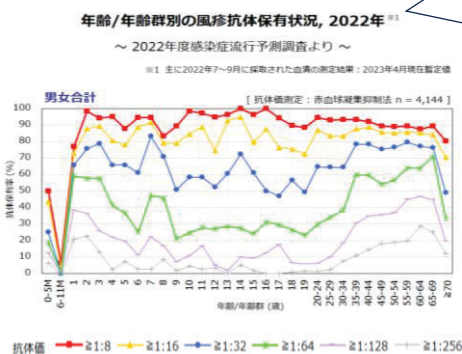


【調査結果について】

調査にご協力いただいた方は、各都道府県の担当者から調査を行った疾患に対する結果を受け取ることができます(図内③)。調査によっては、結果が出るまでに数か月かかる場合もありますのでご了承ください。全国の調査結果は、国立感染症研究所で地域、年齢、性別、予防接種歴など様々な角度から解析を行い、感染症流行予測調査報告書としてまとめています。報告書は、国立感染症研究所の感染症流行予測調査のページで公開(図内④)しています。また、インフルエンザの抗体保有状況や日本脳炎ウイルスの活動状況については速報としても公開しています。なお、公開している結果には、個人を特定できる情報は一切ありません。

調査結果は国立感染症研究所のホームページで公開しています。

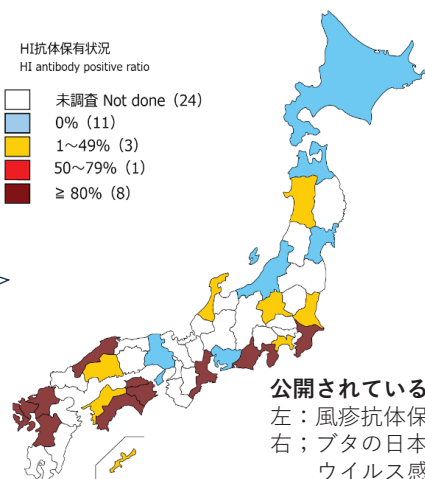
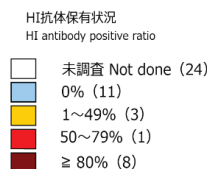
感染症流行予測調査 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/yosoku-index.html>)



年齢・年齢群別に抗体保有割合を確認し、社会全体の免疫の状況を見ています(図は男女合計の抜粋です)

色が濃いほど日本脳炎ウイルスに感染したブタの割合が多く、その地域でのウイルスの蔓延状況を確認できます

ブタの日本脳炎ウイルス感染状況, 2022年
Infection of swine with Japanese encephalitis virus, 2022



公開されている情報の例
左：風疹抗体保有状況
右：ブタの日本脳炎ウイルス感染状況速報

～感染症流行予測調査の結果はこのように活用されています～

感染症流行予測調査事業における 風しん抗体保有状況調査

感染症流行予測調査は定期的予防接種対象疾患(14疾患)を対象に実施されています。

本資料では、風しんに関する調査が風しんの流行及び先天性風疹症候群(CRS)を防ぐための対策の検討・評価に活用されている事例をご紹介します。
多くの皆様に調査へご参加いただくことでより信頼性の高い結果を得ることができます。

● 調査結果からわかること

感染症流行予測調査では、調査にご協力いただいた方々から提供された血清中の抗風しん抗体を測定、集計し、風しんウイルスに対する抗体を持っている人の割合を推定しています。

性別や年齢、地域等に分けて評価を行い、日本国内の抗体保有状況を毎年確認しています。

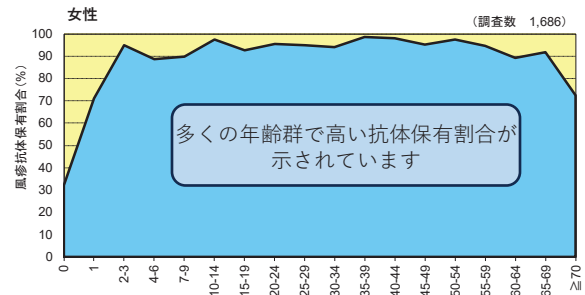
● 調査結果の活用

結果をまとめて評価を行い、予防接種スケジュールなどを含む予防接種政策の基礎資料として活用されています。

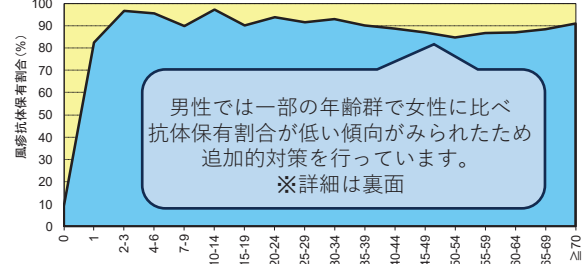
調査結果は他の疾患とともに国立感染症研究所ホームページにて毎年公表されています。
(結果の詳細は裏面①よりWEBページをご覧ください)

裏面に具体例を載せています

2022年度 風疹抗体保有状況 (HI抗体価 \geq 1:8)



2022年度調査実施県 (調査数 2,458)



■ 風しんの抗体を持っていない人 ■ 風しんの抗体を持っている人
2022年度調査実施県
北海道、茨城、栃木、群馬、千葉、東京、神奈川、新潟、石川、長野、愛知、三重、滋賀、山口、高知、福岡

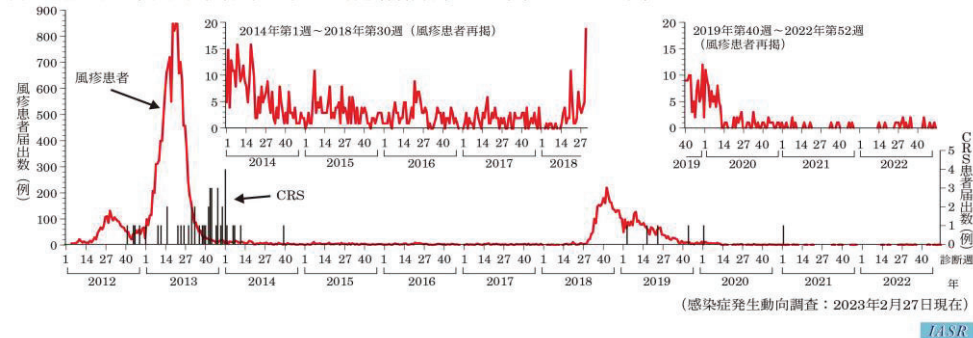
【風しんと先天性風疹症候群 (CRS) について】

風しんは風しんウイルスの感染により起こる急性熱性発疹症です。約15～30%は不顕性感染で終わり、発症しても症状は比較的軽く予後は一般的に良好ですが、血小板減少性紫斑病や脳炎等の合併症が発生することもあり軽視できない疾患です。

特に妊娠初期の妊婦が感染すると胎児に感染し、出生児が難聴、先天性心疾患、白内障、精神運動発達遅滞等の先天性風しん症候群 (CRS) を発症する可能性があります。感染の時期によって、妊娠1か月の場合50%、2か月で35%、3か月で18%、4か月で8%が発症するとされています。

風しんはワクチンで予防可能な疾患です。十分な抗体を持っていない場合にはワクチン接種による予防が望まれます。妊娠中は生ワクチンである風しんワクチンの接種ができません。風しんの流行を防ぐためワクチン接種によりそれぞれの方を守りながら、社会全体で高い抗体保有割合を維持する必要があります。感染症流行予測調査では、成人男性において抗体保有割合の低い年齢層が確認されたため、対策が進められています。

図1. 風疹・先天性風疹症候群 (CRS) の週別患者届出数, 2012年第1週～2022年第52週



2012年～2013年と2018年～2019年に全国的な流行が起こり、それに伴いそれぞれ45名、6名のお子さんがCRSと診断されたことが報告されています。



【風しん抗体保有状況調査結果の活用例】

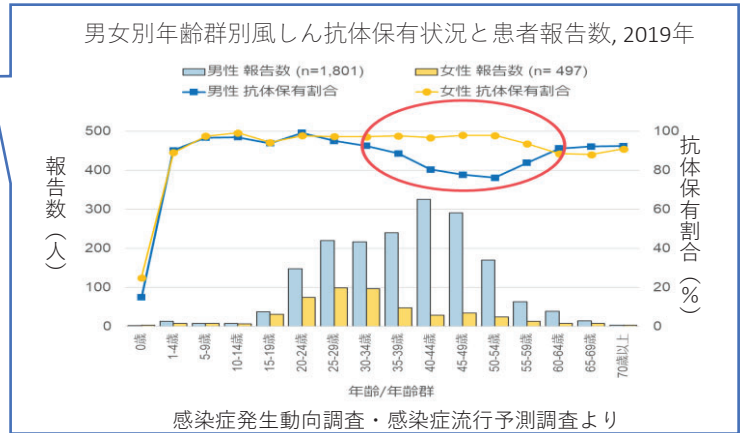
近年の風しんの流行(2018年～2019年)では感染症流行予測調査・感染症発生動向調査により成人男性への対策の必要性が示唆され、風しんの追加的対策(第5期定期接種)が実施されています。

感染症流行予測調査は引き続き風しんの抗体保有状況の評価に活用されています。

風しん患者報告数と抗体保有割合の評価

2019年の風しん流行時の風しん患者報告数は、30代から50代において、女性に比べて男性が多く報告されました(右上図棒グラフ)。

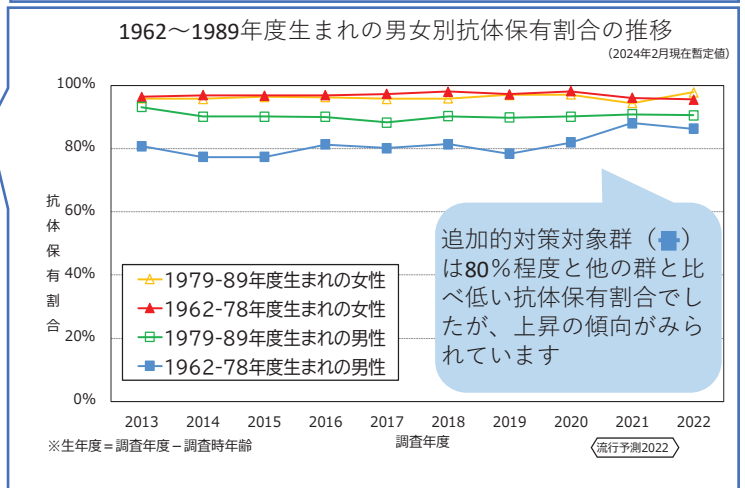
感染症流行予測調査の結果から、風しんの追加的対策の対象者を含むこの世代の男性が同世代の女性や他の世代と比較して抗体保有割合が低いことが確認されました(右上図の丸で囲んだ部分)。風しんの追加的対策では、対象者集団の抗体保有割合を90%に引き上げることを目標としています。



追加的対策対象者の抗体保有状況の評価

感染症流行予測調査は長年にわたり継続して行われており、得られた結果をもとに右下図のように抗体保有状況の推移を確認することに引き続き活用されています。

追加的対策開始後、2020年度以降に対象世代の抗体保有割合の上昇の傾向がみられています。今後も経年的な変化を注視していく必要があります。



風しんの追加的対策(第5期定期接種)とは(詳しくは右下②をご覧ください)

上記の検討を踏まえて過去に風しん含有ワクチンの公的接種機会がなかった世代の男性を対象に、2019年から追加的対策が実施されています。

風しんの追加的対策の概要

〈対象〉

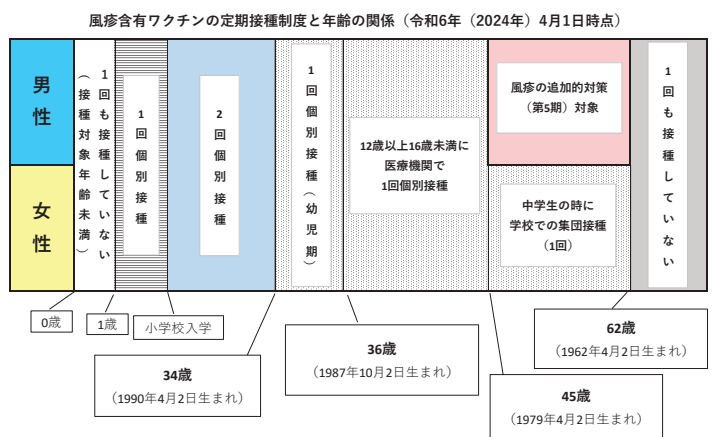
1962年4月2日～1979年4月1日生まれの男性
(2024年度に46～62歳になる)

〈実施期間〉

2024年度末まで

〈接種方法〉

自治体から配布されたクーポン券を利用して医療機関等にて風しんの抗体検査を受け、十分な量の抗体がなかった場合にMRワクチン(麻しん・風しん混合ワクチン)を原則無料で接種可能



【風しんの追加的対策対象者の皆様へ】

国の追加的対策の枠組みで原則無料で抗体検査と、必要の場合にワクチン接種が受けられる機会は、2024年度末までの予定となっています。追加的対策の対象の方におかれましてはぜひこの機会に抗体検査・予防接種をご検討ください。

① 感染症流行予測調査結果

(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/yosoku-index.html>)



② 風しんの追加的対策

厚生労働省HP

(https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kekaku-kansenshou/rubella/index_00001.html)

(参考資料3)

『国内血清銀行』への血清の保管のお願い

1. はじめに

国内血清銀行（国内血清バンク）は、日本に住んでいる健康な方から頂いた血清とその情報の一部（採血年月、年齢、性別及び採取都道府県名）を保管・管理し、様々な研究や調査に活用することにより、我が国における感染症対策、予防接種政策などに役立てることを目的として運営されています。

2. 血清の保管・管理について

供与いただいた血液のうち、血餅は廃棄され、血清のみが保管されます。

血清は長期間保存できるよう、適切な条件（超低温管理）で凍結保存されています。なお、血清は、個人が特定できるような情報（お名前、御住所など）は全て除いた上で保管・管理されているため、血清から個人を特定することはできません。

3. 保管血清の利用について

将来、新たに見つかった病原体あるいは測定方法が開発された疾患等に対する抗体測定、公衆衛生上重要な疾患の免疫保有状況の調査等に利用させていただきます。研究に用いられた際、結果の公表にあたっては、個人が特定されない形で公表されます。なお、保管血清の利用により得られた結果については、個人（血清の提供者）を特定することができないことから、個々に結果をお返しすることができませんことを御了承ください。

4. その他

『国内血清銀行』への血清提供についての判断は自由意思に基づくもので、その判断は撤回することができます。なお、『国内血清銀行』において提供された血清は、個人が特定できる情報を全て除いた上で保管・管理されるため、撤回ができる期間は、個別の情報が保持されている自治体から国立感染症研究所へ血液を送付するまでの間（例：〇月頃）です。また、協力の意思を途中で撤回しても、何ら不利益を受けることはありません。

国内血清銀行の情報については、現在、国立感染症研究所のホームページ上に掲載し、情報公開する準備を進めております。公開されるまでにご質問がありましたら、以下の問い合わせ先にご連絡ください。

(裏面へ)

問い合わせ先

◎国立感染症研究所感染症疫学センター
〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
国内血清銀行事務局
TEL 03-5285-1111 (代) (内線 2059、2533)

以上のことをご理解いただき、国内血清銀行への血清の保管に御承諾いただけましたら、別紙に御署名をお願いいたします。

(申請者用)

『国内血清銀行』への血清提供に関する同意書

国立感染症研究所長 殿

〇〇県衛生研究所長 殿

私は血清を『国内血清銀行』へ提供することについて、口頭及び文書を用いて説明を受け、以下の項目についてその内容を十分に理解しました。

- 1 『国内血清銀行』に提供する血清が、供与者の年齢、性別、採取都道府県名及び採取年月が付随した状態でフリーザー内に保管され、感染症対策、予防接種政策などに役立てるための研究に利用されること。
- 2 供与者の年齢、性別、採取都道府県名及び採取年月のデータは、国及び都道府県の規定により適切に管理されること。
- 3 研究に用いられた際、結果の公表にあたっては、個人が特定されない形で公表されること。
- 4 この同意書で表明した『国内血清銀行』への血清提供についての判断は自由意思に基づくものであり、その判断は撤回することができること。また、『国内血清銀行』において提供された血清は、個人が特定できる情報を全て除いた上で保管・管理されるため、撤回ができる期間は、個別の情報が保持されている自治体から国立感染症研究所へ血液を送付するまでの間（例：〇月頃）であること。
- 5 『国内血清銀行』への協力の意思を途中で撤回しても、何ら不利益を受けることはないこと。

その上で、『国内血清銀行』に血清を提供することに、

- a. 同意します。
- b. 同意しません。（a、bいずれかを選択していただき、○で囲んでください）

令和 年 月 日

自筆署名

保護者署名（未成年者の場合）

説明者署名又は記名押印

(採血番号貼付欄)

(献血者用)

『国内血清銀行』への血清提供に関する同意書

国立感染症研究所長 殿

〇〇県衛生研究所長 殿

私は血清を『国内血清銀行』へ提供することについて、口頭及び文書を用いて説明を受け、以下の項目についてその内容を十分に理解しました。

- 1 『国内血清銀行』に提供する血清が、供与者の年齢、性別、採取都道府県名及び採取年月が付随した状態でフリーザー内に保管され、感染症対策、予防接種政策などに役立てるための研究に利用されること。
- 2 供与者の年齢、性別、採取都道府県名及び採取年月のデータは、国及び都道府県の規定により適切に管理されること。
- 3 研究に用いられた際、結果の公表にあたっては、個人が特定されない形で公表されること。
- 4 この同意書で表明した『国内血清銀行』への血清提供についての判断は自由意思に基づくものであり、その判断は撤回することができること。また、『国内血清銀行』において提供された血清は、個人が特定できる情報を全て除いた上で保管・管理されるため、撤回ができる期間は、個別の情報が保持されている自治体から国立感染症研究所へ血液を送付するまでの間（例：〇月頃）であること。
- 5 『国内血清銀行』への協力の意思を途中で撤回しても、何ら不利益を受けることはないこと。

その上で、『国内血清銀行』に血清を提供することに、

- a. 同意します。
- b. 同意しません。（a、bいずれかを選択していただき、○で囲んでください）

令和 年 月 日

自筆署名

保護者署名（未成年者の場合）

説明者署名又は記名押印

予防接種歴・罹患歴調査票

居住地	都 道 市区 府 県 町村	記載日 (採血日)	2024 (令和6) 年 月 日
年齢	歳 か月	性別	男・女
		母子健康手帳等による 接種歴・罹患歴の確認	あり・なし

予防接種歴 ページ1/2 (これまでに受けたワクチンの種類や回数など)				
ワクチン	接種の有無 (いずれかに○)	ワクチン製造所 (いずれかに○)	接種回数 (いずれかに○)	最後に接種した年月 (わかる範囲で)
5種混合：DPT-IPV-Hib (百日せき・ジフテリア・破傷風・ポリオ・インフルエンザ菌) ※2024年4月から国内開始	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
4種混合：DPT-IPV (百日せき・ジフテリア・破傷風・ポリオ) ※通常、1歳半までに計4回	受けた / 受けていない / 不明	阪大微研	不明 / わかる (回)	年 月
		KMバイオロジクス (化血研)	不明 / わかる (回)	年 月
		第一三共 (北里第一三共)	不明 / わかる (回)	年 月
製造所までは不明	不明 / わかる (回)	年 月		
3種混合：DPT (百日せき・ジフテリア・破傷風) ※通常1歳半までに計4回	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
2種混合：DT (ジフテリア・破傷風) ※通常、11歳に接種	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
DP (百日せき+ジフテリア) ※現在、使われていません。	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
破傷風	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
ジフテリア	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
百日せき	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
ポリオ 経口生ワクチン (OPV) ※現在、国内使用なし	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
ポリオ 不活化ワクチン (IPV)	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
MR (麻しん・風しん) ※通常、1歳と5歳~7歳未満の2回	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
麻しん (はしか)	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
風しん	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
MMR (麻しん・おたふくかぜ・風しん) ※現在、国内使用なし	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
日本脳炎	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
Hib (インフルエンザ菌b型) ※冬期の季節性インフルエンザとは異なります。	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
肺炎球菌 7価 ※現在、使われていません。	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
肺炎球菌 13価	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
肺炎球菌 15価 ※2023年4月10日から国内開始	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
肺炎球菌 23価	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月

※↑特に記入漏れが多く見られます。

※↑特に記入漏れが多く見られます。

裏面につづく→

予防接種歴 ページ2/2 (これまでに受けたワクチンの種類や回数など)

ワクチン	接種の有無 (いずれかに○)	ワクチン製造所 (いずれかに○)	接種回数 (いずれかに○)	最後に接種した年月 (わかる範囲で)
HPV 2価 (ヒトパピローマウイルス) ※女性のみ接種可	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
HPV 4価 ※女性、男性どちらも接種可	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
HPV 9価 ※女性のみ接種可	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
水痘 (水ぼうそう)	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
B型肝炎	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
ロタウイルス 1価	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
ロタウイルス 5価	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
おたふくかぜ	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
髄膜炎菌	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
带状疱疹 生ワクチン ※50歳以上の方が接種可能	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
带状疱疹 不活化ワクチン ※50歳以上の方が接種可能	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
インフルエンザ (2023/24シーズン) ※2023年10月から採血日	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 / わかる (回)	年 月
新型コロナウイルス感染症	受けた / 受けていない / 不明	—	不明 わかる場合は下記に回答 (2回以下/3回以上 (回))	年 月

※↑特に記入漏れが多く見られます。

※↑特に記入漏れが多く見られます。

罹患歴 (これまでにかった感染症の種類や時期など)

疾患名	罹患の有無 (いずれかに○)	かかった年月 (わかる範囲で)	疾患名	罹患の有無 (いずれかに○)	かかった年月 (わかる範囲で)
百日せき	有り/無し/不明	年 月	ヒトパピローマウイルス感染症	有り/無し/不明	年 月
ジフテリア	有り/無し/不明	年 月	水痘 (水ぼうそう)	有り/無し/不明	年 月
破傷風	有り/無し/不明	年 月	B型肝炎	有り/無し/不明	年 月
ポリオ	有り/無し/不明	年 月	ロタウイルス感染症	有り/無し/不明	年 月
麻疹 (はしか)	有り/無し/不明	年 月	おたふくかぜ	有り/無し/不明	年 月
風しん	有り/無し/不明	年 月	髄膜炎菌感染症	有り/無し/不明	年 月
日本脳炎	有り/無し/不明	年 月	A型インフルエンザ ※2022年10月から採血日	有り/無し/不明	年 月
インフルエンザ菌感染症	有り/無し/不明	年 月	B型インフルエンザ ※2022年10月から採血日	有り/無し/不明	年 月
肺炎球菌感染症	有り/無し/不明	年 月	インフルエンザ (型不明) ※2022年10月から採血日	有り/無し/不明	年 月
疾患名	罹患の有無 (いずれかに○)	罹患の回数		最後にかった年月 (わかる範囲で)	
带状疱疹	有り/無し/不明	不明 / わかる (回)		年 月	
新型コロナウイルス感染症	有り/無し/不明	不明 / わかる (回)		年 月	

ご協力ありがとうございました。

環境水によるポリオウイルスの調査を実施しています

1. 環境水サーベイランスとは

下水や河川等、環境水からウイルス等を検出し、監視するものです。ここでは下水処理場に流入してくる下水(流入下水)を定期的に取り、ウイルス検査を行う調査とします。

2. 環境水サーベイランスで分かること

通常の病原体サーベイランス(感染症発生動向調査事業)は患者を対象とした監視活動です。

環境水サーベイランスでは、糞便中に含まれるウイルス等が下水道から処理場に集積することを利用して、地域全体で流行しているウイルス等を監視します。このため不顕性感染者(感染しても発症しない感染者)から糞便中に排出している病原体も捕捉可能です。また、比較的長期間検出(1-3カ月間)できる、とされています。

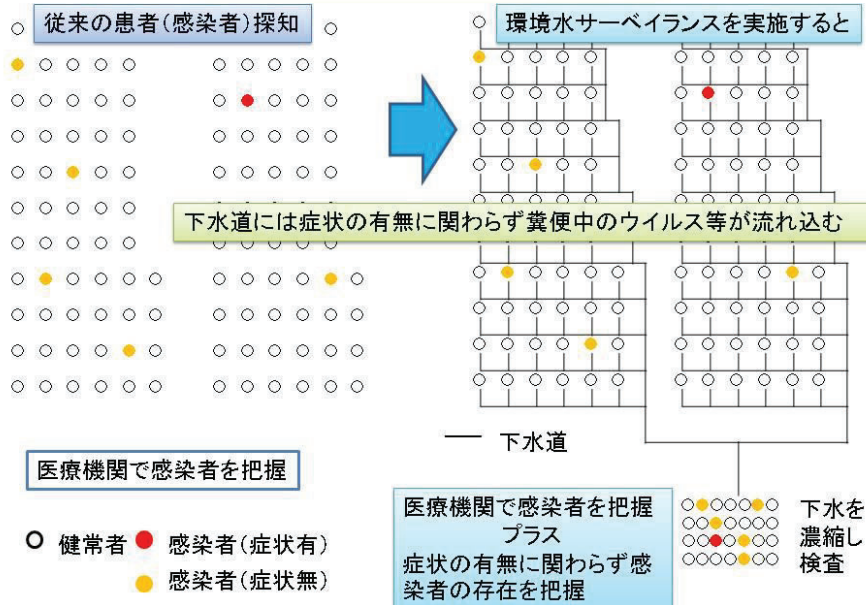
ポリオについて

ポリオは、ポリオウイルスが、口から入り、腸の中で増えることで感染します。そしてポリオウイルスは便の中に排泄されます。多くの場合、病気としての明らかな症状は現れずに、知らない間に免疫ができます(不顕性感染)。しかし、腸管に入ったポリオウイルスが脊髄の一部に入り込み、主に手や足に麻痺が現れ、その麻痺が一生涯残ってしまうことがあります。ポリオワクチンにより予防可能な疾患です。

環境サーベイランス

一般的には大気、水等環境中の化学物質、放射能、微生物などの監視を意味します。

下水網を活用した糞便中のウイルス等の捕捉



3. 環境水サーベイランスの長所と短所

下水を適切な手法で濃縮し、検査を行います。このため比較的大きな人口(数万から数十万人)で流行しているウイルス等(糞便中に排泄されるもの)の状況が把握できます。

ただし下水処理場が設置されている地域内のみ情報であり、検出困難なウイルス等があります。

なお、下水から検出されても感染源を特定することは困難です。従来の病原体サーベイランスを補完する役割であることに留意ください。

4. ポリオウイルスを対象とした環境水サーベイランスの意義

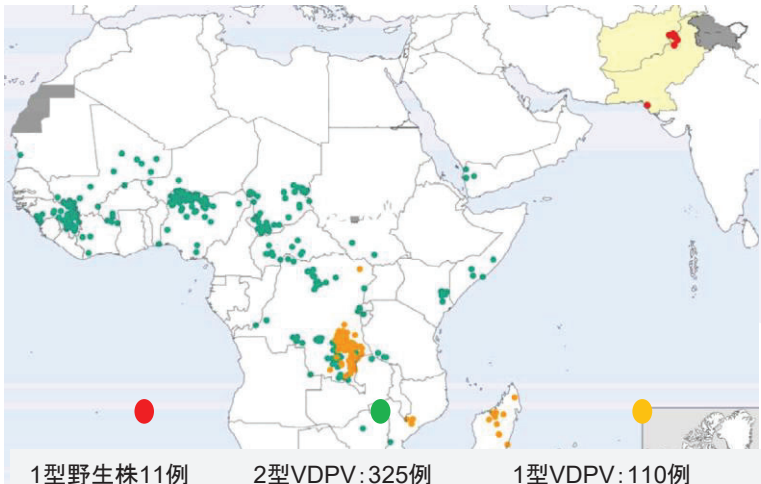
ポリオウイルス感染後、ウイルスは糞便中に排出されます。しかし、その多くは不顕性感染であるため、ウイルス保有者の検知は困難です。世界では、いまだ野生型(左下図)、そしてワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)感染による患者が報告されています。

世界保健機関(WHO)ポリオ根絶計画の中で患者サーベイランスの補完的な役割として、ポリオ流行地/リスク地域で環境水サーベイランスが導入されています(パキスタン、ナイジェリア、インドなど)。

また国際的なポリオ伝播を調べるために、不活化ポリオワクチン(IPV)使用国でも実施されています(英国、オランダ、フランス、フィンランド、米国など)。

5. なぜ環境水サーベイランスを始めたのか

わが国では2012年9月に不活化ポリオワクチンが導入されました。今後、輸入を通じて侵入してくることが予想されるポリオウイルス(ワクチン株、VDPV/野生株)を効率よく捕捉し、その後の対策を検討するためです。



2024. 2. 24 現在 過去12か月間に報告された野性株ポリオとワクチン由来ポリオウイルス(VDPV: ワクチン株から変異したもの) 検出地域 (出典:世界保健機関HPより)

感染症流行予測調査事業による ポリオウイルス環境水サーベイランスの概要

地方衛生研究所で行う環境水サーベイランスの検査の流れ

定点となる下水処理場（人口約10-30万人、下水道普及率約7-8割をめやす）を定め、毎月1回流入下水（環境水：0.5L強）を採取します。この環境水を濃縮後、ポリオウイルス分離/同定を行います（参考資料）。

調査は可能な限り通年の実施を想定しています。

環境水からポリオウイルスが分離/検出された場合、自治体/地方衛生研究所から厚生労働省/国立感染症研究所に連絡するとともに、速やかに検体を国立感染症研究所に送付し、ポリオウイルスの遺伝子解析を実施します。

ポリオウイルスが検出された時の対応について

環境水サーベイランスで検出されるポリオウイルスとは？

環境水サーベイランスで検出されるポリオウイルスは以下の2つに大別されます。

- (ア) 1型及び3型ワクチン株のポリオウイルス
- (イ) 2型ワクチン株、野生株又はワクチン由来ポリオウイルス株（VDPV：ワクチン株から変異したもの）

ポリオウイルス遺伝子解析の結果に基づいた以下の対応をします。

- (ア) 1型及び3型ワクチン株のポリオウイルスが同定された場合
関係機関（検出された自治体、厚労省）で同定結果を共有し対応を終了します。
- (イ) 2型ワクチン株、野生株又はワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）が同定された場合
環境水サーベイランスの強化を実施します。

環境水サーベイランスの強化

(1) 強化の方法

以下の（ア）あるいは（イ）、ないしは（ア）（イ）の両方を実施します。

- (ア) 採水回数を増やす（1回/月→1回/週）
- (イ) 採水場所を増やす（1箇所→近隣の数カ所）

(2) 強化の期間

4週間を目途とします。

強化した環境水サーベイランスの結果を踏まえた対応について

(1) 環境水サーベイランスの結果、下記の

- (ア)～(ウ)のいずれも判明しなかった場合
 - (ア) 数週の間隔をおいて複数回ウイルスを検出
 - (イ) 複数地点でウイルスを検出
 - (ウ) 異なる遺伝子配列のウイルス株を検出
→ 平時のサーベイランスに戻します。

(2) 環境水サーベイランスを強化した結果、上記の

- (ア)～(ウ)のいずれかが判明した場合
都道府県は、患者が地域に存在し、他の患者が発生することを想定し、医療機関等に対し、急性弛緩性麻痺患者のポリオウイルス感染を疑うように周知するとともに、検出された場合には直ちに二類感染症として届出を行うよう周知に努めるなど、地域において、患者サーベイランスを強化します。

VDPV/野生株検出時、環境水サーベイランス強化による対応

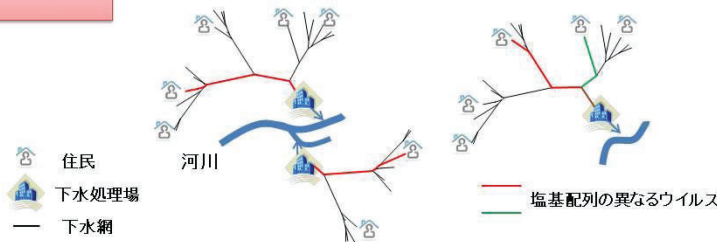
採水頻度を増やす(例:月1回→週1回)

別の下水処理場でも採水/検査

(ア)数週にわたり複数回検出される場合

(イ)複数の下水処理場でもウイルス検出

(ウ)異なる遺伝子配列のウイルス株を検出

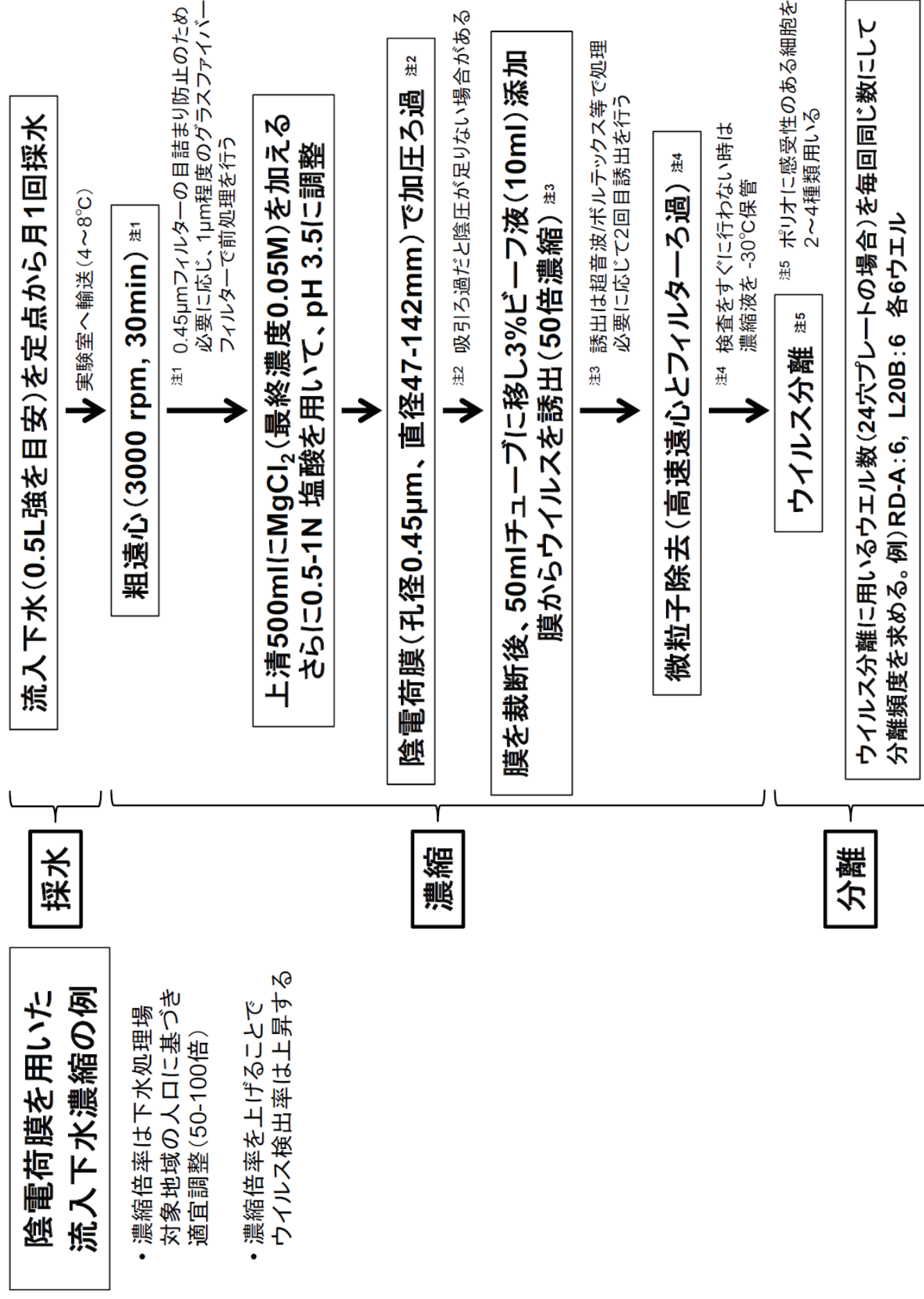


2か所以上の下水処理場にてウイルスが検出された場合

複数の遺伝子配列を持つウイルスが検出された場合

(ア)-(ウ)いずれも判明しなければ通常のサーベイランスに戻す

いずれかが判明した場合は、ポリオ患者が発生したことを想定した対応



(参考資料 8)

環境サーベイランスでポリオウイルスが検出された場合の対応について

1. 環境サーベイランスで検出されるポリオウイルスとは

環境サーベイランスで検出されるポリオウイルスは以下の2つに大別される。

- (ア) 1型及び3型ワクチン株のポリオウイルス
- (イ) 2型ワクチン株、野生株又はワクチン由来ポリオウイルス株 (VDPV: ワクチン株から変異したもの)

2. 環境水から検出されたポリオウイルスの解析と解析結果に応じた対応

(1) 検出されたウイルスの解析

環境水からポリオウイルスが分離/検出された場合、自治体から厚生労働省及び国立感染症研究所感染症疫学センターに連絡すると共に、速やかに検体を国立感染症研究所ウイルス第二部第二室に送付し、ポリオウイルスの遺伝子解析を実施する。

(2) 解析結果に応じた対応

解析結果に応じて以下の対応を行う。

- (ア) 1型及び3型ワクチン株のポリオウイルスが同定された場合
関係機関 (検出された自治体、厚生労働省、感染研) で同定結果を共有し対応を終了
- (イ) 2型ワクチン株、野生株又はワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) が同定された場合
環境水サーベイランスの強化 (下記3.) を実施

3. ウイルス解析結果を踏まえた環境水サーベイランスの強化

2型ワクチン株、野生株又はワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) が同定された場合は、以下の環境水サーベイランスの強化を行う。

(1) 強化の方法

以下の (ア) あるいは (イ)、ないしは (ア) (イ) の両方を実施

- (ア) 採水回数を増やす (1回/月 → 1回/週)
- (イ) 採水場所を増やす (1箇所 → 近隣の数カ所)

(2) 強化の期間

4週間を目途

4. 強化した環境水サーベイランスの結果を踏まえた対応

(1) 環境水サーベイランスの結果、下記の (ア) ~ (ウ) のいずれも判明しなかった場合

- (ア) 複数地点でウイルスを検出
 - (イ) 数週の間隔をおいて複数回ウイルスを検出
 - (ウ) 異なる遺伝子配列のウイルス株を検出
- 平時のサーベイランスに戻す。

(2) 環境サーベイランスを強化した結果、上記の (ア) ~ (ウ) のいずれかが判明した場合

都道府県は、患者が地域に存在し、他の患者が発生することを想定し、医療機関等に対し、急性弛緩性麻痺患者のポリオウイルス感染を疑うように周知するとともに、検出された場合には直ちに二類感染症として届出を行うよう周知に努めるなど、地域において、患者サーベイランスを強化する。なお、平成30年5月から急性弛緩性麻痺 (急性灰白髄炎を除く) は5類感染症全数把握疾患に指定されており、診断した医師は全例管轄の保健所に届け出ることが義務づけられている。

<参考：Q&A>

Q:検出時の自治体から厚生労働省及び感染研への連絡はフォーマットがあるか。

A:指定していない。(任意様式)

Q:地方衛生研究所にて1型及び3型ワクチン株以外と同定された場合の送付はどうするのか。

A:ポリオウイルスが分離同定された場合、速やかに厚生労働省健康・生活衛生局感染症対策部感染症対策課及び感染研感染症疫学センターに連絡する。また、検体(分離株)は確定診断のため速やかに国立感染症研究所ウイルス第二部第二室へ送付されたい。

Q:検出情報を他自治体と共有する際は感染症サーベイランスシステムを利用するのか。

A:IASR への投稿等での共有を想定している。

Q:野生株等の検出時に、環境水サーベイランスを強化する根拠は？

A:二類感染症の患者発生の疑いがある状態のため、感染症法第15条による積極的疫学調査として実施されたい。

Q:野生株等の検出時に、採水場所を増やすことは下水道課との協議が必要だが、必須なのか。

A:採水場所を増やす、採水回数を増やす、ないしはそのいずれも実施するか、状況に応じて対応可能。
採水回数を増やすだけでも良い。

Q:環境サーベイランス強化によって野生株等が疑われる場合の患者サーベイランスの強化とはどういう意味か。

A:医療機関等と情報共有を行い、周知するもの。その際、無菌性髄膜炎や急性弛緩性麻痺などの患者の便検査を徹底する。

参考資料 9

環境水濃縮物接種後の CPE、ウイルス分離株数のカウント及び鑑別（システム入力）について

【基本的な考え方】

- 下水濃縮物には各種ウイルス（量比は不明）を含んでおり、ポリオウイルスの分離を第一義的に考えることが重要である。
- 本調査では下水濃縮物に様々な腸管系ウイルスが含まれること、ポリオウイルスに感受性のある培養細胞を用いることで、CPE が出現した細胞培養上清を、ポリオウイルスに特異的な L20B 細胞(マウス L 細胞にポリオウイルスレセプターを発現した細胞)に再接種することで、効率良くポリオウイルスの分離同定を行うものである。
- このように CPE 因子にはポリオウイルス以外のウイルスも含まれているが、量比が不明のため、正確に単離するためには時間、労力、コストを要する。
- 国内ではすでにポリオの流行が見られないことから、検査プロセスで同時に得られるエンテロウイルス、アデノウイルス検出は、環境水調査フローの妥当性を簡便に評価する指標として有用である。
- このため調査では、下水濃縮物を培養細胞に接種後、出現した CPE からポリオウイルスを分離同定、ポリオウイルス以外の培養細胞に感受性のあるエンテロウイルス、アデノウイルスなども極力分離同定を行い、その検出頻度も求めることができるように計画されている。
- ポリオウイルス以外の報告は感染源調査の主目的ではないため、CPE に含まれる各種ウイルスの分離同定をおこなわず、非ポリオエンテロウイルス (NPEV) として報告することも可能である。

【CPE とウイルス分離、同定について】

- 陰電荷膜法による流入下水の濃縮では、最後の濃縮液誘出を 2 段階に分けている。
- 1 回目誘出物、2 回目誘出物をそれぞれ異なる細胞種、複数のウェルに接種することで、様々なエンテロウイルスを分離する可能性を高めている。
- 1 回目誘出物を 4 分割、2 回目誘出物を 2 分割して、それぞれを接種する場合、濃縮物の検体数は 6 とする（次ページ表）。
- 6 検体それぞれをさらに分割して、例えば 3 種類の細胞に接種したとしても、検体数は 6 のままで、18 とはしない。
- 分離株数は、CPE の出たウェルの数をそのまま使用する。1 検体を 3 細胞に接種し、2 つ CPE が出たら分離株は 2（検出頻度の情報が蓄積できる）。

（流入下水濃縮法、使用する細胞の種類（ポリオ感受性の L20B は必須）、濃縮物検体数（6 以上）の選択は各地方衛生研究所によるので、上記の説明は適宜読み替える。）

- 各ウェルの CPE は培養細胞で選択的に増殖した代表的なウイルスを示すことになる。
- NPEV の場合、厳密なウイルス単離を行っていないことに留意する。

例

48 ウェルの場合

CPE 出現例 (2-3 代継代後)

RD-A	1		2		3		4	
		5		6				
HEp-2	1		2		3		4	
		5		6				
L20B	1		2		3		4	
		5		6				

数字は検体番号

RD-A	+		-		-		+	
		-		-				
HEp-2	-		-		-		+	
		-		-				
L20B	-		-		-		-	
		-		-				

回収した上清を L20B に再接種し、L20B でポリオ陰性が確認された場合

検体番号	1 回目誘出物				2 回目誘出物	
	#1	#2	#3	#4	#5	#6
RD-A	+	-	-	+	-	-
HEp-2	-	-	-	+	-	-
L20B	-	-	-	-	-	-
非ポリオウイルス分離株数	1	0	0	2	0	0
非ポリオウイルス検体数	1	0	0	1	0	0

【鑑別の注意点】

上記例では検体番号#4 の RD-A 分離株と HEp-2 分離株は異なるものとしてそれぞれを同定し、集計を行う。

同一の型であれば、その型が 2 株とカウント。

PCR 検出のみで同定を行わない場合は NPEV (あるいは AdV、MRV 等) NT が 2 株とする。

【システム入力について】

① 個別入力

感染症サーベイランスシステムへの入力を検体ごとに入力する場合は以下の手順のとおりである。

上記の例だと検体 # 1 から # 6 まで 6 枚のシートに入力する必要がある。

入力フォーム

感染症流行予測調査システム	
【感染源調査】検体データ登録	
ポリオ	
検体番号 (必須)	<input type="text"/> ※半角
下水処理場名 (必須)	<input type="text"/> ※採水
関連市町村名	<input type="text"/> ※下水
採水日 (必須)	年 <input type="text"/> 月 <input type="text"/> 日
検査日	年 <input type="text"/> 月 <input type="text"/> 日
分離結果 (必須)	<input type="radio"/> + <input type="radio"/> - <input type="checkbox"/> ※『その他』を選択した場合は同じ番号の()ス名で『その他』を
1-ウイルス名	<input type="text"/> ※『その他』を選択した場合は同じ番号の()ス名で『その他』を に入力
1-ウイルス型	<input type="text"/> ※半角5字以内。型別不能の場合、または「ウイルス名」で『NPEV』や『不明』を選択した場合は「
1-ウイルス名 (その他)	<input type="text"/> ※半角20字以内。上の「ウイルス名」にある選択肢 (Polio、 ださい
1-ウイルス型 (その他)	<input type="text"/> ※半角5字以内。型別不能の場合は「NT」と入力
2-ウイルス名	<input type="text"/>
2-ウイルス型	<input type="text"/>
2-ウイルス名 (その他)	<input type="text"/>
2-ウイルス型 (その他)	<input type="text"/>
3-ウイルス名	<input type="text"/>
3-ウイルス型	<input type="text"/>
3-ウイルス名 (その他)	<input type="text"/>
3-ウイルス型 (その他)	<input type="text"/>
4-ウイルス名	<input type="text"/>

それぞれの自治体で決めた検体番号を入力
上記の例: #1~#6

検体からウイルス分離の可否

上記の例で # 1 の場合の入力例。RD-A からウイルス分離陽性、同定の結果 CB5 の場合

ポリオ	
検体番号(必須)	#1 <small>※半角数字</small>
下水処理場名(必須)	〇〇浄化センター <small>※採水地</small>
関連市町村名	<small>※下水処理場</small>
採水日(必須)	2022年7月1日
検査日	2022年7月10日
分離結果(必須)	<input checked="" type="radio"/> + <input type="radio"/> -
1-ウイルス名	CB <small>※【その他】を選択した場合は同じ番号の欄にウイルス名(その他)を入力</small>
1-ウイルス型	CB5 <small>※半角3文字以内、型別不能の場合は「NT」と入力</small>
1-ウイルス名(その他)	<small>※【その他】を選択した場合は同じ番号の欄にウイルス名(その他)を入力</small>
1-ウイルス型(その他)	<small>※半角3文字以内、型別不能の場合は「NT」と入力</small>
2-ウイルス名	<input type="text"/>
2-ウイルス型	<input type="text"/>
2-ウイルス名(その他)	<input type="text"/>
2-ウイルス型(その他)	<input type="text"/>
3-ウイルス名	<input type="text"/>
3-ウイルス型	<input type="text"/>
3-ウイルス名(その他)	<input type="text"/>
3-ウイルス型(その他)	<input type="text"/>
4-ウイルス名	<input type="text"/>
4-ウイルス型	<input type="text"/>
4-ウイルス名(その他)	<input type="text"/>
4-ウイルス型(その他)	<input type="text"/>
5-ウイルス名	<input type="text"/>
5-ウイルス型	<input type="text"/>
5-ウイルス名(その他)	<input type="text"/>
5-ウイルス型(その他)	<input type="text"/>

入力例
上記の例: #1の場合
RD-AからCB5が検出された場合

#1の検体からウイルスが分離されているので「+」

1ウイルス名のプルダウンから「CBを選択」

1ウイルス型の欄に「CB5を入力」

上記の例で #2 の入力例。ウイルス分離陰性の場合

ポリオ	
検体番号(必須)	#2 ※半角
下水処理場名(必須)	〇〇浄化センター ※採水
関連市町村名	※下水
採水日(必須)	2022年7月1日
検査日	2022年7月10日
分離結果(必須)	<input type="radio"/> + <input checked="" type="radio"/> -
1-ウイルス名	※『その他』を選択した場合は同じ番号の(そ
1-ウイルス型	※半角5字以内。型別不能の場合は、また
1-ウイルス名(その他)	※半角20字以内。上の「ウイルス名」にある選択肢(Polio, CA, CBなど)は入力しないでください
1-ウイルス型(その他)	※半角5字以内。型別不能の場合は「NT」と入力
2-ウイルス名	
2-ウイルス型	
2-ウイルス名(その他)	
2-ウイルス型(その他)	
3-ウイルス名	
3-ウイルス型	
3-ウイルス名(その他)	
3-ウイルス型(その他)	
4-ウイルス名	
4-ウイルス型	
4-ウイルス名(その他)	
4-ウイルス型(その他)	
5-ウイルス名	
5-ウイルス型	
5-ウイルス名(その他)	
5-ウイルス型(その他)	

入力例
上記の例: #2の場合
いずれの細胞からも検出されなかった場合

#2の検体からウイルスが分離されているので「-」

上記の例で #4 の入力例。RD-A と HEp-2 でウイルス分離陽性、RD-A から CB3、HEp-2 から AD1 が検出された場合

ポリオ	
検体番号(必須)	#4 ※半角数字20
下水処理場名(必須)	〇〇浄化センター ※採水
関連市町村名	※下水処理場
採水日(必須)	2022年7月1日
検査日	2022年7月10日
分離結果(必須)	<input checked="" type="radio"/> + <input type="radio"/> -
1-ウイルス名	CB ※『その他』を選択した場合は同じ番号の(そ
1-ウイルス型	CB3 ※半角5字以内。型別不能の場合は、また
1-ウイルス名(その他)	※半角5字以内。型別不能の場合は「NT」と入力
2-ウイルス名	AD
2-ウイルス型	AD1
2-ウイルス名(その他)	
2-ウイルス型(その他)	
3-ウイルス名	
3-ウイルス型	
3-ウイルス名(その他)	
3-ウイルス型(その他)	
4-ウイルス名	
4-ウイルス型	
4-ウイルス名(その他)	
4-ウイルス型(その他)	
5-ウイルス名	
5-ウイルス型	
5-ウイルス名(その他)	
5-ウイルス型(その他)	

入力例
上記の例: #4の場合
RD-AからCB3、HEp-2からAD1が検出された場合

#4の検体からウイルスが分離されているので「+」

1ウイルス名のプルダウンから「CBを選択」

1ウイルス型の欄に「CB3を入力」

2ウイルス名のプルダウンから「ADを選択」

1ウイルス型の欄に「AD1を入力」

② 一括入力

(1) 登録の「一括 CSV 取り込み」を選択する。

感染症流行予測調査システム

【感染症調査】 地方衛生研究所メニュー

登 録	検体データ登録	一括CSV取り込み
増 集	検体データ編集	
検 索	検体データ検索	
集 計	検体データ集計	
マスタデータ参照	マスタデータ参照	

TOPメニューへ戻る

(2) 年度を入力し、「表示」を選択する。

感染症流行予測調査システム

【感染症調査】 一括CSV取り込み

年度 (西暦) 表示

メニューへ戻る

(3) 取込用雛形ファイルダウンロードから「ポリオ」を選択し、ファイルをダウンロードする。

感染症流行予測調査システム

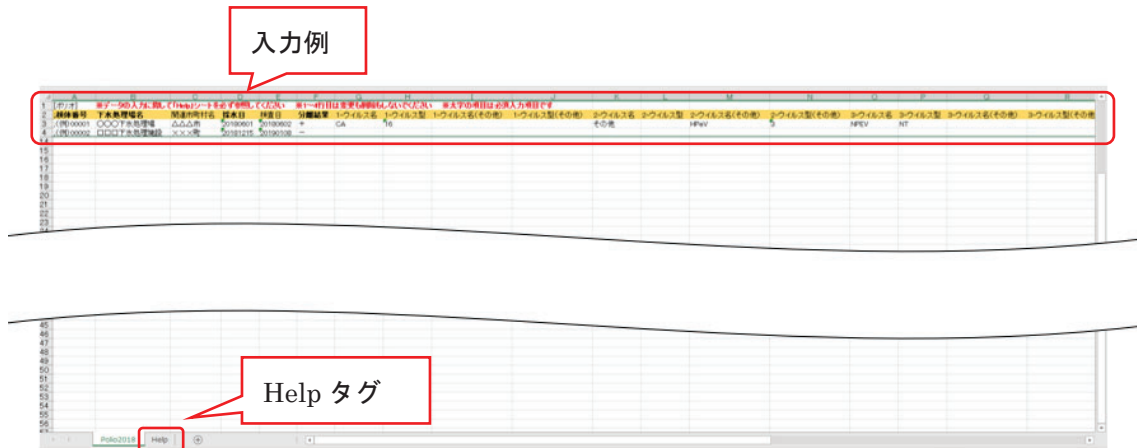
【感染症調査】 一括CSV取り込み

年度 (西暦) 2022 表示

登録する項目	登録期間	[取込用雛形ファイルダウンロード]
<input type="radio"/> ポリオ	2022年5月20日～2023年6月30日	ポリオ
<input type="radio"/> インフルエンザ	2022年5月20日～2023年6月30日	インフルエンザ
<input type="radio"/> 日本脳炎	2022年5月20日～2023年6月30日	日本脳炎
<input type="radio"/> インフルエンザ菌感染症	2022年5月20日～2023年6月30日	インフルエンザ菌感染症
<input type="radio"/> 肺炎球菌感染症	2022年5月20日～2023年6月30日	肺炎球菌感染症
<input type="radio"/> ロタウイルス感染症	2022年5月20日～2023年6月30日	ロタウイルス感染症

CSVファイル ファイルが選択されていません

- (4) 調査結果は、入力例と Help タグに従ってダウンロードした Excel ファイルに入力し、CSV ファイルとして保存する。



- (5) 「登録する項目」のポリオを選択する。
 (6) 「ファイルの選択」を選択して作成した CSV ファイルをアップロードする。
 (7) 「確認」を選択してデータの取り込みを行う。



参考資料 10 ブタからのインフルエンザウイルス分離のための検体の採取

1. ブタからのウイルス分離には、と畜場において採取されたブタの鼻腔ぬぐい液あるいは気管ぬぐい液を用いる。
2. 用意するもの及び手技の実際は下記のとおりである。

(参考文献: WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5-WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance.

https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/68026/WHO_CDS_CSR_NCS_2002.5.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

(1) 輸送用培地

スクリーキャップ付きのチューブ(中短試)に1~2 mL の下記輸送培地を入れる。使用前の輸送培地は、4℃で保存する(無菌的に作成し、1~2カ月以内に使用すること。×10MEM は、開封後数週間で結晶化した固形物が沈殿することがあるため、開封後は滅菌水で2倍量に希釈して×5 濃度で保管することを推奨する)。

試薬	最終濃度
x10MEM	x1
Penicillin/Streptomycin(10000unit/ml)	1000units/ml Pn 1000µg/ml St
アンフォテリシン B(250µg/ml)	25µg/ml
Albumin Solution 35% in DPBS(BSA)	0.50%
NaHCO ₃ (7.5%(W/V))	8800mg/l
HEPES Buffer Solution (1M)	0.01M
Distilled Water, Deionized, Sterile	

(2) 検体の採取法(検体の採取は、2)又は3)いずれか実施しやすい方を用いる)

1) 綿棒

鼻腔ぬぐい液を採取する場合、奥まで届くように長い柄で、かつよくしなる素材のものを用意するとよい。

2) 鼻腔ぬぐい液を採取する場合、綿棒を 15~20 センチほど鼻孔から差し込み、5回程度ぬぐいを繰り返してから綿棒を引き抜く。綿の部分をチューブ(中短試)の液体に付け、激しくリンスして、管壁で綿の部分をしばって綿棒は捨てる、あるいは棒を折り綿棒の先を中短試の液に差し込んだままにする。

3) 切断した頭部あるいは胴体から気管ぬぐい液を採取する場合、切断面の血液が付着しないよう注意して綿棒で気管をぬぐい、検体を採取する。綿の部分をチューブ(中短試)の液体に付け、激しくリンスして、管壁で綿の部分をしばって綿棒は捨てる、あるいは棒を折り綿棒の先を中短試の液に差し込んだままにする。

(3)と畜場から地研への検体の輸送法

全ての検体について、72 時間以内に検体を輸送することが可能な場合には、検体採取後直ちに冷蔵庫に保存し、4℃(保冷剤)で輸送する。72 時間以内に輸送することが不可能な場合は、検体採取後直ちに施設内で-70℃以下の冷凍庫に保存し、冷凍(ドライアイス)にて輸送する。なお、ドライアイスは密閉した容器に入れない。

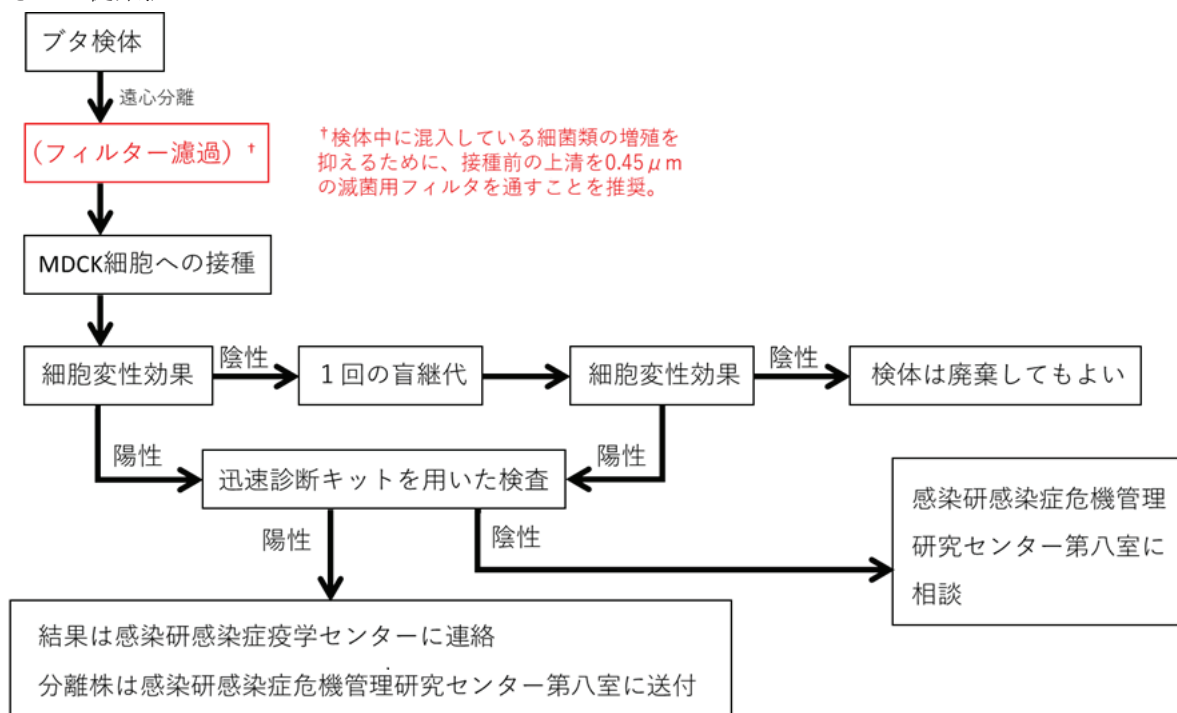
(4)検体保管について

遠心後(x1,500g、10 分間)の上清は、可能であれば2本以上に分注し、1本を検査用として検査を速やかに実施することが望ましい。残りは速やかに-70℃以下で適切に保管する。

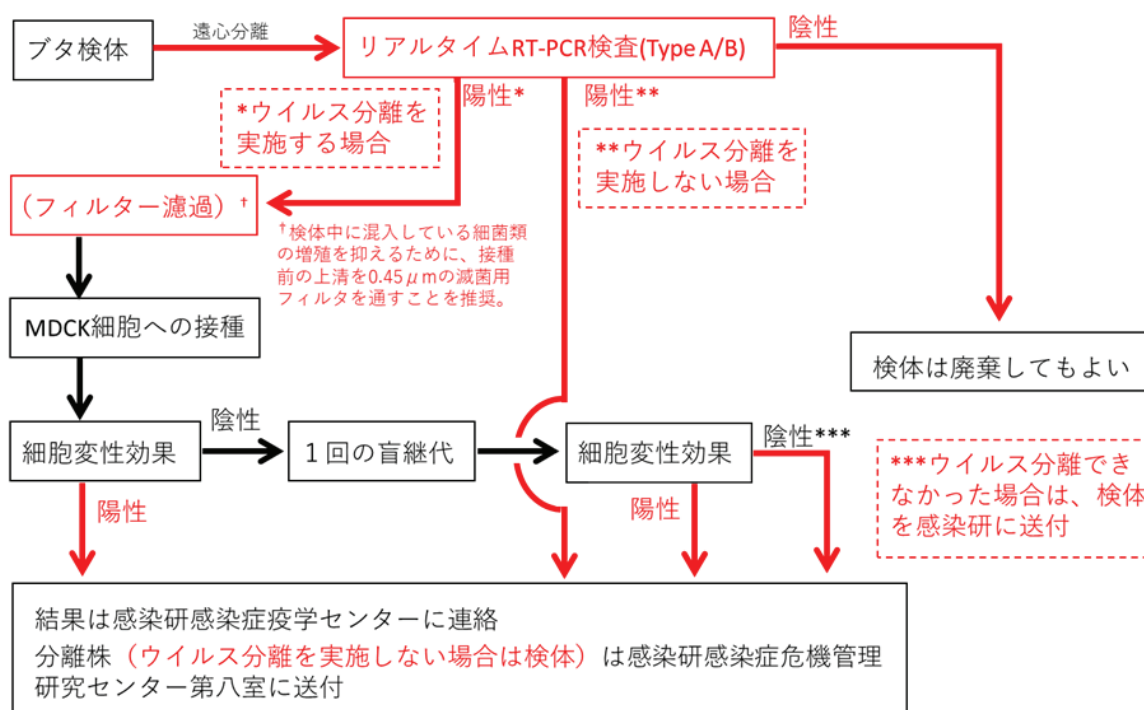
令和5年度との変更点を赤字で示している。

参考資料 11 ブタからのインフルエンザウイルス分離調査フローチャート

その1:従来法



その2:リアルタイム RT-PCR 検査を実施する場合



令和5年度との変更点を赤字で示している。

参考資料 12 ウイルス分離用培地の変更点

変更前

分離用培地 試薬	最終濃度	使用量
DMEM	-	500 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン 100 μ g/ml ストレプトマイシン	5 ml
ファンギゾン	0.5 μ g/ml	1 ml

変更後

分離用培地 試薬	最終濃度	使用量
DMEM	-	500 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン 100 μ g/ml ストレプトマイシン	5 ml
ファンギゾン	0.5 μ g/ml	1 ml
ゲンタマイシン (GIBCO #15710064)	100 μ g/mL	250 μ l

令和5年度との変更点を赤字で示している。

参考資料 13 リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) による A 型および B 型インフルエンザウイルスの検出

RNA 抽出及びリアルタイム RT-PCR 方法は、国立感染症研究所が公開しているインフルエンザ診断マニュアル(第5版)(令和5年8月)に準ずる。<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20230829.pdf>
ただし、使用する試薬、機種によって条件は異なるため、最適な条件は、各付属のマニュアルを参照すること。

以下、使用するプライマー及びプローブと反応条件のみ抜粋。

1. リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブについて

(A 型同定用)

Type A M 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

MP-39-67For	5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
MP-183-153Rev	5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA
MP-96-75ProbeAs	5'-(FAM)ATYTCCGGCTTTGAGGGGGCCTG(MGB)

PCR 産物の長さ: 146bp

(B 型同定用)

Type B NS 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

NIID-TypeB TMPrimer-F1	5'-GGAGCAACCAATGCCAC
NIID-TypeB TMPrimer-R1	5'-GTKTAGGCGGTCTTGACCAG
NIID-TypeB Probe2	5'-(FAM)ATAAACTTYGAAGCAGGAAT(MGB)

PCR 産物の長さ: 105bp

2. リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) 反応

Thermo Fisher Scientific 社の AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents を用いた反応条件
詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

試薬	容量	最終濃度
2×Mix	12.5μl	1×
Forward primer (10μM)	1.5μl	0.6μM
Reverse primer (10μM)	1.5μl	0.6μM
Probe (5μM)	0.5μl	0.1μM
25×Enzyme Mix	1.0μl	
RNase Inhibitor (20U/μl)	0.1μl	
RNase free Water	2.9μl	
RNA template	5μl	
Total 容量	25μl	

<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 Thermo Fisher Scientific 社 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents、リアルタイム PCR 装置に Applied Biosystems 社 Applied Biosystems QuantStudio 5 または 7500 Fast リアルタイム PCR システム、Roche Diagnostics 社 LightCycler 480 を使用する場合の反応条件を示した。

Applied Biosystems QuantStudio 5 または 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合 (Standard モードで使用する)

50°C 10min.
 ↓
 95°C 10min.
 ↓
 95°C 15sec.
 56°C 30sec. (Data Collection)
 72°C 15sec.

} ×45 cycles

LightCycler 480 を使用する場合

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	10min.	4.4	None
Denature	None	1	95	10min.	4.4	None
PCR	Quantification	45	95	15sec.	4.4	None
			56	30sec.	2.2	Single
			72	15sec.	4.4	None
Cooling	None		40	30sec.	2.2	None

インフルエンザ菌感染症 感染源調査用 調査票

記載日(西暦)	年 月 日		
番号※都道府県で記入			
年齢(1歳未満の場合月齢必須)	歳 月		
性別(いずれかに○)	男 ・ 女 ・ 不明		
臨床診断名	該当する診断名に○をつけてください。 その他を選んだ場合には診断名を記載してください。 その他の診断名は5つまで選択肢から選んで記載するか選択肢にない場合には自由記載で()内に記載してください。		
臨床診断名1(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
臨床診断名2(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
臨床診断名3(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
臨床診断名4(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
臨床診断名5(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
※1～5でその他を選択する場合の 選択肢	発熱, 意識障害, ショック, 嘔吐, 多臓器不全, 頸部硬直, 関節炎, 関節痛, 上気道炎, 下気道炎, 中耳炎, 頭痛, 呼吸困難, 痙攣		
Hib含有ワクチン接種回数 (いずれかに○)	なし・1回・2回・3回・4回以上・有り接種回数不明・接種歴不明		
ワクチン接種1回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	Hib・5種混合・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
ワクチン接種2回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	Hib・5種混合・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
ワクチン接種3回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	Hib・5種混合・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
ワクチン接種4回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	Hib・5種混合・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
ワクチン接種5回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	Hib・5種混合・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
検体検査結果	検体の種類が複数の場合には裏面に記載		
検体の種類1_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は 種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明		
検体の種類1_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦) 年 月 日
検体の種類1_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -		
検体の種類1_莢膜型 (いずれかに○)	a ・ b ・ c ・ d ・ e ・ f ・ NT		

検体検査結果		検体の種類が複数の場合は以降に記載			
検体の種類2_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明				
検体の種類2_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦)	年 月 日	
検体の種類2_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -				
検体の種類2_莢膜型 (いずれかに○)	a ・ b ・ c ・ d ・ e ・ f ・ NT				
検体の種類3_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明				
検体の種類3_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦)	年 月 日	
検体の種類3_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -				
検体の種類3_莢膜型 (いずれかに○)	a ・ b ・ c ・ d ・ e ・ f ・ NT				
検体の種類4_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明				
検体の種類4_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦)	年 月 日	
検体の種類4_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -				
検体の種類4_莢膜型 (いずれかに○)	a ・ b ・ c ・ d ・ e ・ f ・ NT				
検体の種類5_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明				
検体の種類5_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦)	年 月 日	
検体の種類5_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -				
検体の種類5_莢膜型 (いずれかに○)	a ・ b ・ c ・ d ・ e ・ f ・ NT				

ご協力ありがとうございました。

肺炎球菌感染症 感染源調査用 調査票

記載日(西暦)	年 月 日		
番号※都道府県で記入			
年齢(1歳未満の場合月齢必須)	歳 か月		
性別(いずれかに○)	男・女・不明		
臨床診断名	該当する診断名に○をつけてください。 その他を選んだ場合には診断名を記載してください。 その他の診断名は5つまで選択肢から選んで記載するか選択肢にない場合には自由記載で()内に記載してください。		
臨床診断名1(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
臨床診断名2(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
臨床診断名3(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
臨床診断名4(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
臨床診断名5(いずれかに○)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・その他※()・不明		
※1~5でその他を選択する場合の 選択肢	発熱, 意識障害, ショック, 嘔吐, 多臓器不全, 頸部硬直, 関節炎, 関節痛, 上気道炎, 下気道炎, 中耳炎, 頭痛, 呼吸困難, 痙攣		
肺炎球菌ワクチン接種回数 (いずれかに○)	なし・1回・2回・3回・4回以上・有り接種回数不明・接種歴不明		
ワクチン接種1回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・ PPSV23・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
ワクチン接種2回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・ PPSV23・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
ワクチン接種3回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・ PPSV23・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
ワクチン接種4回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・ PPSV23・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
ワクチン接種5回目 (ワクチン種類に○をつけ、接種日 を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・ PPSV23・不明	西暦	年 月 ・ 接種年月不明
検体検査結果	検体の種類が複数の場合には裏面に記載		
検体の種類1_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は 種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明		
検体の種類1_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦) 年 月 日
検体の種類1_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -		
検体の種類1_莢膜型 (いずれかに○)	1・2・3・4・5・6A・6B・7F・8・9N・9V・10A・11A・12F・ 14・15B・17F・18C・19A・19F・20・22F・23F・33F		

検体検査結果		検体の種類が複数の場合は以降に記載			
検体の種類2_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明				
検体の種類2_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦)	年 月 日	
検体の種類2_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -				
検体の種類2_莢膜型 (いずれかに○)	1・2・3・4・5・6A・6B・7F・8・9N・9V・10A・11A・12F・ 14・15B・17F・18C・19A・19F・20・22F・23F・33F				
検体の種類3_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明				
検体の種類3_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦)	年 月 日	
検体の種類3_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -				
検体の種類3_莢膜型 (いずれかに○)	1・2・3・4・5・6A・6B・7F・8・9N・9V・10A・11A・12F・ 14・15B・17F・18C・19A・19F・20・22F・23F・33F				
検体の種類4_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明				
検体の種類4_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦)	年 月 日	
検体の種類4_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -				
検体の種類4_莢膜型 (いずれかに○)	1・2・3・4・5・6A・6B・7F・8・9N・9V・10A・11A・12F・ 14・15B・17F・18C・19A・19F・20・22F・23F・33F				
検体の種類5_検体の種類 (いずれかに○をつけ、その他は種類名を記載してください。)	髄液・血液・髄液と血液・ その他(種類名:)・不明				
検体の種類5_検体採取日・検査日	検体採取日 (西暦)	年 月 日	検査日 (西暦)	年 月 日	
検体の種類5_分離結果(いずれかに○)	+ ・ -				
検体の種類5_莢膜型 (いずれかに○)	1・2・3・4・5・6A・6B・7F・8・9N・9V・10A・11A・12F・ 14・15B・17F・18C・19A・19F・20・22F・23F・33F				

ご協力ありがとうございました。

ロタウイルス感染症 感染源調査用 調査票

番号		記載日	年 月 日
-----------	--	------------	-------

年齢 (検体採取時年齢)	歳	か月 (1歳未満では必須)	性別	男 ・ 女 ・ 不明
------------------------	----------	-------------------------	-----------	------------

生年月日	年	月	日
-------------	----------	----------	----------

発症日	西暦	年	月	日
------------	----	----------	----------	----------

該当に○をつけてください

同胞	あり・なし・不明	保育所・幼稚園 入所 <small>※未就学児のみ</small>	あり・なし・不明	
周囲での 胃腸炎流行	あり・なし・不明	ありの場合の流行場所 (複数選択可)	家庭 ・ 保育所 ・ 幼稚園 ・ 学校 ・ その他 ・ 不明	
下痢	あり・なし・不明	下痢ありの場合	持続期間(日) 0日 ・ 1~4日 ・ 5日 ・ 6日以上 ・ 不明	
			24時間以内の最大回数 0回 ・ 1~3回 ・ 4~5回 ・ 6回以上 ・ 不明	
嘔吐	あり・なし・不明	嘔吐ありの場合	持続期間(日) 0日 ・ 1日 ・ 2日 ・ 3日以上 ・ 不明	
			24時間以内の最大回数 0回 ・ 1回 ・ 2~4回 ・ 5回以上 ・ 不明	
発熱	あり・なし・不明	発熱ありの場合	最高体温(℃) 37.0以下・37.1~38.4・38.5~38.9・39.0以上・不明	
医療機関の受診状況	一般外来 ・ 救急外来 ・ 不明		入院 あり・なし・不明	
けいれん	あり・なし・不明	脳症	あり・なし・不明	
その他の臨床診断	あり・なし・不明	その他ありの場合 (自由記載)		
検体採取日	西暦	年	月	日
検体の種類	便 ・ 肛門ぬぐい液 ・ その他 ・ 不明		その他の場合 検体の種類	

ロタウイルスワクチン接種歴	あり ・ なし ・ 不明 ・ 回数種類不明
----------------------	-----------------------

該当に✓してください

接種歴ありの場合	<input type="checkbox"/> 1回のみ接種	<input type="checkbox"/> RV1(ロタリックス®) 1回のみ	西暦	年	月	日
		<input type="checkbox"/> RV5(ロタテック®) 1回のみ	西暦	年	月	日
	<input type="checkbox"/> 2回接種	<input type="checkbox"/> RV1(ロタリックス®) 2回	① 西暦	年	月	日
			② 西暦	年	月	日
		<input type="checkbox"/> RV5(ロタテック®) 2回	① 西暦	年	月	日
			② 西暦	年	月	日
	<input type="checkbox"/> 3回接種	<input type="checkbox"/> RV1(ロタリックス®) 1回 <input type="checkbox"/> RV5(ロタテック®) 1回 (順不同)	① 西暦	年	月	日
			② 西暦	年	月	日
		<input type="checkbox"/> RV5(ロタテック®) 3回	① 西暦	年	月	日
			② 西暦	年	月	日
		<input type="checkbox"/> RV1(ロタリックス®) 1回 <input type="checkbox"/> RV5(ロタテック®) 2回 (順不同)	① 西暦	年	月	日
			② 西暦	年	月	日
<input type="checkbox"/> RV1(ロタリックス®) 2回 <input type="checkbox"/> RV5(ロタテック®) 1回 (順不同)	① 西暦	年	月	日		
	② 西暦	年	月	日		

検査日	西暦	年	月	日
------------	----	----------	----------	----------

ロタ・ノロ・サポスクリーニング結果 (Real-time PCR)							
(検出結果は+あるいは-のいずれかに○・コピー数の単位は[copies] 例) ○・○×10^○○ copies)							
ロタウイルス		ノロウイルス GI		ノロウイルス GII		サポウイルス	
検出結果	コピー数	検出結果	コピー数	検出結果	コピー数	検出結果	コピー数
+ ・ -	. ×10^	+ ・ -	. ×10^	+ ・ -	. ×10^	+ ・ -	. ×10^

ロタウイルスG遺伝子型検査結果 (検出されたG遺伝子型はすべて選択してください)

検出G遺伝子型	判定不能 ・ G1 ・ G2 ・ ヒトG3 ・ ウマ様G3 ・ G4 ・ G8 ・ G9 ・ G12
全遺伝子型結果 (実施した場合)	

御協力ありがとうございました。

ロタウイルス

I. ロタウイルスの概説

ロタウイルスはレオウイルス科 (*Reoviridae*) ロタウイルス属 (genus *Rotavirus*) に分類されるヒトおよび動物の胃腸炎起因ウイルスである。特に乳幼児における感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスとして知られ、5歳までにはほとんどのヒトがロタウイルスに一度は感染すると考えられている。ロタウイルスのゲノムは11遺伝子分節(セグメント)からなる2本鎖RNAで構成されており、6種類の構造タンパク質(VP)と6種類の非構造タンパク質(NSP)がコードされている。現在のところ、ロタウイルスはA~J(Eを除く)の9群に分類されているが、ヒトから検出されるロタウイルスのほとんどはA群ロタウイルス(Rotavirus A、以下RVA)であり、現在利用されているロタウイルスワクチンも、RVAによる胃腸炎を予防するためのワクチンである。従って、ロタウイルス感染症の感染症流行予測調査もRVAについての調査を行う。なお、本術式において単に「ロタウイルス」と記載している場合は、RVAのことを指すものとする。

RVAの遺伝子型は多彩であり、流行株のシーズン間差および地域差が大きいことが知られている。そのため、なるべく多くの地域で長期的に調査を行うことが望ましい。網羅的な調査を通してRVA流行株の傾向を把握し、患者の重症度やワクチン接種歴との関連を調査することにより、ワクチン効果の調査や、ワクチン効果の低いウイルス株が出現していないか監視することが可能となる。

II. 検査概要

現在のところ、RVAの抗体測定法は一般的に普及していないため、感受性調査を実施することはできない。従って、感染症流行予測調査では感染源調査のみを実施する。

RVA胃腸炎の患者の大半は小児であるため、調査対象は小児(15歳以下)の感染性胃腸炎患者とする。RVA胃腸炎患者の便中には大量のウイルスが含まれているため、便からウイルスを検出するのが最も効率的である。RVAと同様の胃腸炎症状を呈するウイルスとして、ノロウイルスやサポウイルスが知られており、これらと鑑別するためにリアルタイムPCRによるスクリーニングを行う。リアルタイムPCRにてRVA陽性と判定された検体について、RVAの遺伝子型検査を実施する。遺伝子型検査は、中和抗原を有し血清型を反映することが知られているVP7遺伝子の遺伝子型(G型)検査を行う。

また、RVA陽性検体のうち、コピー数の多い検体(1.0×10^4 コピー/test以上)については、検体を国立感染症研究所に送付してシーケンス解析を行う。RVAは遺伝子再集合(リアソートメント)により、遺伝子が組み換わることがあるため、11本の遺伝子分節の組み合わせ(遺伝子型構成)は複雑である。稀に動物RVAの遺伝子の一部がヒトRVAと組み換わり、新規流行株としてヒトの間で流行を引き起こすことも知られている。このようなRVAの複雑な遺伝子型を詳細に調査するため、シーケンス解析によるデータの補強を行う。また、シーケンス解析を行うことにより、ワクチン株と野生株との鑑別も可能となる。

Ⅲ. 検査方法

1. 検体の採取

1.1. 対象患者

各自治体で概ね 1～2 か所の医療機関（ロタウイルス感染症例が受診する可能性の高い医療機関）を指定し、その医療機関に受診した 15 歳以下の患者のうち、1 日 3 回以上の水様性下痢を認め、経静脈輸液を行った者を対象とする。ただし、受診時点で下痢の持続期間が 2 週間以上の者、血便を認める者、院内感染が疑われる者を除く。また、過去に本調査の対象となったことがある者は、前回から 2 カ月以上経過していることとする。各自治体で月初めから順番に 10 人の該当患者を対象に検体を採取する。

1.2. 検体の採取方法

患者の受診時あるいは受診後なるべく速やかに便検体を採取する。予めオムツや下着の中にガーゼを敷いておき、排便後にガーゼを回収すれば、比較的容易に採取することができる。検体は便が望ましいが、やむを得ない場合は直腸スワブも可とする。消毒薬を検体に混入させてはならない。短期間（数日以内）の保存や輸送時は冷蔵で問題ないが、長期保存の場合は冷凍（-20℃以下）が望ましい。

2. 便懸濁液の調製

2.1. 検体の取り扱い上の注意点

本調査で取り扱う可能性の高い胃腸炎ウイルス（ロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルス等）はいずれも BSL2 の病原体であり、臨床検体は BSL2 基準を満たした実験室の安全キャビネット内で取り扱う。検体や汚染した器材等は 0.1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液等で処理あるいはオートクレーブ処理してから、しかるべき廃棄を行う。患者の便中には大量の病原体が含まれるため、感染事故防止およびコンタミネーションの防止のためにも、検体や器材の消毒には十分な注意が必要である。

2.2. 便懸濁液の調製方法

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・リン酸緩衝生理食塩水 PBS(-)
- ・次亜塩素酸ナトリウム（消毒液）
- ・ピペット、電動ピペッター
- ・マイクロピペット、マイクロチップ（必要に応じて使用）
- ・検体保存用マイクロチューブ
- ・50 mL 遠沈管
- ・シェーカー
- ・遠心機

1) 便検体を 50 mL 遠沈管に取り、重量を測定して 10 w/v %になるよう PBS(-)を加える。便 1g

に PBS(-)を添加して全量 10 mL 程度になるよう調製すると扱いやすい。便懸濁液を正確に 10%に調製するのが困難な場合は、おおよそでも構わない。便の量が少ない場合は、添加する PBS(-)の量を適宜調整する。オムツ（水溶便が付着したもの）の場合は、便が付着したと思われる箇所の表面生地を切り取って、同様に 50 mL 遠沈管に移す。オムツに含まれる吸水材は、後から加える PBS(-)を即座に吸収してしまうので、出来る限り混入しないように注意する。

PBS(-)の添加量は、直腸スワブの場合は 0.5 mL、便やオムツの場合も最低 0.5 mL とする。

- 2) 便検体と PBS(-)を入れた 50 mL 遠沈管をシェーカーでよく攪拌する（室温、300 rpm 程度、10-15 min）。検体量（液量）が少ない場合はシェーカーではなく、ピペティングで十分に攪拌する。
- 3) 遠心（4℃、5,000×g 程度、10-15 min）して、夾雑物をなるべく取らないよう上清を保存用のマイクロチューブ等に移し、これを検体として以降の検査を進める。この検体（便懸濁液）は -70℃以下のフリーザーで凍結保存し、凍結融解は最小限にとどめる。

3. RNA の抽出

3.1. RNA 抽出における注意点

ロタウイルスのゲノムは二本鎖 RNA (dsRNA) であるが、一本鎖 RNA の抽出法をそのまま利用しても問題ない。ウイルス RNA の抽出法には多くの方法があり、抽出キットも多数販売されている。キットにより多少、抽出効率に差があるが、本調査ではどの抽出方法を利用しても良いものとする。ただし、各自治体内では年度の途中で方法を変更せず、極力統一の方法で実施することが望ましい。操作方法は、基本的にそれぞれのキットの説明書に従う。どのキットを用いる場合でも、用いる便懸濁液の容量は適宜変更しても構わないが、**最終的な溶出量は、用いる便懸濁液の容量の半分（2 倍濃縮）に統一する。**また、ロタウイルスのゲノム RNA (dsRNA) は DNase により分解されるため、**DNase 処理を行ってはならない。**

以下に利用可能な RNA 抽出キットの一例を挙げる。

- ・ QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)
- ・ High Pure Viral RNA Kit (Roche、日本ジェネティクス)
- ・ NucleoSpin RNA Virus (タカラバイオ)
- ・ Direct-zol RNA Kit (ZYMO RESEARCH、フナコシ) (※TRI Reagent LS 等が必要)

これらのキットを用いた RNA 抽出方法のうち、2 例を以下に示す。

3.2. QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) による RNA 抽出方法 (例 1)

必要な器材 (それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない)

- ・エタノール (96-100%)
- ・マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ (1.5 – 2.0 mL)
- ・マイクロチューブ用遠心機
- ・ボルテックスミキサー

事前準備

- ・ Buffer AW1 および AW2 に指定された量のエタノールを添加して混和する。
- ・ キットに付属のキャリア RNA を添加する必要はない (ノロウイルスやサポウイルスの場合、キャリア RNA として用いられている poly A が oligo dT による逆転写反応を阻害する可能性がある)。

- 1) マイクロチューブに Buffer AVL 560 μ L を取り、10%便懸濁液を 140 μ L 添加する。
- 2) ボルテックスにより充分混和し、室温に 10 分以上置く。
- 3) チューブをスピンドウンし、エタノールを 560 μ L 添加する。
ボルテックスにより充分混和し、再びチューブをスピンドウンする。
- 4) スピнкаラムに 3) の液 630 μ L を入れ遠心する (室温、6,000 \times g、1 min)。スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、残りの 3) の液 630 μ L を入れて再び遠心する (室温、6,000 \times g、1 min)。
- 5) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW1 を 500 μ L 入れて遠心する (室温、6,000 \times g、1 min)。
- 6) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW2 を 500 μ L 入れて遠心する (室温、20,000 \times g、3 min)。
- 7) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、更に遠心する (室温、20,000 \times g、1 min)。
- 8) スピнкаラムをマイクロチューブに移し、Buffer AVE を 70 μ L 入れ、蓋を閉めて室温で 1 分以上置いた後、遠心する (室温、6,000 \times g、1 min)。
- 9) このろ液を RNA サンプルとして -70 $^{\circ}$ C 以下に凍結保存する。

3.3. Direct-zol RNA Kit (ZYMO RESEARCH) による RNA 抽出方法 (例 2)

必要な器材 (それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない)

- TRI Reagent LS (あるいは TRIzol LS)

液体サンプルからの抽出であるため、TRI Reagent や Trizol ではなく、「LS」の付いた上記の製品を使用すること。フェノールを含む試薬であるため、適切に廃棄すること。

- エタノール (96-100%)
- マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ (1.5 – 2.0 mL)
- マイクロチューブ用遠心機
- ボルテックスミキサー

事前準備

- Direct-zol RNA PreWash および RNA Wash Buffer に指定された量のエタノールを添加して混和しておく。
- キットに付属の DNase は使用しない (ロタウイルスのゲノムが分解される)。

- 1) マイクロチューブに TRI Reagent LS 240 μ L を取り、10%便懸濁液を 80 μ L 添加する。
- 2) ボルテックスにより充分混和し、室温に 10 分以上置く。
- 3) チューブをスピンドウンし、エタノールを 320 μ L 添加する。
ボルテックスにより充分混和し、再びチューブをスピンドウンする。
- 4) スピнкаラムをコレクションチューブにセットし、カラムに 3) の液 640 μ L を入れて遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 5) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、Direct-zol RNA PreWash を 400 μ L 入れて遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 6) ろ液を捨て、再び Direct-zol RNA PreWash を 400 μ L 入れて遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 7) ろ液を捨て、RNA Wash Buffer を 700 μ L 入れて遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 8) ろ液を捨て、更に遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 9) スピнкаラムをマイクロチューブに移し、DNase/RNase-Free Water を 40 μ L 入れ、蓋を閉めて室温で 1 分間以上置いた後、遠心する (室温、12,000 \times g、1 min)。
- 10) このろ液を RNA サンプルとして -70 $^{\circ}$ C 以下に凍結保存する。

4. リアルタイム PCR

概要

本調査では、定量的リアルタイム PCR（プローブ法）により、検体中のロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルスの各遺伝子を定量する。本調査では、逆転写反応と定量的リアルタイム PCR を別々に行う 2 ステップ法で実施する。つまり、逆転写反応までは共通で実施し、リアルタイム PCR はウイルス別に実施する。リアルタイム PCR では、国立感染症研究所が提供する各ウイルス遺伝子の標準品を用いて検量線を作成し、コピー数を算出する。現在、逆転写反応およびリアルタイム PCR の試薬が様々なメーカーから販売されており、ほとんどの試薬は問題無く定量可能であると考えられるため、どの試薬を使用しても構わない。

4.1. 逆転写反応

4.1.1. 逆転写反応における注意点

リアルタイム PCR 用の逆転写反応試薬は、多くのメーカーから販売されている。以下にその代表的なものを挙げる。試薬キットによっては、ランダムプライマーのみを用いるものや、ランダムプライマーと oligo dT プライマーを混合して用いるものがある。ノロウイルスとサポウイルスは poly A 配列を有しているが、ロタウイルスは poly A を持たないため、oligo dT プライマーだけで逆転写を行うことはできない。従って、oligo dT プライマーは必須ではないが、ランダムプライマーは必須である。ロタウイルスのゲノムは dsRNA であるため、**逆転写反応前に 95℃、2 分間の熱変性を行う**必要がある。また、どの試薬キットを用いる場合でも、**RNA サンプルの添加容量は、逆転写反応の全反応容量の 1/5 量（5 倍希釈）に統一する**。調製中の試薬や RNA サンプルは、氷上等で冷却した状態を保つことが望ましい。

代表的な逆転写反応試薬

- ・ SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher)
- ・ PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ)
- ・ ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)

これらの試薬を用いた逆転写反応の方法のうち、2 例を以下に示す。

4.1.2. SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher) による逆転写反応（例 1）

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・ 超純水（DNase/RNase-free Water）
- ・ マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ（1.5 mL）
- ・ PCR チューブあるいは PCR プレート
- ・ サーマルサイクラー

- 1) PCR チューブあるいは PCR プレートに、DNase/RNase-free Water を 6 μ L 入れる。
- 2) RNA サンプルを 4 μ L 入れる。

- 3) サーマルサイクラー等で 95°C、2 分間の熱変性を行う。変性後 4°Cに急冷させる。
- 4) 以下の表に従い、逆転写反応液を調製する。

試薬	容量/well
熱変性した RNA サンプル	10 μ L
DNase/RNase-free Water	4 μ L
5x VILO Reaction Mix	4 μ L
10x SuperScript Enzyme Mix	2 μ L
Total	20 μ L

- 5) サーマルサイクラーで、25°Cで 10 分間、42°Cで 60 分間、85°Cで 5 分間の反応を行い、反応後はすぐに 4°Cに冷却する。

4.1.3. PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) による逆転写反応 (例 2)

必要な器材 (それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない)

- ・超純水 (DNase/RNase-free Water)
- ・マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ (1.5 mL)
- ・PCR チューブあるいは PCR プレート
- ・サーマルサイクラー

- 1) PCR チューブあるいは PCR プレートに、DNase/RNase-free Water を 6 μ L 入れる。
- 2) RNA サンプルを 4 μ L 入れる。
- 3) サーマルサイクラー等で 95°C、2 分間の熱変性を行う。変性後 4°Cに急冷させる。
- 4) 以下の表に従い、逆転写反応液を調製する (Oligo dT Primer を添加する必要は無い)。

試薬	容量/well
熱変性した RNA サンプル	10 μ L
DNase/RNase-free Water	1 μ L
5x PrimeScript Buffer	4 μ L
Random 6-mers (100 μ M)	4 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix	1 μ L
Total	20 μ L

- 5) サーマルサイクラーで、37°Cで 15 分間、85°Cで 10 秒間の反応を行い、反応後はすぐに 4°Cに冷却する。

※合成した cDNA をすぐ (数日以内) に使用しない場合は-20°C以下に凍結保存する。

4.2. リアルタイム PCR 法

4.2.1. 各ウイルスの検出に共通する注意点

リアルタイム PCR の反応試薬も、多くのメーカーから販売されており、どの試薬も大きな性能差はないと考えられるため、どの試薬を使用しても良い。以下にその代表的なものを挙げる。また、リアルタイム PCR 装置も多くのメーカーが販売しており、大きな性能差はないと考えられるため、どの装置を使用しても良い。Applied Biosystems 等の ROX による補正が必要な機器を使用する場合には、反応系に ROX が含まれていることを確認すること。また、伸長反応の温度はプライマーのアニーリング効率に大きな影響を与えるため、**伸長反応の温度は変えるべきではない**。他の反応条件は、各試薬の説明書に記載されている一般的な条件に沿って変更しても構わない。ただし、以下の**検量線の成立基準を満たすことは必須**とする。正確性を期すため、各サンプル、標準品、陰性対照 (No Template Control) はそれぞれ 2 ウェル以上置くこと。また、**定量結果 (コピー数) の有効数字は 2 桁とする**。

なお、ロタウイルスおよびサポウイルスの標準品は国立感染症研究所ウイルス第二部第一室で、ノロウイルスの標準品は国立感染症研究所感染症危機管理研究センター第五室で作製し、提供される。連絡先は末尾を参照。

各ウイルス遺伝子検査における検量線の基準 (実験成立条件)

- ・標準品の測定点は 1.0×10^7 コピーから 1.0×10^2 コピーの範囲内に少なくとも 3 点以上置く (必要に応じて、この範囲外の測定点を置いて差し支えない)。
- ・陽性の判断基準となる 1.0×10^2 コピーは必ず置き、その測定 Ct 値は 40 未満とする。
- ・明らかな外れ値は棄却しても良いが、少なくとも 1.0×10^2 コピーを含む 3 測定点は採用する。
- ・決定係数 (相関係数 R の 2 乗) が 0.99 以上であることが望ましい。

代表的なリアルタイム PCR 試薬

- ・TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher)
- ・Premix Ex Taq (Probe qPCR) (タカラバイオ)
- ・THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO)
- ・Quantitect Probe PCR Kit (Qiagen)

以下の例では、特定の機器、試薬を用いた方法を紹介するが、適宜変更しても良い。

4.2.2. ロタウイルス遺伝子の定量

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・リアルタイム PCR 試薬 (TaqMan Universal PCR Master Mix)
- ・リアルタイム PCR 測定機 (ABI7500 Fast Real-Time PCR System)
- ・リアルタイム PCR 測定用プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate)
- ・プレート用遠心機
- ・マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ (1.5 mL)
- ・超純水 (DNase/RNase-free Water)
- ・プライマー、プローブ (下表を参照)
- ・ロタウイルスのリアルタイム PCR 用標準品 (感染研ウイルス第二部第一室で作製)

※ロタウイルスの標準品は NSP3 遺伝子のリアルタイム PCR 増幅部位を含むプラスミド DNA である。DNA は低濃度で保存すると劣化しやすいため、 10^8 コピー/ μL 以上の濃度で -20°C 以下に凍結保存する。分注して保存し、過度の凍結融解は避けること。また、段階希釈は検査当日に用時調製すること。

ロタウイルス用プライマー・プローブ

(参考文献 : Journal of Medical Virology, 2008, 80(8): 1489-1496)

Name	5'- sequence -3'	Position
NSP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC	988-1007
NSP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA	1055-1074
NSP3-Probe	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA	1009-1041

* NSP3-Probe は、Integrated DNA Technologies (IDT) 社のダブルクエンチャープローブ (5'-FAM/9-10 番目の塩基の間に ZEN/3'-IBFQ) の使用を推奨。プローブの配列が長いため、通常の 3'末端にクエンチャーを付加させたものではバックグラウンドが高くなるので注意。

1) 以下の表に従い、反応液を調製する。

試薬	容量/well
DNase/RNase-free Water	6.5 μL
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)	10.0 μL
Forward primer (NSP3-FDeg) (10 μM)	0.5 μL
Reverse primer (NSP3-R1) (10 μM)	0.5 μL
Probe (NSP3-Probe) (10 μM)	0.5 μL
Total	18.0 μL

- 2) リアルタイム PCR 測定用プレートのウェルに上記の反応液を 18.0 μL ずつ入れる。
- 3) 「4.2. 逆転写反応」で合成した cDNA を 2.0 μL /ウェル添加する。
- 4) 陰性対照 (No Template Control) として、DNase/RNase-free Water を 2.0 μL /ウェル添加する。

- 5) 標準品を DNase/RNase-free Water で段階希釈し、 $1.0 \times 10^7 \cdot 1.0 \times 10^2$ コピー/ $2.0 \mu\text{L}$ の範囲の濃度に調製し、各濃度の標準品 $2.0 \mu\text{L}$ /ウェル添加する（ロタウイルスの場合は 1.0×10^7 コピーを越えることもあるが、高濃度では概ね検量線の直線性は保たれるので、必ずしも 1.0×10^7 コピーより高濃度の測定点を置く必要はない）。
- 6) プレートにシールをして、遠心機でスピンドウンする。
- 7) 下記のとおり、リアルタイム PCR 反応を行う。

50°C, 2 min	45 サイクル
95°C, 10 min	
95°C, 15 sec	
56°C, 60 sec	

- 8) データを解析して、各サンプルのコピー数（実測値）を算出する。複数のウェルのデータは相乗平均（幾何平均）として算出し、 1.0×10^2 コピー以上を陽性と判定する。

4.2.3. ノロウイルス遺伝子の定量

※ノロウイルス遺伝子の定量は、Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) を別々に実施する。
プライマー・プローブや標準品も別なので、取り違えないよう注意する。

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・リアルタイム PCR 試薬 (TaqMan Universal PCR Master Mix)
- ・リアルタイム PCR 測定機 (ABI7500 Fast Real-Time PCR System)
- ・リアルタイム PCR 測定用プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate)
- ・プレート用遠心機
- ・マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ (1.5 mL)
- ・超純水 (DNase/RNase-free Water)
- ・プライマー、プローブ (下表を参照)
- ・ノロウイルスのリアルタイム PCR 用標準品 (感染研感染症危機管理研究センター第五室で作製)

※ノロウイルスの標準品は、GI、GII それぞれのリアルタイム PCR 増幅部位を含むプラスミド DNA である。DNA は低濃度で保存すると劣化しやすいため、 10^8 コピー/ μL 以上の濃度で、 -20°C 以下に凍結保存する。分注して保存し、過度の凍結融解は避けること。また、段階希釈は検査当日に用時調製すること。

ノロウイルス用プライマー・プローブ

(参考文献：Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(4): 1548-1557)

Primer		
Name	5'- sequence -3'	Position
COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	5291-5310
COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5354-5375
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5003-5028
ALPF	TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG	5003-5028
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	5080-5100

*Probe		
Name	5'- sequence -3'	Position
RING1-TP(a)	AGATYGCATCYCCTGTCCA	5321-5340
RING1-TP(b)	AGATCGCGGTCTCCTGTCCA	5321-5340
RING2AL-TP	TGGGAGGGSGATCGCRATCT	5048-5067

* Probe は 5'末端に蛍光色素 (FAM や VIC 等)、3'末端にクエンチャー (TAMRA や BHQ 等) を標識したものを使用。

1) 以下の表に従い、反応液を調製する。

試薬	GI	容量/well	GII	容量/well
DNase/RNase-free Water		4.4 μ L		4.6 μ L
Taq Man Universal PCR Master Mix		10.0 μ L		10.0 μ L
Forward primer (10 μ M)	COG1F	0.8 μ L	COG2F	0.8 μ L
			ALPF	0.8 μ L
Reverse primer (10 μ M)	COG1R	0.8 μ L	COG2R	0.8 μ L
Probe (4 μ M)	RING1-TP (a)	1.5 μ L	RING2AL-TP	1.0 μ L
	RING1-TP (b)	0.5 μ L		
Total		18.0 μ L		18.0 μ L

- 2) リアルタイム PCR 測定用プレートのウェルに上記の反応液を 18.0 μ L ずつ入れる。
- 3) 「4.2. 逆転写反応」で合成した cDNA を 2 μ L/ウェル添加する。
- 4) 陰性対照 (No Template Control) として、DNase/RNase-free Water を 2.0 μ L/ウェル添加する。
- 5) 標準品を DNase/RNase-free Water で段階希釈し、 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^2$ コピー/2.0 μ L の範囲の濃度に調製し、各濃度の標準品 2.0 μ L/ウェル添加する。
- 6) プレートにシールをして、遠心機でスピンドウンする。
- 7) 下記のとおり、リアルタイム PCR 反応を行う。

50°C, 2 min	45 サイクル
95°C, 10 min	
95°C, 15 sec	
56°C, 60 sec	

- 8) データを解析して、各サンプルのコピー数 (実測値) を算出する。複数のウェルのデータは相乗平均 (幾何平均) として算出し、 1.0×10^2 コピー以上を陽性と判定する。

4.2.4. サポウイルス遺伝子の定量

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・リアルタイム PCR 試薬 (Quantitect Probe PCR Kit Master Mix)
- ・リアルタイム PCR 測定機 (ABI7500 Fast Real-Time PCR System)
- ・リアルタイム PCR 測定用プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate)
- ・プレート用遠心機
- ・マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ (1.5 mL)
- ・超純水 (DNase/RNase-free Water)
- ・プライマー、プローブ (下表を参照)
- ・サポウイルスのリアルタイム PCR 用標準品 (感染研ウイルス第二部第一室で作製)

※サポウイルスの標準品はリアルタイム PCR 増幅部位 (RNA-dependent RNA polymerase と capsid 遺伝子の一部) を含むプラスミド DNA である。DNA は低濃度で保存すると劣化しやすいため、 10^8 コピー/ μL 以上の濃度で -20°C 以下に凍結保存する。分注して保存し、過度の凍結融解は避けること。また、段階希釈は検査当日に用時調製すること。

サポウイルス用プライマー・プローブ

(参考文献 : Journal of Medical Virology, 2019, 91(3): 370-377)

Name	5'- sequence -3'	Position
HuSaV-F1	GGCHCTYGCCACCTAYAAYG	5079-5098
HuSaV-F2	GACCARGCHCTCGCYACCTAYGA	5078-5100
HuSaV-F3	GCWRYKGCWTGYTAYAACAGC	5121-5141
HuSaV-R	CCYTCCATYTCAAACACTA	5159-5177
HuSaV-TP-a*	CCNCCWATRWACCA	5101-5114
HuSaV-TP-b*	CCNCCWACRWACCA	5101-5114

* TaqMan MGB プローブ (5'末端に FAM、3'末端に Minor Groove Binder (MGB) とクエンチャーを標識したもの) の使用を推奨。HuSaV-TP-a と HuSaV-TP-b で異なる塩基 (T/C) を混合塩基 (Y) や Inosine として 1 本にした場合、同等の反応性が得られないので注意。

1) 以下の表に従い、反応液を調製する*。

試薬	容量/well
DNase/RNase-free Water	2.5 μ L
Quantitect Probe Kit Master Mix (2 \times)	12.5 μ L
HuSaV-F1 primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-F2 primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-F3 primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-R primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-TP-a probe (5 μ M)	1.0 μ L
HuSaV-TP-b probe (5 μ M)	1.0 μ L
Total	23.0 μ L

*反応液量は上記組成と同等の反応性が得られる範囲で調整してもよい。

- リアルタイム PCR 測定用プレートのウェルに上記の反応液を 23.0 μ L ずつ入れる。
- 「4.2. 逆転写反応」で合成した cDNA を 2.0 μ L/ウェル添加する。
- 陰性対照 (No Template Control) として、DNase/RNase-free Water を 2.0 μ L/ウェル添加する。
- 標準品を DNase/RNase-free Water で段階希釈し、 $1.0 \times 10^7 \cdot 1.0 \times 10^2$ コピー/2.0 μ L の範囲の濃度に調製し、各濃度の標準品 2.0 μ L/ウェル添加する。
- プレートにシールをして、遠心機でスピンドウンする。
- 下記のとおり、リアルタイム PCR 反応を行う。

95°C, 15 min	45 サイクル
95°C, 15 sec	
60°C, 60 sec	

- データを解析して、各サンプルのコピー数 (実測値) を算出する。複数のウェルのデータは相乗平均 (幾何平均) として算出し、 1.0×10^2 コピー以上を陽性と判定する。

5. ロタウイルスの VP7 遺伝子型決定法

ロタウイルスの VP7 遺伝子型は、semi-nested multiplex-PCR 法により簡便に判定することができる（参考文献：Front Microbiol. 2019 Mar 29;10:647）。まず 1st PCR primer を用いて 1st PCR (RT-PCR) を実施し、次いで 2nd PCR primer set を用いて 2nd PCR (multiplex-PCR) を実施する。2nd PCR の増幅産物のサイズを電気泳動で確認し、そのサイズから VP7 の遺伝子型を判定する。

RT-PCR 用および PCR 用の試薬についても、様々なメーカーから販売されており、ほとんどの試薬は問題無く利用可能であると考えられるため、どの試薬を使用しても構わない。ただし、アニーリング温度は 1st PCR、2nd PCR とともに 55℃とし、この温度は変えるべきではない。また、伸長反応の時間は充分（1,000 bp が十分に増幅できる程度の時間）に設定する。

必要な器材（それぞれ類似の同等品を用いても差し支えない）

- ・超純水（DNase/RNase-free Water）
- ・プライマー（下表を参照）
- ・One-step RT-PCR 試薬および PCR 試薬（下記代表例を参照）
- ・電気泳動用アガロース、TAE または TBE バッファー、6×Loading Buffer
- ・DNA 分子量マーカー（100 – 1,000 bp まで 100 bp 間隔になっている製品を推奨）
- ・エチジウムブロマイド（EtBr）、SYBR Green I・II、SYBR Gold などの染色剤
- ・マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ、PCR チューブあるいはプレート
- ・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

代表的な One-step RT-PCR 試薬

- ・PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit（タカラバイオ）
- ・TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)（タカラバイオ）

代表的な PCR 試薬

- ・PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase（タカラバイオ）
- ・Premix Ex Taq™ Hot Start Version（タカラバイオ）

以下の実施例では、1st PCR (RT-PCR) で PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit(タカラバイオ)を使用し、2nd PCR (multiplex-PCR) で PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (タカラバイオ)を使用する場合の例を示す。

5.1. 1st PCR (RT-PCR)

使用するプライマーの配列および PCR 産物のサイズ

Primer	5'- Sequence -3'	Product Size (bp)
1st PCR		
VP7 C-040F	CTCCTTTTAATGTATGGTATTGAATATACC	
VP7 C-941R	GTATAAAANACTTGCCACCATTTTTTCCA	902

- 1) PCR チューブあるいは PCR プレートに、DNase/RNase-free Water を 3.0 μ L 入れる。
- 2) RNA サンプルを 2.0 μ L 入れる。
- 3) サーマルサイクラーで **95°C、2 分間の熱変性を行う**。変性後は 4°C に急冷させる。
- 4) 以下の表に従い、逆転写反応液を調製する。

試薬	容量/well
DNase/RNase-free Water	1.0 μ L
VP7 C-040F primer	1.0 μ L
VP7 C-941R primer	1.0 μ L
2x One Step High Fidelity Buffer	10.0 μ L
PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.4 μ L
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR	1.6 μ L
Total	15.0 μ L

- 5) 熱変性させた RNA サンプル 5.0 μ L に、4) の逆転写反応液 15.0 μ L を添加する。
- 6) サーマルサイクラーで、下記のとおり RT-PCR 反応を行う。

45°C,	15 min	40 サイクル
94°C,	2 min	
98°C,	10 sec	
55°C,	15 sec	
68°C,	20 sec	
68°C,	3 min	
4°C,	∞	

5.2. 2nd PCR (multiplex-PCR)

2nd PCR (multiplex-PCR) で用いるプライマー9種類 (下表参照) は、各濃度が 5 μ M となるように予め混合しておく。

使用するプライマーの配列および PCR 産物のサイズ

Primer	5'- Sequence -3'	Product Size (bp)
2nd PCR		
VP7 C-0932R	ACTTGCCACCATTTTTTCCA	
G1-297F	GTATTATCCAACCTGAAGCAAGTAC	636
G2-401F	TTAAAGACTACAATGATATTACTACATT	532
G3-809F	CAAGGGAAAACGTRGCAGTTA	124
G3e-757F	CTAGATGTTACTACGGCTAC	176
G4-478F	TTCGCTTCTGGTGAGGAGTTG	455
G8-179F	TTACRCCATTTGTAAATTCACAG	754
G9-606F	GATGGGACARTCTTGTACCATA	327
G12-669F	TACRACAACCGACGTCACA	264

*G3e : ウマロタウイルス様 G3 (equine-like G3)

- 1) 5.1. 1st PCR (RT-PCR) で得られた 1st PCR 産物を、DNase/RNase-free Water で 100 倍に希釈する。
- 2) 以下の表に従い、逆転写反応液を調製する。

試薬	容量/well
DNase/RNase-free Water	10.6 μ L
Primer set (5 μ M each)	1.0 μ L
5x PrimeStar GXL Buffer	4.0 μ L
dNTP (2.5 mM each)	1.6 μ L
PrimeStar GXL polymerase	0.8 μ L
Total	18.0 μ L

- 3) PCR 用チューブあるいはプレートのウェルに、上記の反応液を 18.0 μ L ずつ入れる。
- 4) 100 倍希釈した 1st PCR 産物を 2.0 μ L/ウェル添加する。

5) 遠心機でスピンドウンし、下記のとおり PCR 反応を行う。

98°C,	10 sec	25 サイクル
98°C,	10 sec	
55°C,	15 sec	
68°C,	20 sec	
68°C,	3 min	
4°C,	∞	

6) 得られた 2nd PCR 産物について、1.5%程度の濃度のアガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドや SYBR Gold 等で染色し、増幅産物のサイズを確認する。

7) 下表に従い、VP7 遺伝子型を判定する。

VP7 遺伝子型 (G type)	2nd PCR 産物 サイズ (bp)
G1	636
G2	532
ヒト G3	124
ウマ様 G3	176
G4	455
G8	754
G9	327
G12	264

6. ロタウイルスのシーケンス解析

「4.2.2. ロタウイルス遺伝子の定量」において、ロタウイルス遺伝子の定量値が 1.0×10^4 コピー以上となった検体について、その RNA サンプル 10 - 20 μL を国立感染症研究所（村山庁舎）ウイルス第二部第一室に送付（冷凍）する。

国立感染症研究所ウイルス第二部第一室は、その検体についてロタウイルスのシーケンス解析を実施し、その結果を各自治体に通知する。

リアルタイム PCR 用標準品の供給先（連絡先）

- ・ノロウイルス（下痢症ウイルス）レファレンスセンター
（ロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルスの各標準品の請求先）
メールアドレス：novrefctr@nih.go.jp
- ・ロタウイルスおよびサポウイルス標準品作製担当
国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室
室長 染谷雄一
メールアドレス：someya@niid.go.jp
- ・ノロウイルス標準品作製担当
国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター第五室
室長 岡本貴世子
メールアドレス：k-okmt@niid.go.jp
- ・ロタウイルス感染症流行予測調査担当者
国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室
主任研究官 藤井克樹
メールアドレス：fyoshiki@niid.go.jp
- ・感染症流行予測調査事業担当者
国立感染症研究所 感染症疫学センター第十一室
室長 新井智
メールアドレス：yosoku@nih.go.jp

感染症流行予測調査検査術式 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)

1. COVID-19 の血清学的検査に関する注意事項

1. SARS-CoV-2 のウイルスストック作製および血清学的検査のウイルス液使用時は BSL3 実験室で実施する。
2. COVID-19 患者血清には感染性 SARS-CoV-2 が含まれている可能性がある。血清検体は、抗体検出時の非特異的反応を減弱させるため検査前に 56°C、30 分の加熱処理を行うが、この操作により SARS-CoV-2 の感染性は 1 万分の 1 以下に低下する。ただし、熱処理により血清中のウイルスが完全に不活化されない可能性もあるので、加熱処理後も安全キャビネット内で取り扱う。
3. 作業者の安全確保のため、下記の个人防护具(PPE)を装着する。全ての PPE は実験および検査ごとに交換し、オートクレーブ処理を施すこととする。
 - ・ 二重の手袋
 - ・ ディスポーザブルガウン
 - ・ キャップ
 - ・ N95 マスク(もしくはその同等品)
 - ・ 防水性アームカバー

2. 検体の採取・輸送

1. 検体の採取

COVID-19 感染症の血清学的検査のための検体には、血清あるいは血漿が有用である。ただし、ヘパリン処理済み血漿は非特異反応が報告されていることから、血漿を得るための凝固阻止剤にはヘパリン処理はなるべく避ける。

2. 検体の輸送

血清または血漿は-70°C 以下(ない場合は通常の-20°C)の冷凍庫で保存し、ドライアイスを用いて冷凍したまま輸送する。ドライアイスは密閉した容器に入れないこと。詳細は、「2019-nCoV(新型コロナウイルス)感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」(国立感染症研究所 HP)最新版を参照のこと。

3. ウイルスストックの作製

ウイルスの感染実験はBSL3実験室で行う。Vero E6/TMPRSS2 細胞はSARS-CoV-2 の分離に適しており(Matsuyama S et al., 2020)、感染・増殖効率が高い。また、感染後の細胞変性効果で完全に細胞が剥離するためTCID₅₀によるウイルス力価測定が可能である。

準備

1. 細胞と培養液

- Vero E6/TMPRSS2 細胞(JCRB1819 VeroE6/TMPRSS2、JCRB 細胞バンク)を使用する。
- 細胞培養には、**細胞増殖培地(DMEM (low glucose) with 10% FBS, 1 mg/ml Geneticin G418, Penicillin (100 unit/ml), and Streptomycin (100 µg/ml))**を使用する。
- ウイルスの希釈等には**維持培地(DMEM (low glucose or high glucose) with 2% FBS, Penicillin (100 unit/ml), and Streptomycin (100 µg/ml))**を使用する。
- ウシ胎仔血清(FBS)は56°C、30分処理による熱非働化されたものを使用する。

2. ウイルス

- ウイルスはSARS-CoV-2 JPN/TY/WK-521株を使用する。

3. 試薬・機材

- PBS
- CO₂ 培養器(37°C、5%CO₂)
- 細胞培養用カルチャーボトル
- ピペッター、チップなど

操作

- 1) 細胞培養用カルチャーボトル等に単層培養されたVero E6/TMPRSS2 細胞を準備する。
- 2) 細胞をPBS で一回洗浄し、維持培地を加える。
- 3) ウイルス液(multiplicity of infection, m. o. i.を0.01から0.1)を接種し、37°CのCO₂培養器内で1時間吸着させる。
※例 m.o.i.が0.1の場合、 2×10^7 細胞数/T225フラスコに 2×10^6 TCID₅₀のウイルス液を接種する。
- 4) 吸着反応後、維持培地を交換し、37°CのCO₂培養器内で静置培養する。
※例 T225フラスコに45mlの維持培地で培養する。
- 5) 感染24時間後にCPEを確認し、細胞培養上清を回収する。
- 6) 培養上清を分注し、-70°C以下に凍結保存する。
- 7) ウイルスストックのTCID₅₀を測定し、試験毎に新しいストックを使用する。

4. 微量中和試験による血清学的検査

中和試験は感染性 SARS-CoV-2 を用いるため、BSL3 実験室で行う。細胞浮遊液を用いた巻き込み法で行う。

準備

1. 細胞と培養液

- ・ 細胞は、Vero E6/TMPRSS2 細胞(JCRB1819 VeroE6/TMPRSS2, JCRB 細胞バンク)を使用する。
- ・ 血清・ウイルスの希釈および細胞浮遊液の調整には維持培地を使用する。

2. ウイルス

- ・ ウイルスは SARS-CoV-2 JPN/TY/WK-521 株を使用する。
- ・ 試験毎に新しいウイルスストックを使用する。

3. 参照抗血清

- ・ 国立感染症研究所で調製した参照抗血清を用いる。参照抗血清の中和抗体価は別添を参照する。

4. 試薬・機材

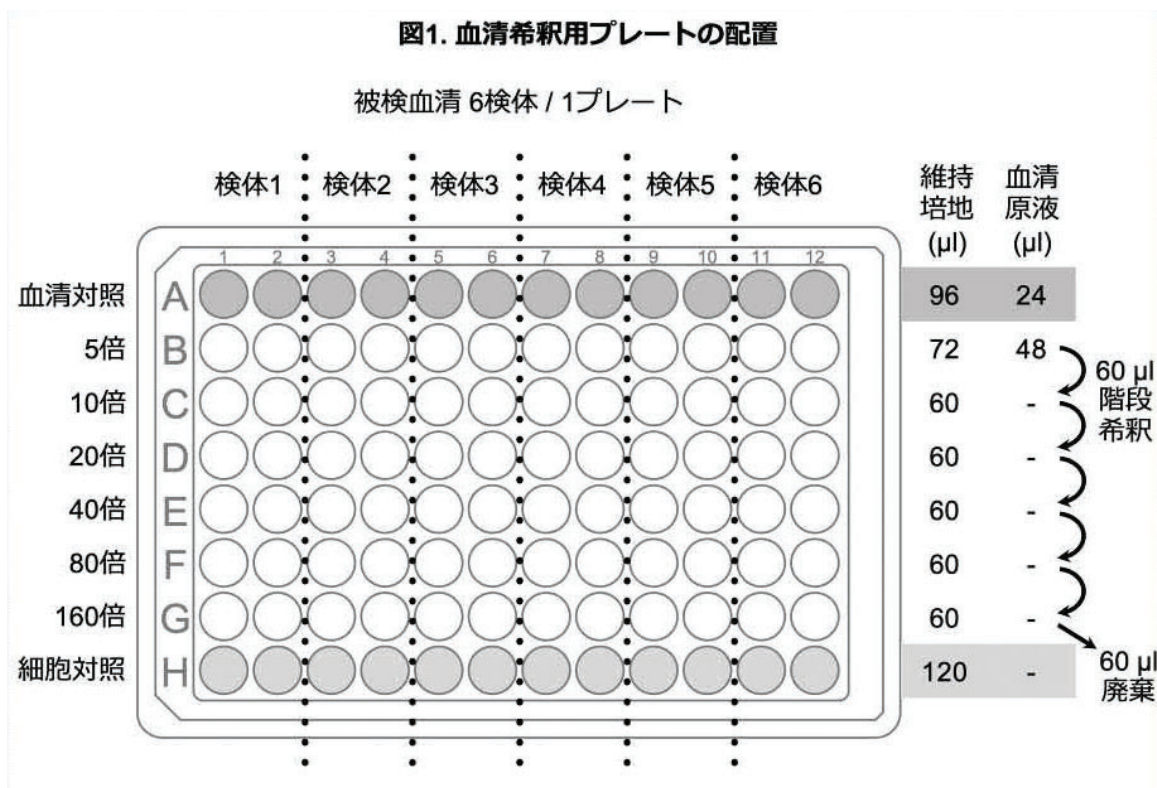
- ・ 20%ホルマリン
- ・ クリスタルバイオレット染色液
- ・ CO₂ 培養器(37°C、5%CO₂)
- ・ 96 ウェルマイクロプレート(丸底と平底)
- ・ 15 ml もしくは 50 ml のプラスチックチューブ
- ・ マルチチャンネルピペッター、ピペッター、チップなど

操作

1. 血清希釈用プレートの調整 (BSL2 実験室)

- ・ 血清希釈用プレートは、丸底の 96 ウェルマイクロプレートを用いて下図1のように配置する。
- ・ 被検血清の対照としてウイルス液を接種しないウェルを準備する(最終希釈倍率 5 倍のみ)。
- ・ 細胞対照として血清を接種しないウェルも準備する。

- 1) 【血清対照の調整】 A 行の各ウェルに維持培地 96 μl を分注し、血清原液 24 μl を 2 ウェルずつ加える。
- 2) B 行の各ウェルに維持培地 72 μl を分注し、血清原液 48 μl を 2 ウェルずつ加える。
- 3) C 行から H 行の各ウェルに維持培地を 60 μl 分注する。
- 4) 12 チャンネルピペッターを用いて B 行から G 行まで 60 μl ずつ被検血清を 2 倍階段希釈する。チップは希釈行ごとに交換する必要はない。

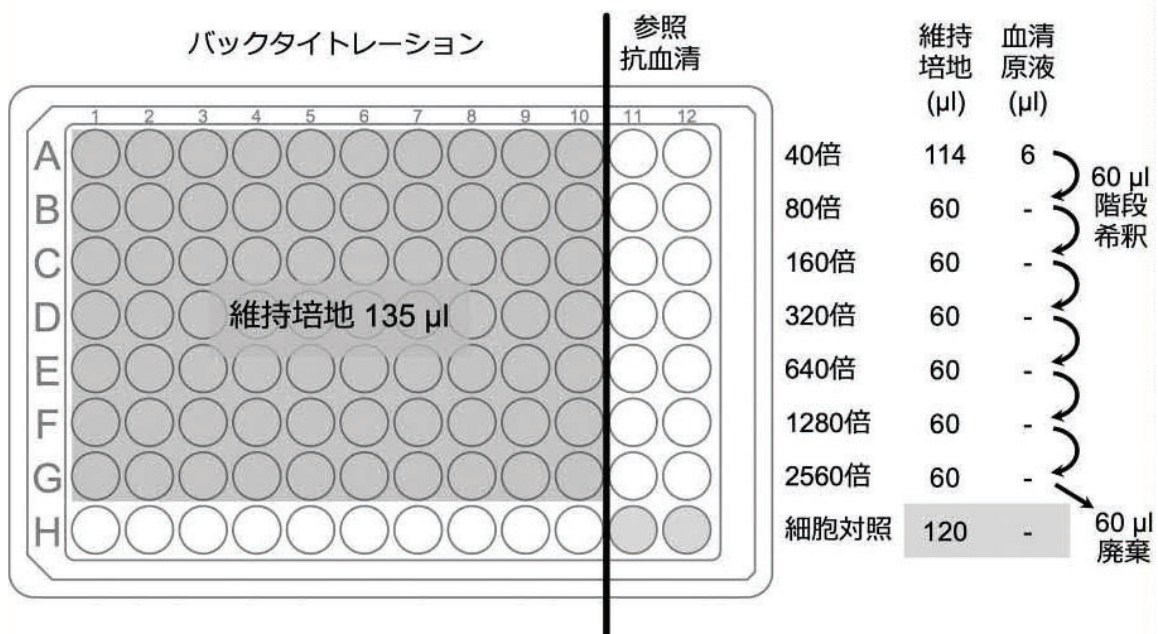


2. バックタイトレーション用プレートの調整 (BSL2 実験室)

バックタイトレーション用プレートは、下図 2 のように配置する。参照抗血清は 20 倍から 1280 倍に希釈する(最終希釈倍率は 40 倍から 2560 倍)。

- 1) 参照抗血清での中和測定用ウェルの A 行には、維持培地 114 μ l を分注し、参照抗血清 6 μ l を加える。B 行から G 行までの各ウェルに維持培地を 60 μ l 分注する。
- 2) B 行から G 行まで 60 μ l ずつ参照抗血清を 2 倍階段希釈する。チップは希釈行ごとに交換する必要はない。
- 3) バックタイトレーション測定用の A 行から G 行の各ウェルに、維持培地を 135 μ l 分注する。

図2. バックタイトレーション用プレートの配置



3. 細胞浮遊液とウイルス希釈液の調整 (BSL2 実験室)

- 1) VeroE6/TMPRSS2 細胞を準備する。フラスコから細胞を剥がし、細胞浮遊液とする。およそ 1×10^5 細胞数/ml となるように調整する。(例 1 プレート/T25 フラスコ)

4. ウイルス希釈液の調整と添加 (BSL3 実験室)

- 1) 維持培地を用いて 100 TCID₅₀/50 μl のウイルス液を調整する。
- 2) 血清希釈用プレートの B 行から G 行の全ウェルと参照抗血清の中和測定用ウェル A 行から G 行に、100 TCID₅₀/50 μl のウイルス液を 60 μl 加える(図 3、図 4)。
- 3) バックタイトレーション用プレートの H 行の各ウェル(参照抗血清用の 11 列と 12 列は除く)に 100 TCID₅₀/50 μl のウイルス液を 150 μl 加える(図 4)。
- 4) バックタイトレーション用プレートの H 行から A 行までウイルス液の 10 倍階段希釈(135 μl の維持培地に 15 μl の各希釈ウイルス液を添加)を作製する。チップは希釈行ごとに交換する。
- 5) 37°C で 1 時間反応させる。被検血清の最終希釈濃度は 5 倍から 160 倍となる。

図3. 血清希釈用プレートへのウイルス液添加

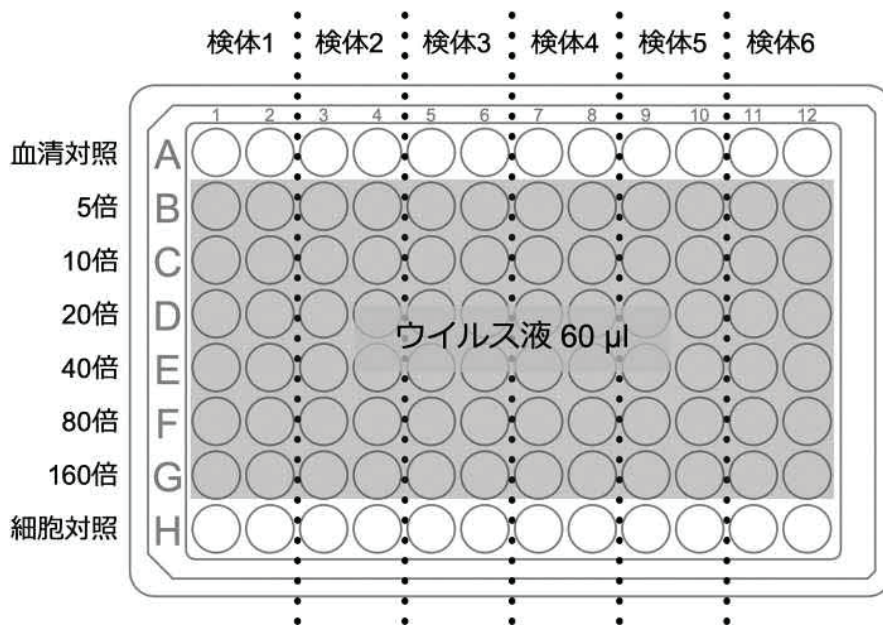
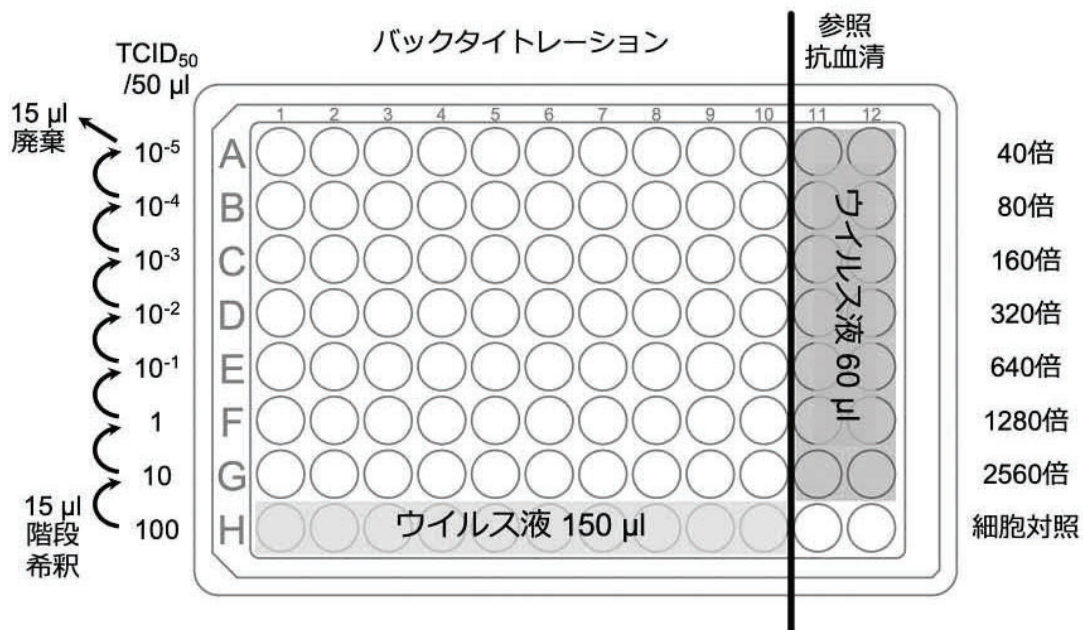


図4. バックタイトレーション用プレートへのウイルス液添加と階段希釈

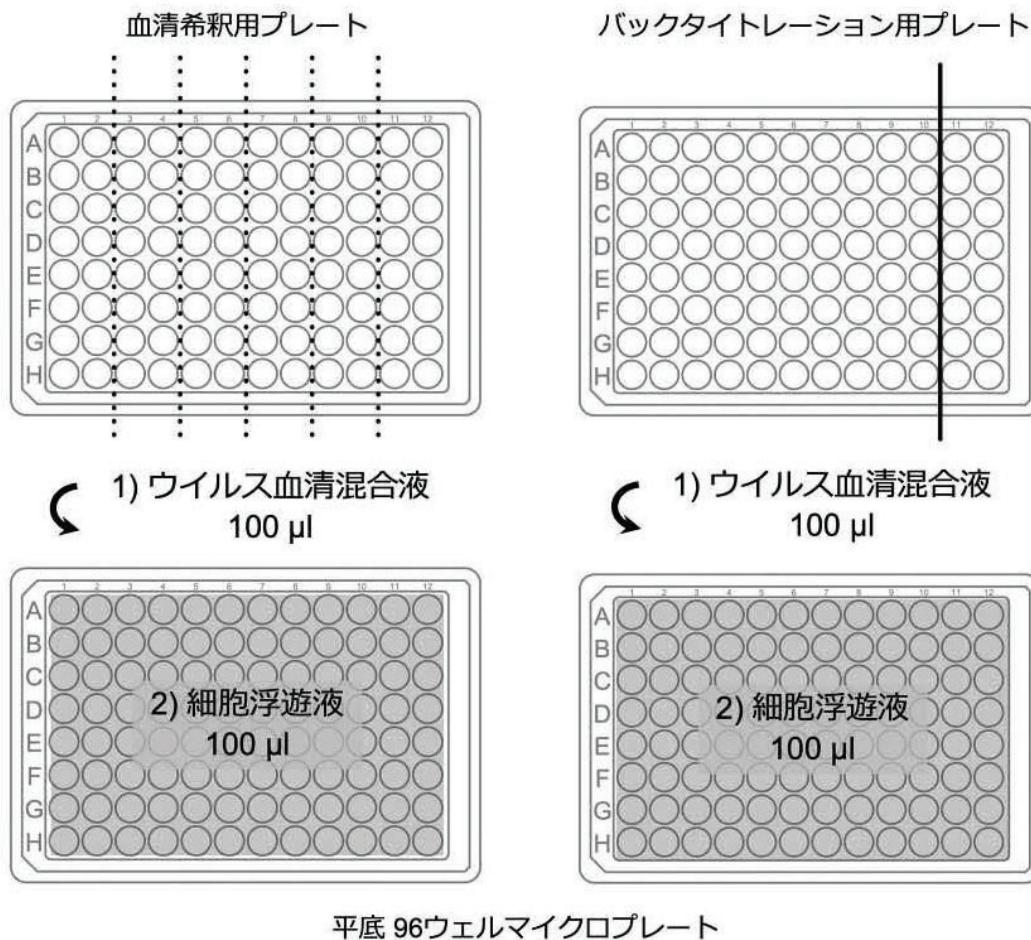


5. 細胞とウイルス血清混合液の添加 (BSL3 実験室)

下図 5 のように細胞を添加する平底 96 ウェルマイクロプレートを用意する。

- 1) 平底 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 1 時間反応後のウイルス血清混合液を 100 μ l 移す。
- 2) 上記のプレートの各ウェルに VeroE6/TMPRSS2 細胞浮遊液 (1×10^5 細胞数/ml) を 100 μ l 加える。
- 3) 37°C の CO₂ 培養器内で 5-6 日間培養する。

図5. 細胞とウイルス血清混合液添加



6. 観察と固定 (BSL3 実験室)

- 1) 培養後、各ウェルの細胞変性効果 (CPE) の有無について倒立顕微鏡を用いて観察し、判定を行う。
- 2) ホルマリン固定 (室温 30 分以上、一晩でも可) する。

7. 染色と判定 (BSL2 実験室)

- 1) クリスタルバイオレット染色液で染色 (10 分以上)・水洗後、判定の再確認を行う。
- 2) ウイルス液を被検血清と混合させることにより CPE が抑えられている場合には中和抗体陽性と判定する。2 ウェルで実施した場合は 2 ウェル CPE 阻止 (ウェル内の約 5 割以上の細胞が生残している) の最高希釈倍数を中和抗体価とする。4 ウェルで実施した場合は 2 ウェル以上で CPE 出現が抑制された最高希釈倍数を中和抗体価とする。

8. 再検査

- ・ 参照抗血清の抗体価が期待値の 4 倍以上又は 1/4 倍以下の時にも再検査を行う。ただし、くりかえして同じ結果が得られたときは、この成績を最終結果とする。
- ・ 2 ウェルで実施した場合に最小希釈血清 (5 倍) で 1 ウェルのみ CPE が出現した検体については 4 ウェル実施で再検査とする。
- ・ 血清対照に細胞毒性が観察された検体については 4 ウェル実施で再検査とする。
- ・ バックタイトレーションの成績が 32~320 TCID₅₀/50 µl から外れているときは、ウイルス希釈が誤っている可能性があるので再検査を検討する。

9. 検査結果

NESID から入力可能な中和抗体価データは、< 5, 5, 10, 20, 40, 80, ≥160 である。

参考文献

- 1) SARS 診断マニュアル (<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/SARS-manual.pdf>)
- 2) Matsuyama S *et al.*, Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020. 117:7001-7003.
- 3) Kumar M *et al.*, Inactivation and safety testing of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol Methods.* 2015. 233:13-18

参考資料19 新型コロナウイルス環境水調査フロー

採水

下水処理場等*にて処理前下水（流入下水）約0.1～0.5 Lを採水
採水頻度は週1回以上とする**

* ポリオ環境水調査と同時に採水してもよい ** 施設の調査体制にを踏まえて月二回でも差し支えない

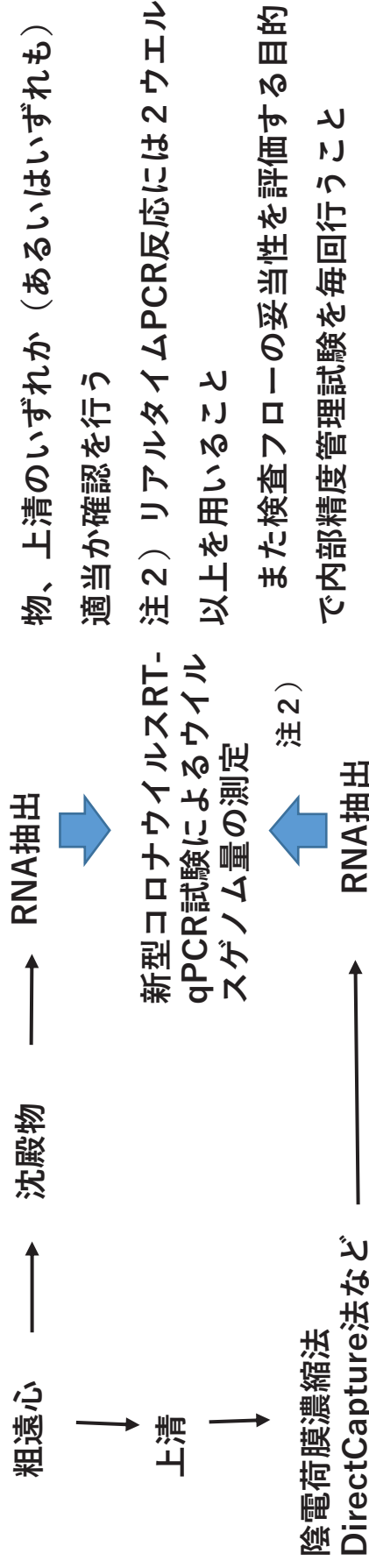
輸送

冷蔵輸送（4～8℃）

検査

検査頻度は少なくとも月1回以上実施。検体が実験室に搬入後、すぐに検査を行わない場合は
冷凍保管（-30℃）する

注1)



注1) 事前の調査を通じて検査材料に沈殿物、上清のいずれか（あるいはいずれも）適当か確認を行う

注2) リアルタイムPCR反応には2ウエル以上を用いること

また検査フローの妥当性を評価する目的で内部精度管理試験を毎回行うこと

例1) プロセスコントロールとしてトウガラシ

微斑ウイルス（PMMoV）の測定

例2) φ6、疑似ウイルス粒子（VLP）などを用いた添加回収試験

報告

週1回～月1回の頻度で結果等報告

- ・ 新型コロナウイルスゲノム量（GC/L）及び妥当性評価試験結果
- ・ 処理場周辺の定点当たり新型コロナウイルス感染症報告数

参考資料 20

感染症流行予測調査検査術式_下水中の新型コロナウイルス (COVID-19) ゲノム検出

1. 新型コロナウイルス環境水調査の概要

新型コロナウイルス感染者から排出されるウイルスはだ液など気道由来分泌物、糞便に含まれ、下水を介して下水処理場に集積する。

このため本調査では下水処理場などを定点とし、定期的に流入下水を採水、下水中の新型コロナウイルスゲノムの定量検査を行い、下水中のウイルスゲノムの増減を調査する。得られた新型コロナウイルス量は、地域の新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の定点当たり報告数と比較し感染動向を把握するための補完情報として活用する。

2. 検査の進め方

(1) 調査地点の設定

定点となる下水処理場等* (処理区の人口は 10 万人から 80 万人程度、下水普及率 7~8 割を目安) を少なくとも 1 箇所選定する (人口が多い都道府県では複数個所の処理場を選定して調査することも考えられる)。なお、ポリオ感染源調査 (環境水調査) を行っている場合は同じ地点で差し支えない。

新型コロナウイルス感染症の感染動向を把握するため、下水処理場の処理区の行政単位を含む 1 ないし複数の保健所管内の患者定点を含むよう採水地点を選定する。

* 下水処理場を選定困難な場合は中継ポンプ場を採水地点として選定してもよい。

(2) 採水頻度と輸送

毎週 1 回、少なくとも毎月 2 回の頻度で流入下水 (0.1~0.5L 強) を採取する。即日検査を行わない場合は、凍結保存する (-30℃)。

採取した下水試料は実験室へ冷蔵 (4~8℃) あるいは冷凍輸送する。

(3) 新型コロナウイルス RNA 精製方法とウイルスゲノム検出

下水固有の要因がウイルス検査結果に影響することが知られており、調査対象の処理場ごとに手法の至適化が必要となる。下水の特性に基づき、様々な検査手法が提案されており、あらかじめ複数の検査手法の条件検討を行い、下水濃縮方法、ウイルス RNA 抽出法を選択することが必要である。このため、下水調査は全国的に統一的な手法で検査を行うことは困難である。加えて、下水試料自体が均一な検査試料ではなく、新型コロナウイルスの場合は下水中の固形分に吸着しやすいことが知られており、同一試料を用いても検査結果にばらつきがみられるのが通常である。従って、得られた下水中ウイルスゲノム量を、他の地域で実施した結果と比較することは適当でなく、調査対象となる下水処理場への流入下水中のウイルス量と定点当たり報告数の増減を比較し地域の感染動向を評価するために用いる。

このように、下水中の新型コロナウイルス検査結果には変動要因を含むため、検査ごとに検査フローの妥当性を評価することが求められる。妥当性試験には野菜などの食品を介し糞便に含まれるトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) の測定、 $\phi 6$ や疑似ウイルス粒子 (VLP) 添加による回収試験等が提案されているが、いずれも新型コロナウイルスの下水中の挙動とは異なるため、データの標準化は行わず、実測値を併記し検査フロー評価の目安とする。

(4) 作業上の注意

通常の実験室では複数の検体を処理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけるためにも、あるいは実験者への感染を防ぐためにも、検体の取り扱いには充分注意を払わなければならない。

このため、流入下水を用いた検査はクラス 2 の安全キャビネットを使用することが望ましい。

下水中の新型コロナウイルスゲノム量はヒト臨床検体に比べ、少量の場合が多く、臨床材料を用いる検査室では交差反応防止のための措置を講ずること。

3. 検査方法

(1) 採水

ア. 準備するもの

採水用ボトル (0.5 L 程度の容量)、保冷容器 (採水ボトルが入るもの)

イ. 作業

定点となる下水処理場は目安として人口 10~80 万人 (下水道普及率 7~8 割) を対象とする。毎週 1 回、少なくとも月 2 回の頻度で流入下水 (0.1~0.5 L 強を目安) を採取し、実験室などへ輸送 (4~8℃) する。即日検査を行わない場合は-30℃で保管する。

(2) 下水中のウイルス RNA 精製

新型コロナウイルスゲノム検出に用いる RNA を下水から精製するために、本術式では、流入下水を粗遠心後に得られる上清を用いた場合の 1) 陰電荷膜濃縮法、2) 沈殿物を用いた沈殿物抽出法を紹介する。他にも市販の商業キットが利用できるため、各マニュアルを参照すること。いずれの方法もあらかじめウイルス回収試験 (φ6 や VLP 等をマーカーとして下水試料へ添加) を実施し手法の選択をすることが望ましい。また、採水を行う地点における PCR 反応阻害剤などの下水固有の要因がウイルスゲノム回収効率に影響することが知られているため、あらかじめ採水地点で採水した流入下水試料を用いて比較を行い、ウイルス RNA 抽出法を選択すること。なお、採水量、精製後に得られる RNA 量及び定量 PCR 試験に用いる RNA 量の組み合わせで、理論上の検出下限値は異なることに留意する。

1) 粗遠心後の上清画分をもちいた陰電荷膜濃縮法によるウイルス RNA 精製法

ポリオウイルスなどの場合、流入下水を粗遠心後得られる上清画分に塩化マグネシウムを加え酸性に調整することで、陰電荷膜に吸着しやすい性質がある。次に、中性から弱アルカリ性の溶出液を用いて膜に吸着したウイルスを回収することで濃縮を行う。同様に他の腸管系ウイルスでも本法を用いた調査が報告されている。

なお、エンベロープウイルスである新型コロナウイルスはポリオウイルスなどの非エンベロープウイルスとは下水中の挙動が異なることが予想され、多くの場合下水中の固形物を含む沈殿画分からウイルスゲノムの検出率が高いことが報告されている。しかし、処理場の特性によっては、上清画分の新型コロナウイルスゲノム検出率が高い場合も明らかになったため、本法も術式として紹介する。

ア. 準備するもの

試薬

3% ビーフ液、2.5 M MgCl₂ 溶液、0.5 N HCl

消耗品

攪拌子入りガラスビーカー (500mL, 1,000mL) (滅菌済み)、50mL 遠心チューブ (滅菌済み)、15mL 遠心チューブ (滅菌済み)、2mL チューブ (滅菌済み)、ハサミ (滅菌済み)、ピンセット (滅菌済み)、ピペット (10, 50mL) (滅菌済み)、ペトリディッシュ (滅菌済み)、シリンジフィルター (0.45μm)、pH 試験紙 (または pH メーター)、50~100mL ディスポーザルシリンジ、グラスファイバーフィルター (1μm) (必要に応じて粗遠心後に使用)

ウイルス濃縮用ろ過資材

プラスチックホルダー (参考: アドバンテック PP47)、混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜 (参考: アドバンテック A045A047A, 孔径 0.45μm、サイズ 47mm)、50-100 ml ディスポーザルシリンジ

準備

3% ビーフ液

ビーフエキストラクト 3g を 100mL の滅菌水に溶解しオートクレーブ滅菌 (121℃, 20 分) する。

2.5M MgCl₂ 溶液

塩化マグネシウム（6水和物）50.8gをミリQ水に溶解し100mLに調整。オートクレーブ滅菌（121°C, 20分）する。

0.5N HClを準備する。

フィルターの準備

プラスチックホルダーに混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜を装着しアルミホイル等で覆い、オートクレーブ滅菌（121°C, 20分）後、乾燥させる。

注）シリンジ濃縮の場合100ml当たり、フィルター1枚を使用。500mlならフィルターを装着したホルダーを3～5組程度使用。

イ. 操作

- ① 流入下水試料を50mlチューブ等を用いて粗遠心（3000rpm、30分、4°C）。
- ② 上清（500ml）を滅菌済みビーカーに移す。
（注釈）上清に濁りがみられる場合、グラスファイバーフィルター（1µm）を用いて微粒子を除去する工程を加える。
- ③ ビーカーをマグネシウムスターラー上に攪拌子とともに設置。
- ④ 2.5 M MgCl₂ 溶液 10 ml 添加（最終濃度 0.05 M）し攪拌。
- ⑤ 0.5 N HCl を用いて、攪拌しながら pH3.5 に調整。
- ⑥ 試料を加圧ろ過装置にてろ過。あるいは50～100 ml シリンジでろ過（ろ過液は滅菌を行う）。
- ⑦ フィルターホルダーよりフィルター回収。
- ⑧ 滅菌済みペトリ皿上にフィルターを移し、ピンセットとはさみでフィルターを裁断。50 ml チューブ中に回収。
- ⑨ フィルター片を入れたチューブへ3% beef extract を 10 ml を加える（50倍濃縮）。
（注釈）誘出液量を変えることで濃縮倍率を変更可能である。
- ⑩ 1-3分間ボルテックスミキサーで攪拌。
（注釈）下水の水質、ウイルス種、器具の出力パワーによって攪拌時間は異なるため、事前に処理時間1-5分の間で処理時間による目的とするウイルスの回収率を確認しておいた方がよい。
- ⑪ 上清を新たな50mlチューブ（1回目誘出）に回収。
- ⑫ 3% beef extract を 10 ml、元のチューブの沈さに加える。
- ⑬ 1-3分間ボルテックスミキサーで攪拌。
- ⑭ 上清を50mlチューブに回収（2回目誘出）。

（注釈）2回誘出を行うことでウイルス回収率が向上する。またフィルターに吸着した共存物質も除去され、フィルターの色が白くなっていく。
- ⑮ 1回目、2回目の誘出液を入れたチューブを3000rpm（15min、4°C）で遠心。
- ⑯ 上清を各々0.45µmシリンジフィルターにてろ過。
（注釈）タンパク質の吸着量が少ないフィルターを用いる。
- ⑰ ろ過液を保管用チューブ（セラムチューブ等）に使用するまで保管（-20°C）。
- ⑱ 市販の商業キットを用いてウイルスRNA抽出を行う。

2) 下水中の沈殿物など固形物からのウイルスRNA精製法

新型コロナウイルスは下水中の固形物に吸着しやすい性質が報告されている。本術式では流入下水を粗遠心し、得られた沈殿物からウイルスRNAを精製する手法を紹介する。なお、粗遠心後の上清画分から直接カラム精製する DirectCapture 法 (参考:プロメガ Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit、Cat.# A2991) 他も用いることができる。

下水中のウイルスRNA検出用の様々な商業キットが利用でき、各マニュアルを参照すること。いずれの方法も (4) を参考に偽陰性防止のための内部精度管理試験を行うこと。

なお、処理する試料の容量が新型コロナウイルス検出時の検出下限値に影響することに留意する。また、沈殿物等の固形物にはPCR阻害物質も含まれPCR反応を阻害する可能性があることを考慮し、調査対象の処理場ごとに事前に手法を検討することが望ましい。

RNeasyPower Soil Total RNA Kit を用いた沈殿物からのRNA抽出

本術式では流入下水を粗遠心後に得られる沈殿物からRNA抽出する場合、RNeasy Power Soil Total RNA Kit を用いた方法を参考例として紹介する。

ア. 準備するもの

試薬・消耗品

土壌など固形物からのRNA抽出キット (参考: RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (QIAGEN) Cat. no. 12866-25)、ピペット (20 µL-1,000 µL)、ディスポザブルピペット (1 mL and 10 mL)、RNase-free gloves、RNase 除去用のラボクリーナー、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液

機器、器具

15mL チューブを利用可能な遠心分離機 (2,500 x g minimum)、マイクロ遠心分離器 (13,000 x g)、Heat block set at 45°C (オプション)、ボルテックスミキサー (参考: Vortex-Genie® 2)、ボルテックスアダプター4 (15 mL) チューブ用 (Cat. no. 13000-V1-15)

準備

粗遠心を行い、静置後上澄みを除く。

イ. 操作

- ① 試料 (最大 2 g) を 15mL PowerBead Tube (付属) に入れる。
- ② 2.5 mL の PowerBead Solution、0.25 mL の Solution SR1、0.8 mL の Solution IRS を追加。
- ③ 3.5 mL のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液 (pH 6.5~8.0) を追加。
PowerBead Tube にフタをしてボルテックスし、層が消えるまで混合。
- ④ PowerBead Tube をボルテックスアダプターに置き、最高速度で 15 分間ボルテックスする。
- ⑤ PowerBead Tube を取り外し、2,500 x g で 10 分間遠心する。
- ⑥ 上部の水相 (中間相と下部のフェノール層を避ける) を清潔な 15 mL Collection Tube に移し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液を捨てる。
- ⑦ 1.5 mL の Solution SR3 を水相に加え、ボルテックスして混合する。2~8°C で 10 分間インキュベートし、室温で 2,500 x g で 10 分間遠心する。

- ⑧ ペレット（存在する場合）を乱さないようにして、上清を新しい 15 mL Collection Tube に移す。
- ⑨ Collection SR の上清に 5 mL の Solution SR4 を加え、転倒またはボルテックスして混合する。室温で 30 分間インキュベートする。
- ⑩ 2,500 x g で 30 分間遠心する。
- ⑪ 上清をデカントし、15 mL の Collection Tube をペーパータオルの上で 5 分間反転する。
- ⑫ Solution SR5 を振って混合し、1 mL を 15 mL Collection Tube に加える。繰り返しピペティングまたはボルテックスすることにより、ペレットを完全に再懸濁する。
注：ペレットの再懸濁が困難な場合は、チューブをヒートブロックまたは 45°C のウォーターバスに 10 分間入れ、ボルテックスする。ペレットが再懸濁するまで繰り返す。
- ⑬ RNA 分離サンプルごとに 1 つの JetStar Mini Column（付属）を準備する。
 - ⑬a 15 mL コレクションチューブ（付属）のキャップを外し、その中に JetStar Mini Column を置く。カラムが Collection Tube にぶら下がる。
 - ⑬b JetStar Mini カラムに Solution SR5 2 mL を追加する。重力でカラムに流し、15 mL の Collection Tube に集める。注：RNA 分離サンプルをロードする前にカラムを乾燥させないこと。
- ⑭ ステップ 12 の RNA 分離サンプルを JetStar Mini Column に加え、カラムを介して 15 mL Collection Tube に重力で流し込む。
- ⑮ 1 mL の Solution SR5 を JetStar Mini Column に加え、15 mL Collection Tube に完全に自然落下させる。
- ⑯ JetStar Mini Column を新しい 15 mL Collection Tube（付属）に移す。Solution SR6 を振って混合し、JetStar Mini Column に 1 mL を加えて、結合した RNA を溶出する。Solution SR6 を 15 mL Collection Tube に自然落下させる。
- ⑰ 溶出した RNA を 2.2 mL Collection Tube（付属）に移す。Solution SR4 を 1 mL 加える。少なくとも 1 回転倒混和し、-15°C から -30°C で最低 10 分間インキュベートする。
- ⑱ 2.2 mL Collection Tube を 13,000 x g で 15 分間遠心して、RNA をペレット化する。
- ⑳ 上清をデカントし、2.2 mL Collection Tube をペーパータオルの上に 10 分間置き、ペレットを風乾する。
- ㉑ RNA ペレットを 100 μ l の Solution SR7 で再懸濁する。
- ㉒ 100 μ l を使用するまで保管（-80°C）。

(3) 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) ゲノムの検出方法

新型コロナウイルスはRNAウイルスであるため、比較的ゲノム上で塩基置換が起こりにくいN1,N2領域等を対象とするプライマー、プローブ系を用いた検出を行う。本領域を検出する様々な商業キットが利用できるが、検出領域や検出感度が異なることに留意する。また、変異株の流行状況を踏まえて、プライマー、プローブ配列の柔軟な変更を念頭におく必要がある。

このように、RNA精製手法、キット間の感度の違いが存在するため得られた測定値は、当該処理場固有の定量値であり、他の調査地点の測定結果と比較する場合は解釈に注意が必要である。

また、感染者数が少ない段階では下水中のウイルス量も少ない。偽陰性を防止するため、PCR反応の精度管理にISO標準コントロールを用いて定期的な内部精度管理を実施することが望ましい。

本術式では参考としてN1,N2を同時に測定するduplexリアルタイムPCR法による検出手法を参考までに示す。

duplex リアルタイムPCR法によるN1,N2の領域の検出方法

ア. 準備するもの

試薬・消耗品

新型コロナウイルス検出キット (参考: TaKaRa RC300A SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit)、ピペット (10 µL-1,000 µL)、同左用フィルター付きチップ、1.5ml チューブ、96 穴プレート、プレートシーラー

器具

リアルタイムPCR装置 (参考 ABI7500fast 他)、マイクロ遠心分離器 (13,000 x g)

イ. 操作

陽性コントロールの希釈

キット付属の陽性コントロール (参考: Positive Control RNA (US N1/N2)、あるいは同等品) を希釈 (用時調製)。

10⁷ストックから100倍希釈で10⁵、以下、EASY Dilution 45 µL で10⁰まで段階希釈10³, 10², 10¹, 10⁰の4つを5 µL ずつ陽性コントロールとして使用 (5 x 10³~5 x 10⁰)。

反応液の調製

(参考) SARS-CoV-2 Realtime RT-PCR (CDC N1N2)

クリーンベンチ内で調製 (1 サンプルにつき 40 µL、2 穴以上を用いて測定)

40 µL x (サンプル+陰性+陽性コントロール+ α ^{注釈})

(注釈) サンプル分 (あるいは全体の10%) 余分に作成しておくことよい。

試薬	容量 (µL)	1 サンプル当たりの調整量 (µL)
RT-qPCR Mix (2×)	10	20
Primer/Probe mix (SARS-CoV-2) (10×)	2.0	4.0
ROX Reference Dye/Dye II* (50×)	0.4	0.8

RNase free Water	2.6	5.2
Template RNA	5	10
Total 容量	20	40

Template を除いた pre-mixture (30 μ L x 必要数) を調製し、プレート分注後にRNAを加える

(参考) ABI 7500 Fast による検出例

- ① ABI 7500Fast を起動
- ② PC 起動、USER/PASS 入力、7500 software 起動、login as guest
- ③ Advanced Setup
- ④ 検査名入力 (例 SC2_yymmdd_名前)
- ⑤ 7500 Fast (96 well、Quantitation - standard curve、TaqMan reagent)
- ⑥ Standard (~2hrs to...) に変更
- ⑦ Plate Setup
- ⑧ Define Target で add new target して Assay, Target, Reporter を入力
SC2_NIID は FAM, SC2_CDCN1N2 は Cy5、Quencher は両方とも none
- ⑨ Define Samples で必要なサンプル数まで add new sample してサンプル名入力
- ⑩ Assign Targets and Samples
- ⑪ Passive reference は ROX (TaKaRa 製品 ROX Reference Dye II 使用)
- ⑫ View Plate Layout ワークシートに基づいて assign 設定
- ⑬ 陰性コントロール”N”、陽性コントロール”S”、サンプル”U”を設定、S はコピー数入力
- ⑭ “U”には step9 で入力したサンプル名を選択
- ⑮ Run Method (Standard mode)

50 °C	30 min		
95 °C	15 min		
95 °C	15 sec		45 cycles
60 °C	60 sec	Data Collection	

※参考：イ.操作 反応液の調製で示したキット (参考) での推奨条件は以下のとおり。

52 °C	5 min		
95 °C	10 sec		
95 °C	5 sec		45 cycles
60 °C	30 sec	Data Collection	

- ⑯ START RUN をクリック。ファイルの保存 (自分のフォルダ→日付フォルダ作成)
 - ⑰ Estimated Time Remaining が表示されれば OK
- 約 3 時間で RUN は完了するので右上の”X”をクリックしファイルをセーブ (Yes)

(4) 新型コロナウイルス検査の内部精度管理試験

下水中のウイルス調査では、下水固有の生物学的、化学的に複雑な要因を加味し結果を解釈する必要がある。即ち、こうした要因はPCR反応阻害やRNA抽出効率など、検査結果に影響を及ぼすことが知られており、測定値の解釈は、検査結果の妥当性を総合的に判断することが望ましい。従って、検査毎に検査結果の妥当性を評価することを目的として、糞便中に含まれるトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) をマーカーとするプロセス評価試験、あるいは疑似ウイルス粒子 (VLP) やφ6添加によるウイルス回収試験測定を通常行う。

なお、新型コロナウイルスは下水中では固形物に吸着していると想定され、下水中の挙動を正確に反映しているわけではないため、本術式ではPMMoV検出試験、非感染性の疑似ウイルス粒子 (Virus-like particle: VLP) を用いた添加回収試験の例を内部精度管理試験として例示する。

1) トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) をマーカーとするプロセス評価試験

トウガラシ微斑ウイルス (Pepper Mild Mottle virus, PMMoV) はピーマン等にモザイク病を引き起こす植物ウイルスである。これをヒトが摂取すると糞便に多量のPMMoVが排泄されることが知られている。また、下水中に含まれる動物・植物ウイルスの中でも最もコピー数が高いとされている。

本章ではリアルタイムPCRによるPMMoVの検出方法を示した。下水検査のプロセスコントロールのほか、糞便汚染の指標としてPCR反応のInternal Controlとして利用可能である。

1-S t e p 試薬を用いたリアルタイムPCR法によるPMMoV検出

本術式では1-step試薬を用いたリアルタイムPCRを紹介する。数種類の商業キットも販売されており各マニュアルを参考にすること。

ア. 準備するもの

機器、消耗品

マイクロ遠心機、マイクロピペット、滅菌微量遠心チューブ (2.0mL、1.5mL、0.5mL)、リアルタイムPCR反応プレート (8連ストリップチューブ)、8連ストリップキャップ (プレートシール)、リアルタイムPCR装置 (参考:ABI 7500Fast、QuantStudio 5、StepOnePlus 他)

試薬等

術式の試薬は、いずれも例示であり、類似品を利用してもよい。

一部のPCR試薬では、リアルタイムPCR装置の種類に応じて補正用ROXの濃度を変えたほうがよい。

プライマー、プローブ、ポジティブコントロールの配列情報

プライマー

PMMV-FP1-rev: GAG TGG TTT GAC CTT AAC GTT TGA

PMMV-RP1: TTG TCG GTT GCA ATG CAA GT

プローブ

PMMV-Probe1 FAM-MGB: FAM-CCT ACC GAA GCA AAT G-NFQ-MGB

※TAMRA やBHQなどのNFQ-MGB以外のクエンチャーでは反応性がよくない。

ポジティブコントロール

下記の配列 (175bp) を参考とした合成二本鎖DNA断片 (GeneArt Strings DNA Fragments) またはプラスミド二本鎖DNA

TTATGGCATAACAGTTACCAGTGGTAATGGTAGCTGTGGTTTTCAAATGAGAGTGGTTTTGACCTT
AACGTTTTGAGAGGCCTACCGAAGCAAATGTCGCACTTGCATTGCAACCGACAATTACATCAAA
GGAGGAAGGTTTCGTTGAAGATTGTACGTGGGCTACAACCTCCTTAACC

1-S t e p リアルタイムPCR用試薬

(参考) One Step PrimeScript III RT-qPCR 【TaKaRa (RR600S)】、QuantiTect probe RT-PCR kit 【QIAGEN (204443)】他

イ. 操作

ここでは、参考として TaKaRa OneStep PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG (RR601A) を用いた試薬調製及び反応条件について例示する。

Quant Studio5 を用いる場合

試薬	容 量 (μL)	最終濃度
2x Master Mix	10	$\times 1$
For. PMMV-FP1-rev (20 μM)	0.2	0.2 (μM)
Rev. PMMV-RP1 (20 μM)	0.2	0.2 (μM)
PMMV-Probe1 (5 μM)	0.8	0.2 (μM)
ROX Dye II	0.1	$\times 0.25$
RNase free Water	3.7	
template RNA※	5	
Total 容量	20	

※事前調査により十分なRNA量が確認できれば、RNAを節約するために RNase DNase free Water で 10~100 倍に希釈して使用する。

下記の条件でリアルタイムPCR反応を行う。

ただし、増幅条件は使用機器によって異なるのでそれぞれ最適化を行うこと。

25°C	10min	45cycles
52°C	5min	
95°C	10sec	
95°C	5sec	
60°C	30sec	

2) 疑似ウイルス粒子 (VLP) を用いる添加回収試験

ウイルス疑似粒子(VLP)内に挿入した人工的な配列を検出する試薬が市販されており、下水試料中へ添加し、回収率を測定する方法を紹介する。このほか φ6 を用いた添加試験も利用できる。いずれも新型コロナウイルスの下水中の挙動とは異なるため、検査工程の妥当性評価の目安として用いる。

ア. 準備するもの

試薬

VLP試薬

(参考) VLP-RNA Extraction Control (1×10^4 GC/ μ L) ベリタス (プライマープローブ同梱)
商品コード MERMDX069-1、MERMDX069-20 (HEX 555nm)

RT-qPCR試薬

(参考) TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher SCIENTIFIC)

RNA抽出キット等

準備

検量線用陽性コントロール

保管

- ・ VLP-RNA Extraction Control は初回解凍時、小分けして保存する。
- ・ 可能であれば、下水添加用、陽性コントロール用は別々に冷凍保存する (-20°C以下)。
- ・ 下水添加用は想定される 1 回の抽出検体数+1 検体分程度の量を分注する。
- ・ RT-qPCR用陽性コントロールはPCRチューブに 25 μ L 以上で分注する。

検量線用陽性コントロールの調整*

- ① PCRチューブに分注済みの検量線用陽性コントロール用 VLP-RNA Extraction Control を解凍する。
- ② 75°C 10 分、4°C ∞ でRNA抽出(1×10^4 GC/ μ L)
- ③ PCRチューブを遠心する。
- ④ TE Buffer 等の希釈溶媒で 10 倍希釈系列を行い、 $10^3 \sim 10^1$ GC/ μ L まで作製する。
手技の誤差を減らすため、希釈系列は総量 50 μ L 以上で混合・調製する。
(例) 1×10^4 GC/ μ L 5 μ L +TE Buffer 45 μ L = 50 μ L
- ⑤ アプライまで 4°C で保存する。
- ⑥ 残ったコントロールは廃棄する。

*繰り返しの凍結融解は避け、用時調整。添加回収試験時に作成する検量線の Ct 値を毎回確認すること。

イ. 操作

VLP添加-RNA

(参考) Viral RNA/DNA Concentration and Extraction Kits for Wastewater (以下TNAキット)の場合

- ① 40mL 下水に 20 μ L の 1×10^4 GC/ μ L の VLP-RNA Extraction Control 製品を添加する。
- ② TNAキットで核酸 40 μ L を抽出する (VLP濃度: 0.5×10^4 GC/ μ L)
- ③ 即日測定の場合は 4°C、長期保管の場合は -80°C で保管する。

RT-qPCR

全て on ice で調製する。

- ① VLP-RNA Extraction Control 同梱の VLP Detection Mix (primer/probe MIX) を用いて RT-qPCR (20 μ L 反応系) 反応液を作製する。

- ② 下水抽出物 (RNA 5 μ L) 及び陰性コントロールを加える。
③ 検量線用コントロールはア.で調整したRNAを用いる。
4点検量線を作成する(5 $\times 10^4$ 、5 $\times 10^3$ 、5 $\times 10^2$ 、5 $\times 10^1$ GC/5 μ L)。

(反応系)

50°C	5min	45cycles
95°C	20sec	
95°C	10sec	
60°C	30sec	

ウ.回収率の計算

VLP回収率=(測定したVLPのRNA濃度)/(加えたVLPのRNA濃度)

エ.陽性コントロールの値の確認

確認する対象：5 $\times 10^4$ GC/5 μ L の陽性コントロール

Threshold line を 0.2 に設定し、今までの測定した値と比較し、推定されるCt値の概ね ± 1.0 以内であることを確認する。大きく外れていると判断した場合は、再検査実施を考慮する。

参考資料

- Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources in Japan, Haramoto et al., Appl Environ Microbiol, 79 (23) :7413–7418 2013
- Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater, Kitamura et al., Science of The Total Environment Volume 763, 1 April 2021, 144587
- USCDC. National Wastewater Surveillance System (NWSS) Wastewater Surveillance Testing Methods
- 北川和寛 尾形悠子 藤田翔平 斎藤望 柏原尚子 木幡裕信 金成由美子 喜多村晃一 吉田弘. 下水中から検出される新型コロナウイルス変異株の塩基配列解析について. 病原微生物検出情報. 2022年11月号, Vol. 43, p264-265
- A Routine Sanger Sequencing Target Specific Mutation Assay for SARS-CoV-2 Variants of Concern and Interest, Sin Hang Lee, Viruses, 13 (12) : 2386. 2021