会長		担当理事		会計	

埼医業Ⅰ第５８０号
令和４年６月２２日

郡市医師会長　　殿

埼玉県医師会長　　金　井　忠　男
（担当常任理事　　登　坂　英　明）

サル痘に関する情報提供及び協力依頼について（一部改正）

標記のことについては、令和４年６月３日付埼医業Ⅰ第４５５号（日医発第471号）をもってご連絡しておりますが、今般、日医感染症危機管理対策室長から別添（日医発第602号(健Ⅱ)）のとおり通知がありました。

つきましては、お忙しいところ恐れ入りますが、貴会管下会員あてご周知くださいますようお願いいたします。

担　当：業務Ⅰ課　石田
ＴＥＬ：０４８－８２４－２６１１
ＦＡＸ：０４８－８２２－８５１５

南加八潮医師会
収受
4.6.24
第354号

日医発第602号（健Ⅱ）
令和４年６月21日

都道府県医師会
感染症危機管理担当理事　殿

日本医師会感染症危機管理対策室長
釜萢　敏

サル痘に関する情報提供及び協力依頼について（一部改正）

本件については、令和４年６月２日付日医発第471号（健Ⅱ）をもってご連絡いたしました。

今般、厚生労働省より同事務連絡の一部を改正したことについて各都道府県等衛生主管部（局）宛て事務連絡がなされ、本会に対しても周知方依頼がありました。

本改正は、主に各自治体の地方衛生研究所における検査体制の整備に関する改正となっており、主な改正箇所は別添の太字下線をご参照ください。

また、「病原体検出マニュアル サル痘（第１版）（令和４年６月国立感染症研究所）」が作成されましたので、併せてご連絡いたします。

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

事　務　連　絡
令和４年５月20日
令和4年6月17日一部改正

公益社団法人　日本医師会　御中

厚生労働省健康局結核感染症課

サル痘に関する情報提供及び協力依頼について

今般、欧州や北米を中心に感染が確認されているヒトのサル痘については、現在、厚生労働省においても情報収集に努めているところです。

我が国では、サル痘については、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（平成10年法律第114号。以下「感染症法」という。）に基づき、４類感染症に位置づけ、サル痘の患者を診断した医師は、都道府県知事等に対して直ちに届け出ることを義務づけています。

これまで我が国においては、ヒトのサル痘の発生事例は報告されていませんが、今般のヒトの感染事例については、アフリカ大陸以外の複数の国で、渡航歴のない感染者が発生しており、市中感染の発生が示唆されることから、我が国における輸入例等の発生に注意する必要があります。

つきましては、感染症法に基づくサル痘の届出基準を改めてご確認いただくとともに、別添について貴会会員にご周知いただき、臨床症状からサル痘を疑う患者を診察した場合には、最寄りの保健所にご連絡をいただきますようお願いします。

また、同様の事務連絡を都道府県等に発出しておりますことを申し添えます。

本件に関して、別添を修正いたしました。（**主な改正箇所は太字下線**）
病原体検出に使用するPCRプライマー・プローブの配布については、別途ご連絡いたします。

事　務　連　絡
令和４年５月20日
令和４年６月17日最終改正

各（都道府県／保健所設置市／特別区）衛生主管部（局）御中

厚生労働省健康局結核感染症課

サル痘に関する情報提供及び協力依頼について

今般、欧州や北米を中心に感染が確認されているヒトのサル痘については、現在、厚生労働省においても情報収集に努めているところです。

我が国では、サル痘については、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（平成10年法律第114号。以下「感染症法」という。）に基づき、４類感染症に位置づけ、サル痘の患者を診断した医師は、都道府県知事等に対して直ちに届け出ることを義務づけています。

これまで我が国においては、ヒトのサル痘の発生事例は報告されていませんが、今般のヒトの感染事例については、アフリカ大陸以外の複数の国で、渡航歴のない感染者が発生しており、市中感染の発生が示唆されることから、我が国における輸入例等の発生に注意する必要があります。

貴職におかれましては、感染症法に基づくサル痘の届出基準を改めてご確認いただくとともに、別添について、管下の医療機関にご周知頂き、臨床症状からサル痘を疑う患者の対応についての相談や情報提供があった場合には、厚生労働省健康局結核感染症課に情報提供をお願いします。また、サル痘の確定診断が実施可能な機関は、現時点で国立感染症研究所に限られることから、疑い事例が発生した場合には、国立感染症研究所への相談の上、検体搬送等についてご協力をお願いします。

また、本件に関しての積極的疫学調査や検体採取方法等については、追ってお示しする予定です。

なお、同様の事務連絡を公益社団法人日本医師会及び各検疫所宛てに発出しておりますことを申し添えます。

本件に関して、別添を修正いたしました。（**主な改正箇所は太字下線**）

病原体検出に使用するPCRプライマー・プローブの配布については、別途ご連絡いたします。

別添

サル痘への対応について

１．各国の事例について

2022年５月以降、欧州、北米等において、サル痘の感染例及び疑い例が報告されている。

世界保健機関（WHO）によると、６月16日時点で、2036確定例がサル痘非常在国である35カ国から報告されている[1]。死亡例の報告はない。

英国保健安全保障省（UKHSA）は、英国内の症例の疫学調査においては、ゲイ・バイセクシャル・その他の男性間の性交渉を行う者（Gay, Bisexual and other Men who have Sex with Men: GBMSM）での感染事例が多いことを指摘しているが[2]、WHOは、報告例の全てがMSMではないとしている[1]。

２．サル痘について

- 概要
  - サル痘はオルソポックスウイルス属のサル痘ウイルスによる感染症で、1970年にヒトでの感染が発見されて以来、中央アフリカから西アフリカにかけて流行している。我が国では感染症法上の４類感染症に指定されている。
  - 2017年からナイジェリアで患者数が増加し、2018年から英国等においてナイジェリアに疫学的リンクのある輸入例が発生している。
- 症状
  - ウイルスに曝露後、通常６-13日（最大５-21日）の潜伏期間の後に発症。
  - 発熱、頭痛、リンパ節腫脹などの症状が０-５日程度持続し、発熱１-３日後に発疹が出現。
  - 皮疹は顔面や四肢に多く出現し、徐々に隆起して水疱、膿疱、痂皮となる。
  - 欧州疾病予防・管理センター(ECDC)の報告では、現在欧州等で発生が見られるサル痘症例について、男性間で性交渉を行う者（MSM: Men who have Sex with Men）の間で報告されている症例では、外陰部に病変が集中していることを指摘している[3]。
  - 多くの場合２-４週間持続し自然軽快するものの、小児例や、あるいは曝露の程度、患者の健康状態、合併症などにより重症化することがある。
  - 皮膚の二次感染、気管支肺炎、敗血症、脳炎、角膜炎などの合併症を起こすことがある。
  - サル痘常在国における致命率は1-11%程度とされている。

---

[1] 世界保健機関（WHO）. Multi-country monkeypox outbreak: situation update. 16 June 2022. https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news

[2] ６月10日のUKHSAの報告によると、６月８日までの確定例（336例）のうち、性別情報が得られた症例（341例）の99%は男性であり、詳細情報の得られた男性（152例）のうち、99%（151例）は、男性と接触があった男性であった。

[3] 欧州疾病予防管理センター（ECDC）. Risk assessment: Monkeypox multi-country outbreak 23 May 2022. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/risk-assessment-monkeypox-multi-country-outbreak

（参考）サル痘による皮疹（UK Health Security Agency（UKHSA），14 May 2022）



・ 感染経路
  ・ 主にアフリカに生息するリスなどのげっ歯類をはじめ、サル、ウサギなどウイルスを保有する動物との接触によりヒトに感染する。
  ・ サル痘はヒトからヒトに感染することがあり、主に接触感染、飛沫感染をするとされている。なお、理論的には空気感染も起こす可能性が指摘されているが実際に空気感染を起こした事例は確認されていない。
  ・ 発症後からすべての皮疹が消失し新しい正常な皮膚に覆われるまで感染予防策をとることが推奨されている。
・ 鑑別診断
  ・ 同じく発疹を症状とする疾患が鑑別となり、水痘、麻疹、細菌感染、梅毒、薬物アレルギーなどが代表的。既に根絶されている天然痘とは症状での区別は困難である。
  ・ サル痘の発疹は手掌と足底にも出現することが多く、水痘の鑑別に有用とされる。
・ 診断
  ・ 主に水疱や膿疱の内容液や蓋、あるいは組織を用いてPCR検査で遺伝子を検出することが有用である。
  ・ その他、ウイルス分離・同定や、ウイルス粒子の証明、蛍光抗体法などの方法が知られている。
  ・ 抗原検査や抗体検査は交差反応が多く、特異的な診断には至らない。
・ 治療法
  ・ 我が国で利用可能な薬事承認された特異的な治療薬はない。
  ・ 欧州においては特異的治療薬としてTecovirimatが承認されている。このほか、実験室レベルでは、Cidofovir、Brincidofovirなどの薬剤が有効な可能性がある。

・ 予防法
  ・ 天然痘ワクチン[4]によって約85%発症予防効果があるとされている。
  ・ 流行地では感受性のある動物や感染者との接触を避けることが大切である。

3．我が国における対応について

[4] 日本国内では1976年以降天然痘ワクチンの定期予防接種は行われていない。

サル痘は、我が国では感染症法上の４類感染症に指定されており、当該感染症の患者もしくは無症状病原体保有者を診断した医師、感染死亡者及び感染死亡疑い者の死体を検案した医師は、ただちに最寄りの保健所への届出を行う必要がある。

今般、欧米等において確認されているサル痘の流行については、その疫学的動向が既知の知見と異なっていることから、当面の間、本疾患を疑う患者（以下「疑い例」という。）及びその接触者に関する暫定症例定義、医療機関及び保健所・都道府県等における対応については、下記の通りとする。

（１）疑い例及び接触者に関する暫定症例定義

１）「疑い例」の定義：下記の①～③全てを満たす者を指す。

① 説明困難[*1]な急性発疹を呈している。

（＊１）水痘、風疹、梅毒、伝染性軟属症、アレルギー反応等のその他の急性発疹を呈する疾患によるものとして説明が困難であることをいう。

② 次の１つ以上の症状を呈している。

・発熱（38.5℃以上）
・頭痛
・背中の痛み
・重度の脱力感
・リンパ節腫脹

③ 次のいずれかに該当する。

・発疹等の発症の 21 日以内にサル痘常在国[*2]に滞在歴があった。
・発疹等の発症の 21 日以内にサル痘常在国以外のサル痘症例が報告されている国に滞在歴があり、滞在先で他者との濃厚接触（性的接触を含む。）があった。
・発疹等の発症の 21 日以内にサル痘常在国やサル痘症例が報告されている国[5]に滞在歴がある者と日本国内において濃厚接触（性的接触を含む。）があった。
・発疹等の発症の 21 日以内に複数または不特定の者と性的接触があった。

（*2）サル痘常在国[5]：ベナン共和国、カメルーン、中央アフリカ共和国、コンゴ民主共和国、ガボン、ガーナ（動物のみで確認）、コートジボワール、リベリア、ナイジェリア、コンゴ共和国、シエラレオネ及び南スーダン

２）「接触者」の定義：サル痘の患者（確定例）又は疑い例と、表１に示す接触状況があった者を指す。

表１　接触状況による感染リスクのレベル

	サル痘患者等との接触の状況				
	創傷などを含む粘膜との接触	寝食をともにする家族や同居人	正常な皮膚のみとの接触	1m以内の接触歴[3)]	1mを超える接触歴

[5] サル痘の発生状況については、WHO Disease outbreak news Monkeypox を参照されたい。
https://www.who.int/emergencies/emergency-events/item/2022-e000121

適切なPPEの着用や感染予防策	なし	高[1)]	高[2)]	中[1)]	中	低
	あり	－	－	－	低	低

1）サル痘常在国でのげっ歯類との接触を含む
2）寝具やタオルの共有や、清掃・洗濯の際の、確定例の体液が付着した寝具・洋服等との接触を含む
3）接触時間や会話の有無等周辺の環境や接触の状況等個々の状況から患者の感染性を総合的に判断すること

（2）医療機関における対応について

1）報告

・ 疑い例の症例定義に該当する者を診察した場合には、最寄りの保健所に相談すること。
・ 特に、最近の海外渡航歴を有する疑い例については、渡航歴、接触歴（性的接触歴を含む）、天然痘ワクチン接種歴等の詳細を可能な限り聴取すること。
・ 感染症法第15条による保健所の積極的疫学調査に協力すること。
・ 別紙1を参考に疑い例の検体を保存するとともに、保健所の求めに応じて、検体を提出すること。

2）臨床上の留意点

・ 疑い例に接する際には、接触及び空気予防策[6]を実施すること。入院が必要となる場合は、個室（陰圧個室が望ましい。）で管理を行うこと。
・ サル痘の患者については、全ての皮疹が痂皮となり、全ての痂皮が剥がれ落ちて無くなるまで（概ね21日間程度）は周囲のヒトや動物に感染させる可能性がある。
・ サル痘については、常在国における致命率は高い一方で、非常在国における重症化率については不明であることから、入院での管理を行うことが考慮される。
・ これまで国内での発生がないことから、当面の間、特定感染症指定医療機関及び第一種感染症指定医療機関においては、患者等の受入れや接触者の発症時の受診の受入れを優先的に検討されたい。
・ 外来においてフォローアップを行う場合には、自宅等における感染対策を徹底するとともに、自身の健康に注意を払い、症状が悪化する場合には入院治療を行うことができるよう、最寄りの保健所と連携をとること。

---

6 サル痘の主な感染経路は接触感染や飛沫感染であるが、水痘、麻疹等の空気感染を起こす感染症が鑑別診断に入ること、サル痘に関する知見は限定的であること、他の入院中の免疫不全者における重症化リスク等を考慮し、現時点では、医療機関内では空気予防策を実施することが推奨される。

・ サル痘患者が利用したリネン類を介した医療従事者の感染の報告があることから、リネン類を含めた患者の使用した物品の取り扱いには注意すること[7]。
・ 診断や治療等の臨床管理については、国立国際医療研究センター国際感染症センター（DCC）に相談を行うことが可能である。

連絡先：
国立研究開発法人 国立国際医療研究センター病院
国際感染症センター（DCC）
TEL: 03-3202-7181（代）
Email: idsupport@hosp.ncgm.go.jp

（3）保健所・都道府県等における対応について

1）報告

・ 疑い例を診療した医師からの相談があった場合には、以下の連絡先に相談されたい。メールで連絡する場合は、厚生労働省と国立感染症研究所の両方の連絡先を宛先に入れること。

連絡先：
厚生労働省健康局結核感染症課
TEL: 03-3595-2257（平日）
TEL: 090-1532-3386（休日・夜間緊急連絡時）
Email: variants@mhlw.go.jp ※文頭に【サル痘】と入れること
国立感染症研究所 EOC
TEL: 03-4582-2602 ※平日日中のみ
Email: eoc@nih.go.jp

2）調査

・ 別紙２を参考に、感染症法第 15 条に基づく積極的疫学調査を実施すること。
・ 積極的疫学調査の実施にあたっては、国立感染症研究所の実地疫学専門家養成プログラム（FETP）の派遣を行うことができるので、積極的に活用を検討されたい。
・ 調査結果については、感染症法第 15 条に基づき、国立感染症研究所により調査票の分析を行うので、調査票を記入し第一報をした時点（記載可能な範囲）で、可能な限り電子ファイルで、上記メールアドレス（厚生労働省結核感染症課及び国立感染症研究所 EOC）に報告されたい（件名の文頭に【サル痘】と記載）。
・ なお、症例が他の自治体管轄の医療機関へ転院した場合などは、転院先の自治体に情報や検体確保状況を共有するなど、自治体間の情報共有や検体確保のための協力を円滑に実施すること。
・ 調査において疑い例や患者（確定例）に接する際には、接触及び飛沫感染予防策を実施すること。

---

[7] 厚生労働省健康局結核感染症課長通知「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引きについて」（平成 30 年 12 月 27 日付け健感発第 1227 第１号厚生労働省健康局結核感染症課長通知別添）の「痘そう」を参照のこと。

3）検体

・ 地方衛生研究所において、「病原体検出マニュアル サル痘（第１版）（令和４年６月国立感染症研究所）」に基づく検査体制が整った場合については、感染症法第15条に基づき、別紙１を参考に検体を収集し、地方衛生研究所に送付すること。検査体制が整うまでの間の検体については、国立感染症研究所に送付すること。検体採取・送付の具体的な調整については、上記、国立感染症研究所EOCに相談されたい。
・ 検体の輸送に当たっては、「感染性物質の輸送規制に関するガイダンス2013-2014版（国立感染症研究所）」に基づき、適切に梱包・輸送を行うこと。
・ 本依頼により報告された症例については、後日、厚生労働省又は国立感染症研究所から都道府県等及び医療機関等に対し、検体の送付を依頼し、感染源等究明のための追加調査等を行うことがあるので、可能な限り、検体を６ヶ月間保存することにご協力を頂きたい。

4）患者等及び接触者への対応

・ 患者の発生に備え、患者等の受入れや接触者の発症時の受診について、管内の感染症指定医療機関等とあらかじめ協議を行い、受入れ体制を確保すること。なお、サル痘についてはこれまで国内での発生がないことから、当面の間、特定感染症指定医療機関又は第一種感染症指定医療機関において受け入れを優先することが望ましい。
・ サル痘は感染症法上の４類感染症であり、感染症法に基づく入院勧告等の措置が適用されないが、海外での感染が拡大していることを踏まえ、患者（確定例）及び疑い例、接触者に対して、「サル痘患者とサル痘疑い例への感染予防策（国立感染症研究所・国立国際医療研究センター国際感染症センター（DCC））」[8]で示されている感染対策を実施すること。

①患者（確定例）及び疑い例

・ サル痘の患者については、全ての皮疹が痂皮となり、全ての痂皮が剥がれ落ちて無くなるまで（概ね21日間程度）は周囲のヒトや動物に感染させる可能性がある。
・ サル痘については、常在国における致命率は高い一方で、非常在国における重症化率については不明であることから、入院での管理を行うことが考慮される。
・ 入院しない場合には、以下の自宅等における感染対策*を徹底するとともに、別紙２を参考に自身の健康に注意を払い必要に応じてフォローアップを行うとともに、症状が悪化する場合には、受診中の医療機関とも連携の上、受け入れ医療機関への入院について調整されたい。
・ なお、個別の対応については、適宜、厚生労働省とも協議されたい。

*自宅等における感染対策について

・免疫不全者、妊婦、12歳未満の小児との接触を控える。

---

[8] 国立感染症研究所・国立国際医療研究センター国際感染症センター（DCC）「サル痘患者とサル痘疑い例への感染予防策」https://www.niid.go.jp/niid/ja/monkeypox-m/2595-cfeir/11196-monkeypox-01.html

・発症中は他人の肌や顔との接触、性的接触を控える。また、サル痘については性的接触による感染が指摘されていることから、症状が消失した後も、コンドームの着用等、性感染のリスク回避を心がける。
・他者との寝具、タオル、食器の共用を避ける。
・アルコール等の消毒剤を使用した手指衛生を行う。

②接触者

・ 別紙２を参考に、患者（確定例）又は疑い例との接触後 21 日間は体調に注意し、接触状況による感染リスクに応じて適切にフォローアップを行うとともに、発症時には速やかに医療機関を受診すること。

（４）地方衛生研究所における対応について

・ 検査体制が整った地方衛生研究所おいては、「病原体検出マニュアル サル痘（第１版）（令和４年６月国立感染症研究所）」に基づき、疑い例から採取された検体の検査を実施されたい。なお、地方衛生研究所における検査費用については、感染症発生動向調査事業負担金の対象となることを申し添える。
・ 病原体が確認された場合には、その検査結果等について、保健所を通じて、３（３）に記載の厚生労働省と国立感染症研究所 EOC 連絡先に報告されたい。
・ 検体の輸送に当たっては、「感染性物質の輸送規制に関するガイダンス 2013-2014 版（国立感染症研究所）」に基づき、適切に梱包・輸送を行うこと。

４．参考資料

・ サル痘の届出基準
https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-13.html
・ 病原体検出マニュアル　サル痘
https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/monkeypox20220617.pdf
・ 国立感染症研究所ファクトシート：サル痘
https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/408-monkeypox-intro.html
・ 国立感染症研究所「アフリカ大陸以外の複数国で報告されているサル痘について（第１報）」
https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-lab/2521-cepr/11166-monkeypox-ra-0524.html
・ 国立感染症研究所・国立国際医療研究センター国際感染症センター（DCC）「サル痘患者とサル痘疑い例への感染予防策」
https://www.niid.go.jp/niid/ja/monkeypox-m/2595-cfeir/11196-monkeypox-01.html
・ 国立国際医療研究センター国際感染症センター（DCC）ファクトシート：サル痘

http://dcc-irs.ncgm.go.jp/material/factsheet/

- 検疫所（FORTH）海外感染症情報
  http://www.forth.go.jp/topics/fragment5.html
- WHO　Monkeypox
  https://www.who.int/health-topics/monkeypox#tab=tab_1
- CDC　Monkeypox
  https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/index.html
- ECDC　Monkeypox outbreak
  https://www.ecdc.europa.eu/en/monkeypox-outbreak
- UK Health Security Agency latest findings into monkeypox outbreak
  https://www.gov.uk/government/news/ukhsa-latest-findings-into-monkeypox-outbreak

別紙１　病原体検査のために必要な検体採取、保存方法について

サル痘の実験室診断（病原学的検査）には水疱、膿疱、痂皮等の皮膚病変（発痘部位）が最も適する。皮膚病変は病期（潜伏期及び前駆期 → 丘疹期及び紅斑期 → 水疱期 → 膿疱期 → 痂皮期 → 回復期）により性状が変化していき、水・膿疱の皮（上蓋）、水・膿疱内容物、水・膿疱内部のスワブ、痂皮が検査に適している。咽頭スワブも用いられることがあるが、検出感度は皮膚病変に劣ると考えられており、検査陰性の結果の解釈には注意が必要である。また、血液からもウイルスが検出される可能性があるがウイルス血症は初期に一時的に現れるのみであり、一般的に診断目的の検査には不向きと考えられている。また、ウイルス検査以外の診療目的で皮膚病変の生検が実施された場合、ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた検査も可能である。その場合の検査については、国立感染症研究所感染病理部に問い合わせること。実験室診断のための具体的な採材の材料や方法、その保存方法については表１と図１を参照のこと。

表１．検査に使用する検体

優先順位	分類	検体種	採取方法	保管方法
1	皮膚病変 ・ ２箇所以上の皮膚病変から採取。 ・ 同じ種類の検体は１つのチューブに混合しても構わないが、異なる種類の検体を混合しない。 ・ 適切な検体採取が実施されたかどうかの判断のため、検体採取前の病変部の肉眼写真と検体採取時の手技の詳細について検体送付時に添付することが望ましい。	水疱液・膿疱液	生理食塩水（もしくはPBS）を0.1～0.2ml入れた注射針(26G)付きの1mlの注射器を疱膜から挿入して、2～3回ポンピングして内容液を採取。	滅菌スクリューキャップチューブ（2ml以下）等に内容液を入れて密栓。冷蔵保管。
		病変部スワブ （水疱・膿疱内部）	病変内部のウイルスをスワブに吸着させるために病変内部を強く擦り、内容液・浸出液をスワブに吸着させる。	スワブをウイルス輸送用培地(Viral Transport Medium, VTM)に浸して密封。冷蔵保管。 スワブを溶液に浸さず密封しドライスワブのまま冷蔵保管でも良い。
		痂皮	ピンセットを用いて痂皮を採取	滅菌プラスチックチューブに入れ密栓。冷蔵保管。
		水疱蓋・膿疱上蓋 （可能であれば採取）	ピンセットと先の丸い鋏を用いて水疱・膿疱の上蓋を剥がして採取	滅菌プラスチックチューブに入れ密栓。冷蔵保管。
		皮膚生検検体	ウイルス検査以外の診断目的で皮膚病変の病理組織検査が実施された場合は、当該検体を病原体検査に使用することが可能	常法に則り、ホルマリン固定パラフィン包埋し、常温保管。
2	非皮膚病変	咽頭スワブ*	常法に則り採取	スワブをVTMに浸して密封。冷蔵保管。

	・皮膚病変に加えて採取を検討しても良いが、本検体のみでの検査は原則実施しない。			スワブを溶液に浸さず密封しドライスワブのまま冷蔵保管でも良い。

＊　咽頭スワブ検体でもサル痘ウイルスが検出されればサル痘と診断可能であるが、皮膚病変に比べて検出感度が低く、検査陰性でも感染を否定できないことに注意する。

【検体採取時の注意事項】

全ての検体について、採取時には、標準予防策に加えて、飛沫やエアロゾル感染の予防をする。具体的には、長袖ガウン、手袋、眼の防護具およびN95マスクを含む個人防護具を適切に着用し実施すること。状況に応じて、靴カバーやキャップの着用も考慮する。検体採取には原則ディスポーザブルの器具を用いる。使用後の器具は汚染を広げないように適切に廃棄又は処理する。また、検体採取を行った診察室等は、リネン類の交換を含め、接触面の清拭などの清掃を行う。清掃担当する者も適切な個人防護具の着用は必須である。

採取後の検体輸送については、「感染性物質の輸送規制に関するガイダンス　2013-2014版（国立感染症研究所）」を参照のこと。

https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/who/WHOguidance_transport13-14.pdf

図1検査検体を採取する皮膚病変

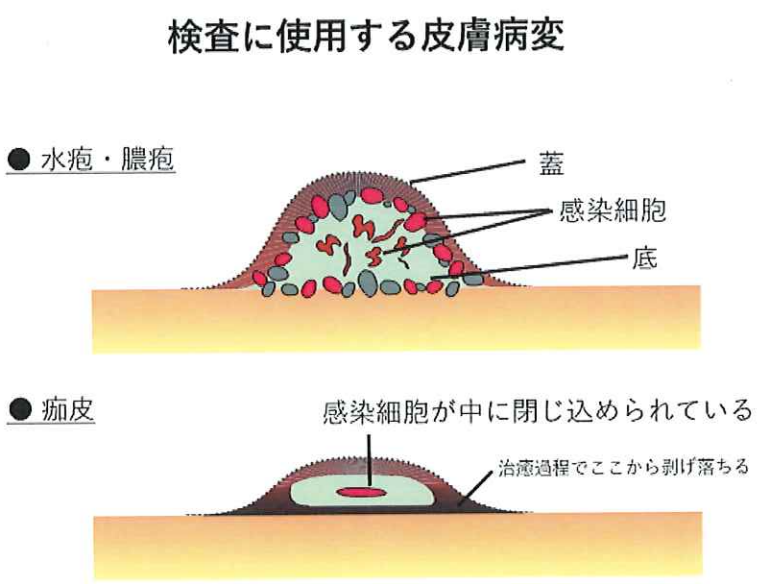
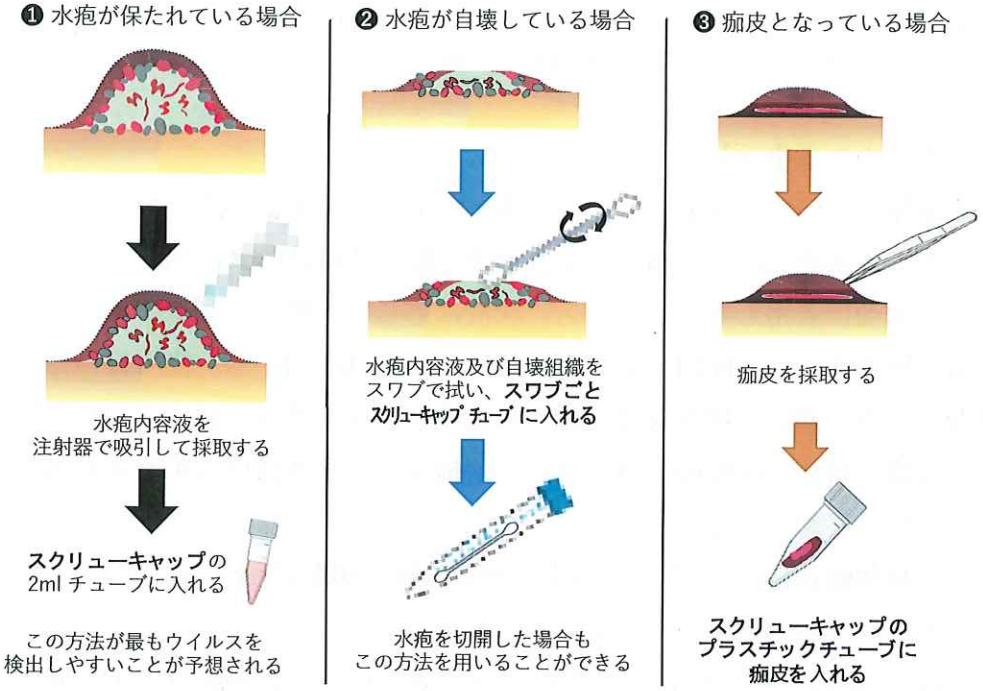


図２皮膚検体の採取方法

局所の皮膚病変別の検体の採取方法



別紙２　サル痘に対する積極的疫学調査実施要領

サル痘はオルソポックスウイルス属に属する、サル痘ウイルスによる感染症である。疫学情報や症状の経過については下記のリンクを参照されたい。

日本ではサル痘は４類感染症であり、これまで報告されたことはない。しかし、2022 年５月以降、常在国からの輸入症例以外でのヒト-ヒト感染例の報告が、欧州を中心に複数の国で相次いでいる。接触感染や飛沫感染を主体とする感染経路が考えられているが、国境を越えた交流での感染伝播も報告されているため、今後日本においても、サル痘を疑う患者が報告される可能性がある。そのため、サル痘の発生に備え、迅速かつ円滑な積極的疫学調査を実施できるよう、サル痘に対する積極的疫学調査実施要領を作成した。

（参照）

国立感染症研究所．サル痘とは

https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/408-monkeypox-intro.html

厚生労働省．サル痘に関する情報提供及び協力依頼について

https://www.mhlw.go.jp/content/000942303.pdf

国立感染症研究所．アフリカ大陸以外の複数国で報告されているサル痘について(第１報)

https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-lab/2521-cepr/11166-monkeypox-ra-0524.html

用語の定義

・「患者（確定例)」、「無症状病原体保有者」及び「感染症死亡者の死体」「感染症死亡疑い者の死体」：届出基準を参照のこと

・積極的疫学調査における「疑い例」：下記の全てを満たす者

○　説明困難*な急性発疹**を呈している

*水痘、風疹、梅毒、伝染性軟属症、アレルギー反応等のその他の急性発疹を呈する疾患によるものとして説明が困難であることをいう。

**文末参考

○　次の１つ以上の症状を呈している

・発熱（38.5℃以上）
・頭痛
・背中の痛み
・重度の脱力感
・リンパ節腫脹

○　次のいずれかに該当する

・発疹等の発症の 21 日以内にサル痘常在国***に滞在歴があった
・発疹等の発症の 21 日以内にサル痘常在国以外のサル痘症例が報告されている国に滞在歴

があり、滞在先で他者との濃厚接触（性的接触を含む。）があった
・発疹等の発症の21日以内にサル痘常在国やサル痘症例が報告されている国に滞在歴がある者と日本国内において濃厚接触（性的接触を含む。）があった者
・発疹等の発症の21日以内に複数または不特定の者と性的接触があった者
***サル痘常在国：ベナン共和国、カメルーン、中央アフリカ共和国、コンゴ民主共和国、ガボン、ガーナ（動物のみで確認）、コートジボワール、リベリア、ナイジェリア、コンゴ共和国、およびシエラレオネ及び南スーダン

・「症例」：届出基準の検査方法等によりサル痘と診断されたもの（「患者（確定例）」「感染症死亡者の死体」「感染症死亡疑い者の死体」「無症状病原体保有者」）及び上記の「疑い例」

・「接触者」：サル痘の患者（確定例）又は疑い例と表1に示す接触の状況があった者

表1　接触状況による感染リスクのレベル

		サル痘患者等の接触の状況				
		創傷などを含む粘膜との接触	寝食をともにする家族や同居人	正常な皮膚のみとの接触	1m以内の接触歴[3]	1mを超える接触歴
適切なPPEの着用や感染予防策	なし	高[1]	高[2]	中[1]	中	低
	あり				低	低

1）サル痘常在国でのげっ歯類との接触を含む
2）寝具やタオルの共有や、清掃・洗濯の際の、確定例の体液が付着した寝具・洋服等との接触を含む
3）接触時間や会話の有無等、周辺の環境や接触の状況等個々の状況から患者の感染性を総合的に判断すること。

調査対象

・積極的疫学調査の対象となるのは、「症例」、「疑い例」及びそれらの「接触者」である。
・接触者は、表1に示す感染リスクのレベルにより、潜伏期間中（患者との最終接触日から21日間）は以下の場合に応じて、それぞれ以下の留意点に注意して生活を送るよう協力を求める。

① 感染リスクのレベル：中～高の場合
- 朝夕1日2回、注意深く自身の健康をチェックし、サル痘を疑う臨床的特徴（発熱、発疹、リンパ節腫脹、頭痛、筋肉痛・背部痛等）の出現がないかを自己観察する。
- 健康状態に異常を認めた場合は、直ちに最寄りの保健所に相談をする。

- 感染リスクが高であって、接触者本人の同意が得られた場合は、保健所による積極的な健康状態の確認を検討する。積極的な健康状態の確認を実施する場合は1日1回実施することが望ましい。対面、電話、SMS、メール、オンライン面接等、使用可能な手段を用いて実施する。
- 潜伏期間中は、免疫不全者（ステロイド・免疫抑制剤使用、HIV感染、担がん患者、非代償性腎不全・肝不全等）、妊婦、12歳未満の小児との接触を可能な限り控える。
- 他者との寝具、タオル、食器の共用を避ける。

② 感染リスクのレベル：低の場合

- 健康状態に注意を払い、健康状態に異常を認めた場合は、直ちに最寄りの保健所に相談をする。

調査内容

・「症例」及び「疑い例」については、基本情報・臨床情報・推定感染源・接触者等必要な情報を収集する。
・「症例」が受診した医療機関が複数あり、当該医療機関を管轄する保健所が複数にまたがる場合は、それぞれの医療機関内の調査は当該医療機関を管轄する保健所が、保健所間で連携を図りながら実施する。

「接触者」への対応

・潜伏期間中にサル痘の臨床症状を認めた者は、保健所に連絡するよう説明する。保健所は「疑い例」として医療機関の受診、検査が必要か判断をしたうえで、その結果を踏まえ必要な調査と対応を行う。
・無症状の接触者は、サル痘診断のための検査の対象とはならない。
・無症状の接触者の家族、周囲の者（同僚等）については、特段の対応は不要である。

調査時の感染予防策

・症状を呈している疑い例または確定例に対する疫学調査においてはオンラインでの聞取り調査でもよい。対面での疫学調査においては、個人防護具の着脱に慣れた者が担当し、聞取りは適切に個人防護具を着用したうえで行う。
・無症状の接触者に対面調査を行う際、個人防護具の着用は不要である。

その他

・接触者の調査については、複数の保健所が関与する場合、初発の「患者（確定例）」の届出受理保健所、「患者（確定例）」の入院医療機関管轄保健所又は接触者の多くが居住する地域を管轄する保健所が、状況に応じて適宜とりまとめる。保健所において接触者の積極的な健康状態の確認を行う場合は、居住地の管轄保健所又は勤務場所の管轄保健所のいずれかが実施する。
・患者（確定例）及び接触者及びその家族等への対応については、プライバシーや人権の保護、心情に十分に配慮する。公表については、事前に厚生労働省と十分調整を行う。
・調査員は、自身に発熱がないことなど、健康状態に問題がないことを確認した上で調査に携わる。
・「症例」及び「疑い例」の滞在場所等の消毒については、当面、厚生労働省健康局結核感染症課長通知「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引きについて」（平成30年12月27日付け健感発第1227第１号厚生労働省健康局結核感染症課長通知別添）の「痘そう」を参照する。

参考）サル痘の皮疹の特徴と臨床経過

顔面（95%）、手掌、足底（75%）に好発する。発疹の経過は10日程度で、斑点状→小水疱→膿疱→痂皮と経過をたどる。発疹が多く発生する部位として、多い順に、顔 >脚 > 体幹 > 腕 > 手掌 > 生殖器 > 足底が挙げられる[1]。口腔粘膜や結膜、角膜にも発症した例が報告されている。痂皮は3週間は完全に消失しないことがあり、結痂（けつか）が乾燥して痂皮になり、剥がれ落ちると感染力はなくなる[2]。



A：小水疱、B, C：手掌、足底の斑点状の皮疹、D：膿疱と爪下病変、E：爪下病変、F, G：小丘疹、小水疱（文献１）

サル痘と鑑別が必要な発疹性疾患　（文献３　Table1 をもとに感染研で訳）

	サル痘	天然痘	水痘
潜伏期間（日）	7-17	7-17	12-14
前駆症状期間（日）	1-4	2-4	0-2
症状			
発熱	中等度	重度	軽症またはなし
倦怠感	中等度	中等度	軽症
頭痛	中等度	重度	軽症
リンパ節腫脹	中等度	なし	なし
病変			
深さ（直径 mm）	表層～深部(4-6)	深部(4-6)	表層(2-4)
分布	遠心性（主に）	遠心性	求心性

皮疹の外観	同一経過段階にあるため個々の皮疹の外観は均一	同一経過段階にあるため個々の皮疹の外観は均一	様々な経過段階にある皮疹が混在する
落屑までの時間(日)	14-21	14-21	6-14
手掌や足底病変	よくある	よくある	まれ

参考文献

1． Adler H et al, 2022 / CC BY-NC-ND 4.0 / https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(22)00228-6

2． Nigeria Center for Disease Control. https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/96_1577798337.pdf

3． Nalca A et al, Clin Infect Dis. 2005 Dec 15;41(12):1765-71. doi: 10.1086/498155. Epub 2005 Nov 11. PMID: 16288402.

病原体検出マニュアル

サル痘ウイルス

第１版

令和４年６月

目次

１．　概説

２．　検体の採取と保存

３．　検体の処理等
3-1.検体処理時の防護
3-2.検体の処理

４．　病原学的検査
4-1.リアルタイム PCR
4-2.ウイルス分離
4-3.電子顕微鏡法によるオルソポックスウイルス感染症の検査（参考検査）

５．　ポックスウイルス感染症の診断基準

６．　連絡先

1．概説

サル痘はポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類されるサル痘ウイルスによる感染症である。オルソポックスウイルス属には痘そうウイルス、牛痘ウイルス、ワクシニアウイルス、伝染性軟属腫ウイルス（水いぼの原因ウイルス） も分類されている。いずれも DNA をゲノムとしてもつ。サル痘ウイルスは遺伝子系統でコンゴ盆地型と西アフリカ型に分けられ、前者の方が重症化しやすい。

サル痘ウイルスは 1958 年にワクチン製造用のサルのコロニーで痘そう様症状を示す疾患が発生した際に初めて認識されこの名前が付けられたが、自然宿主はサルではなくアフリカのリス等の齧歯類ではないかと考えられている。ヒトのサル痘は 1970 年に初めて（現）コンゴ民主共和国で認識され、これまで主にアフリカ中央部および西部の諸国で発生している。2003 年以降、欧米等で散発的に発生が認められるがアフリカの発生地域からの輸入事例（動物を介する場合もある）である。サル痘は感染動物や感染者との接触、あるいはそれらに由来する飛沫物や血液、体液に汚染されたもの（寝具等）との接触等で伝播する。輸入事例からの二次感染も生じうるが、これまではヒトからヒトへの感染は稀であり感染の連鎖はすぐに途絶えると考えられていた。しかし 2022 年 5 月以降、欧米を中心に輸入事例や輸入事例からの二次感染ではないと考えられる症例が短期間に数百人以上報告され、ヒトからヒトへの感染は想定されていた以上に生じやすい可能性が指摘されている。遺伝子系統では西アフリカ型に分けられる。

サル痘の潜伏期間は 5-21 日（多くは 7-14 日）である。発熱、頭痛、筋肉痛、背痛、リンパ節腫脹等で発症し、その後発疹する。発疹は通常全身性で、顔面から始まり全身に広がる。発疹は水疱、膿疱、痂皮とほぼ同調して変化し脱落する（痂皮にも感染性ウイルスが含まれる）。2 週から 4 週で病気が進行する。致命率は約 10%以下とされ、子供、妊婦、免疫不全の状態にある者では致命率は高まる。痘そうと類似点は多いが、重症度や致命率はサル痘では低く、またリンパ節腫脹は通常痘そうでは見られない。2022 年 5 月以降の欧米を中心とした発生では死亡事例は報告されておらず、また発疹が生殖器等に限られるケースが多く認められている。

サル痘の発疹のような所見はオルソポックスウイルス属の他の複数のウイルスやパリセロウイルス属の水痘帯状疱疹ウイルス（ゲノムは DNA）の感染などでも認められ、迅速な鑑別のため病原学的検査（遺伝子検査）ではこれら複数を標的としたものを並行して調べることが勧められる。場合によっては国立感染症研究所へ相談あるいは精密検査の依頼をすべきである。水痘帯状疱疹ウイルスによる発疹の所見はポックスウイルスによるものと明らかに異なる部分があり、むしろ水痘が強く疑われる場合には水痘の病原体検出マニュアルを参照されたい。

なお、オルソポックスウイルス属のウイルスの抗原性は似通っているため、サル痘の実験室診断を血清学的に行なうことは現時点では困難である。また、発痘部位の検索に関して、以前は免疫組織化学法あるいは電子顕微鏡法も検査法として挙げられていたが、網羅的スクリーニングが可能である一方で特異性には欠き、技術と経験を要するため、これらの方法は参考検査の位置付けである。免疫組織化学法や電子顕微鏡法による検査で陽性の場合はオルソポックスウイルス感染症との診断にとどめる。

2．検体の採取と保存

サル痘の実験室診断（病原学的検査）には水疱、膿疱、痂皮等の皮膚病変（発痘部位）が最も適する。皮膚病変は病期（潜伏期及び前駆期 → 丘疹期及び紅斑期 → 水疱期 → 膿疱期 → 痂皮期 → 回復期）により性状が変化していき、水・膿疱の皮（上蓋）、水・膿疱内容物、水・膿疱内部のスワブ、痂皮が検査に適している。咽頭スワブも用いられることがあるが、検出感度は皮膚病変に劣ると考えられており、検査陰性の結果の解釈には注意が必要である。また、血液からもウイルスが検出される可能性があるがウイルス血症は初期に一時的に現れるのみであり、一般的に診断目的の検査には不向きと考えられている。また、ウイルス検査以外の診療目的で皮膚病変の生検が実施された場合、ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた検査も可能である。その場合の検査については、国立感染症研究所　感染病理部に問い合わせること。実験室診断のための具体的な採材の材料や方法、その保存方法については表 1 と図 1 を参照のこと。

表 1．検査に使用する検体

優先順位	分類	検体種	採取方法	保管方法
1	皮膚病変 ・ 2箇所以上の皮膚病変から採取。 ・ 同じ種類の検体は1つのチューブに混合しても構わないが、異なる種類の検体を混合しない。 ・ 適切な検体採取が実施されたかどうかの判断のため、検体採取前の病変部の肉眼写真と検体採取時の手技の詳細について検体送付時に添付することが望ましい。	水疱液・膿疱液	生理食塩水（もしくはPBS）を0.1～0.2ml入れた注射針(26G)付きの1 mlの注射器を疱膜から挿入して、2～3回ポンピングして内容液を採取。	滅菌スクリューキャップチューブ（2ml以下）等に内容液を入れて密栓。冷蔵保管。
		病変部スワブ （水疱・膿疱内部）	病変内部のウイルスをスワブに吸着させるために病変内部を強く擦り、内容液・浸出液をスワブに吸着させる。	スワブをウイルス輸送用培地(Viral Transport Medium, VTM)に浸して密封。冷蔵保管。 スワブを溶液に浸さず密封しドライスワブのまま冷蔵保管でも良い。
		痂皮	ピンセットを用いて痂皮を採取	滅菌プラスチックチューブに入れ密栓。冷蔵保管。
		水疱蓋・膿疱上蓋 （可能であれば採取）	ピンセットと先の丸い鋏を用いて水疱・膿疱の上蓋を剥がして採取	滅菌プラスチックチューブに入れ密栓。冷蔵保管。
		皮膚生検検体	ウイルス検査以外の診断目的で皮膚病変の病理組織検査が実施された場合は、当該検体を病原体検査に使用することが可能	常法に則り、ホルマリン固定パラフィン包埋し、常温保管。
2	非皮膚病変 ・ 皮膚病変に加えて採取を検討しても良いが、本検体のみでの検査は原則実施しない。	咽頭スワブ*	常法に則り採取	スワブをVTMに浸して密封。冷蔵保管。 スワブを溶液に浸さず密封しドライスワブのまま冷蔵保管でも良い。

＊　咽頭スワブ検体でもサル痘ウイルスが検出されればサル痘と診断可能であるが、皮膚病変に比べて検出感度が低く、検査陰性でも感染を否定できないことに注意する。

【検体採取時の注意事項】

全ての検体について、採取時には、標準予防策に加えて、飛沫やエアロゾル感染の予防をする。具体的には、長袖ガウン、手袋、眼の防護具および N95 マスクを含む個人防護具を適切に着用し実施すること。状況に応じて、靴カバーやキャップの着用も考慮する。検体採取には原則ディスポーザブルの器具を用いる。使用後の器具は汚染を広げないように適切に廃棄又は処理する。また、検体採取を行った診察室等は、リネン類の交換を含め、接触面の清拭などの清掃を行う。清掃担当する者も適切な個人防護具の着用は必須である。

採取後の検体輸送については、「感染性物質の輸送規制に関するガイダンス　2013-2014 版 国立感染症研究所」を参照のこと。

https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/who/WHOguidance_transport13-14.pdf

図 1　検査検体を採取する皮膚病変

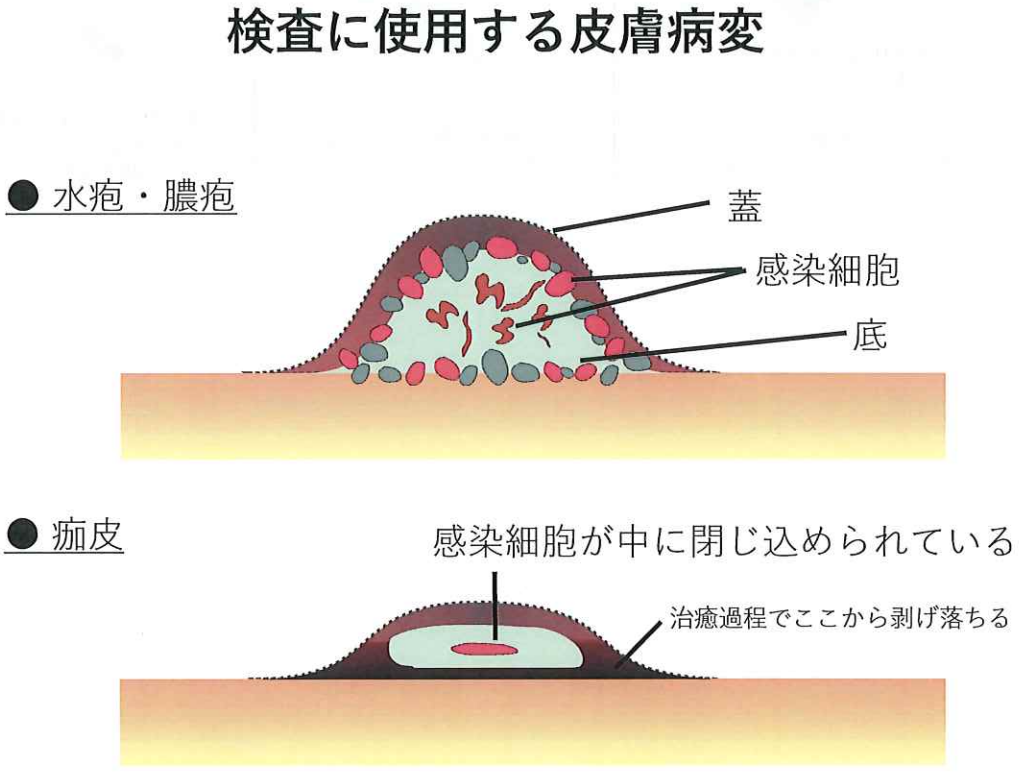
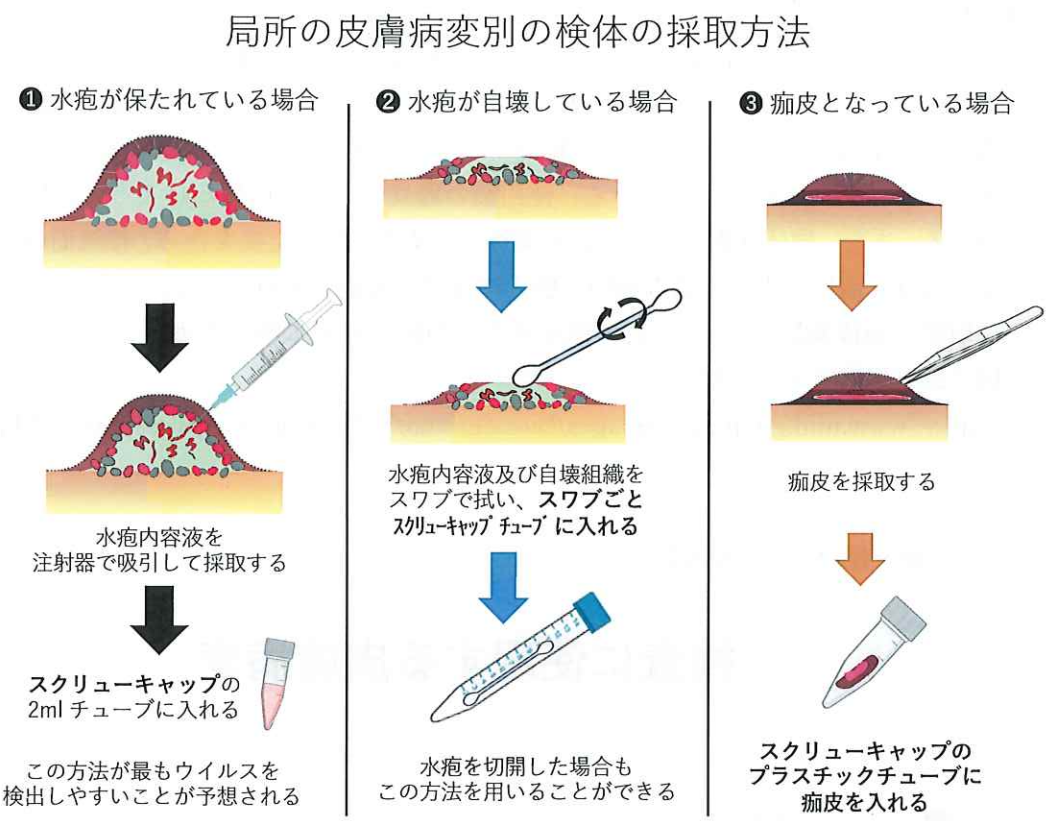


図 2　皮膚検体の採取方法



3． 検体の処理等

3-1. 検体処理時の防護

検体処理は BSL2 にて行ない、更に個人防護具を強化して行なうことが望まれる（特に痘そうワクチンを受けていない者が作業を行なう場合には強く推奨される)。検体は安全キャビネット内で取扱い、操作中は標準的な個人防護具に加えタイベックスーツまたは長袖ガウン（水を通さない/通しにくい背面開き型)、手袋（2重)、マスク（サージカルマスクで良い)、キャップ、そして目の防護具を着用すること等が望まれる。

3-2.検体の処理

3-2-1.水疱（膿疱）内容物の場合

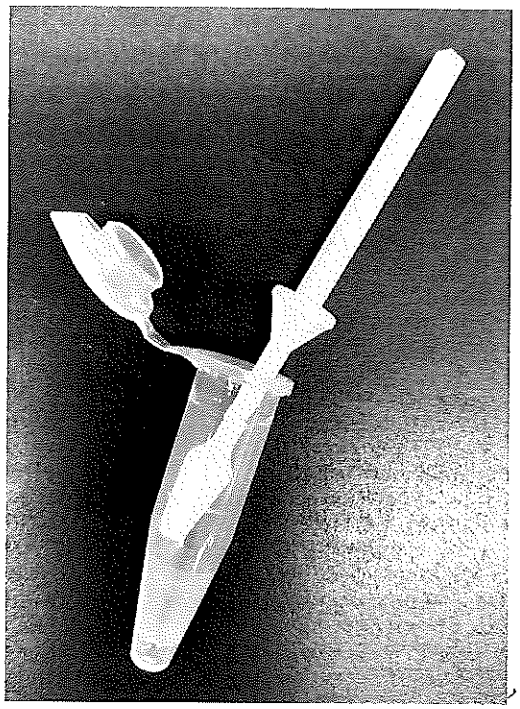
3-2-1-1.内容物全量をスクリューキャップ付きの 1.5mL チューブ、又はそれと同等のチューブに移動させる。ここに適量の PBS（生理食塩水でも可、量は 500μL 等）を添加しピペットなどを用いて混合する。その後 2000 x g で三分間遠心した後上清を各種検査（PCR 検査、ウイルス分離、電顕等）に供する。ペレットおよび上清の残余はディープフリーザーで保存する。

3-2-3.水疱（膿疱）内容物スワブの場合

3-2-3-1.適量の PBS（生理食塩水でも可、量は 500μL 等）が入った 1.5mL チューブにスワブを入れ、付着物を浮遊させる。その後 2000 x g で三分間遠心した後上清を各種検査（PCR 検査、ウイルス分離、電顕等）に供する。ペレットおよび上清の残余はディープフリーザーで保存する。

3-2-4.水疱、膿疱、痂皮の場合

3-2-4-1.水疱、膿疱、痂皮を適量の PBS（生理食塩水でも可、量は 500μL 等）で適度にほぐす。例えばバイオマッシャーII（写真参照）を用いる場合、添付の撹拌棒を用い 10 回程度手動で擦るようにしてほぐす。組織片が完全には崩れないことが多いが構わない。ホモジナイザー等の機器を用いるとエアロゾルを発生する可能性があるので用いないこと。


バイオマッシャーII

3-2-4-3. 2000 x g で三分間遠心した後上清を各種検査（PCR 検査、ウイルス分離、電顕等）に供する。ペレット（組織片）および上清の残余はディープフリーザーで保存する。

3-2-4-4. 検体処理に使用した機材の消毒

サル痘ウイルスはエンベロープを有し、一般的な消毒法であるアルコール（消毒用アルコール）、0.5%次亜塩素酸ナトリウム、ホルマリン、紫外線、オートクレーブによって、容易に不活化される。検体処理時に使用した機材の消毒を適切に行い、処理後の検体から生じた廃棄物、使い捨てのものはオートクレーブバッグに回収後オートクレーブ処理をする。

4. 病原学的検査

4-1.リアルタイム PCR

本病原学的検査は二種類のリアルタイム PCR で行う。1 つはオルソポックスウイルス属ウイルス全般（サル痘ウイルス、牛痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ラクダ痘ウイルス、ヤギ痘ウイルス、痘そうウイルス）の A3L 遺伝子または H2R 遺伝子をターゲット領域とする SYBR Green 法を用いた系（4-1-3 参照）、もう一つは 2 色の蛍光プローブを用いたサル痘ウイルスの F3L 遺伝子（FAM による検出）と水痘帯状疱疹ウイルスの ORF38 遺伝子（VIC による検出）をターゲット領域とするマルチプレックス系（4-1-4 参照）である。二種類のリアルタイム PCR 両方の検査結果を元に判定を行うが、これらは反応条件が異なるため 2 台の機器で並行して、あるいは個別に行なう必要がある。

4-1-1.必要な試薬や機器（同等品で代替可）

核酸抽出キット（Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit 、Qiagen QIAamp DNA Mini Kit 等）、分子生物学用エタノール、分子生物学用 DW、PCR 用チューブ、PCR キット（QuantiTect Probe PCR Kit 等）、TE（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0）、リアルタイム PCR 装置、プライマー（下記参照）、マイクロピペット

4-1-2. 検体からの核酸抽出

検体の処理については 3-2 を参照。必要液量を核酸抽出に供する。核酸抽出キットのマニュアルに従い、検体中の核酸を抽出する。特に皮膚病変が検体の場合は吸光度計などで濃度測定を行い、抽出液中に核酸が存在することを確認する。精製した核酸を直ちにリアルタイム PCR に供しない場合は-80℃で保管する。

4-1-3.オルソポックスウイルス属ウイルス全般の A3L 遺伝子または H2R 遺伝子をターゲット領域とするリアルタイム PCR（SYBR Green 法）

4-1-3-1. プライマーミックスの作製

後述の PCR 反応液を作製する際に使用する 10x プライマーミックスを作製する。ここでは 100 reaction 分の調製を示す。適宜調製量を増減しても良い。直ちに使用しない場合は-80℃で保管する。年単位での保管が可能である。

A3L

プライマー原液（全て 50μM）	液量（μL）	PCR 反応液中の終濃度（μM）
A3L f2	12.5	0.25
A3L r3	12.5	0.25
H_2O	225	
合計	250	0.25 each

H2R

プライマー原液（全て 50μM）	液量（μL）	PCR 反応液中の終濃度（μM）
H2R f3	12.5	0.25
H2R r1	12.5	0.25
H_2O	225	
合計	250	0.25 each

4-1-3-2. Standard DNA 希釈列の準備

4-1-3-2-1. Standard DNA 希釈列（陽性コントロール DNA 希釈列）、Non-Template Control（Nuclease-free water）を氷上に用意する。

4-1-3-2-2. 配布する Standard DNA（共通スタンダード。サル痘、水痘帯状疱疹ウイルス用スタンダードと同じものである）は痘そうウイルス A3L 遺伝子と H2R 遺伝子の配列からなる Standard DNA を 3μL 中に 10^5 コピー含む。従って Standard DNA 原液 10μL を 90μL の TE で希釈すると溶液 3μL 中に 10^4 コピーDNA が存在することになる。同様に Standard DNA 10μL を 90μL の TE で希釈する操作を繰り返す。これにより、Standard DNA 希釈列を作製する（3μL 中に 10^1 コピー含む溶液まで作製する。10^4 から 10^1 まで）。リアルタイム PCR では、この 10^4 から 10^1 コピーまでを鋳型として使用する。

作製した 10^4 から 10^1 コピーの希釈列については冷蔵保存(-80°C保存が望ましい)であれば 1 週間使用が可能である。

4-1-3-3. リアルタイム PCR 反応液の準備

リアルタイム PCR 反応液を調製する。QuantiTect SYBR Green PCR Kit を用いる場合を示す（1 サンプルあたり、必要な本数分＋α で用意）。

A3L 遺伝子と H2R 遺伝子は、反応液の液量や PCR サイクルは同じだが別々の反応系で検出するため、実際にはそれぞれ別のチューブに用意することになる。

2x QuantiTect SYBR PCR Mix	12.5μL
10x プライマーミックス	2.5μL
H_2O	7μL
Total	22μL

0.2 ml PCR 用チューブに 22μL ずつ反応液を入れる。

4-1-3-4. Standard DNA、Non Template Control、検体の添加

4-1-3-2 で作製した Standard DNA、Non Template Control（ Nuclease-free water）、または検体 3μL をリアルタイム PCR 反応液に加える（計 25μL）。

4-1-3-5. PCR チューブにフタをする。

4-1-3-6 ウェルの壁についている反応液をスピンダウンし、サーマルサイクラーにセットする。

4-1-3-7. リアルタイム PCR 装置の設定

下記の条件設定後ランを開始する。

任意で 45 サイクルの PCR 反応後に Tm 値を求めるためのプログラムを挿入しても良い。サンプル、スタンダードの Tm 値を求めることはプライマーダイマーなどの非特異的な PCR 産物を識別する一助となる。

Temp	Time	Step
95°C	15 min	PCR initial activation
95°C	15 sec	
53°C	30 sec	
72°C	30 sec	
step cycling total 45 cycles		
40°C	30 sec	Cooling

4-1-3-8. 結果の解釈について

40 サイクル以内に Standard DNA の 10^2 コピーのシグナルの立ち上がりが確認されれば本検出系は成立しているとみなす。A3L 遺伝子と H2R 遺伝子のどちらもシグナルの立ち上がりが認められた場合に陽性と判断する。片方のみシグナルが確認された場合は国立感染症研究所ウイルス第一部へ連絡する。

参考　プライマー配列、Standard DNA の配列

リアルタイム PCR のターゲット領域とプライマーの配列

Target gene	プライマー/プローブ名	Sequence (5'-3')
A3L	A3L f2	TTGTAACGATGATGATGCGG
	A3L r3	CGAATGCCATAGAATAAATATCCTTGG
H2R	H2R f3	CGGTTAACGATTGGAAATCATTAACGG
	H2R r1	CCTCGCCTAATAGCTTGCG

Standard DNA 溶液中には以下の二種類の配列を持つ DNA 断片が含まれている。プライマー領域を下線で示す。

Standard DNA	Sequence (5'-3')
A3L (278 bp)	TTGTAACGATGATGATGCGGTAGATCCCCATCTAATGAAGATTATTC ATACTGGATGCTCTCAAGTTATGACAGATGAGGAACAGATATTGGCT TCTATTTTGTCTATAGTTGGATTTAGACCTACGTTGGTTTCTGTGGC TAGACCTATAAACGGCATCAGTTACGATATGAAACTTCAGGCGGCAC CATACATAGTTGTTAATCCTATGAAGATGATCACAACATCCGACAGT CCGATTTCTATCAATTCCAAGGATATTTATTCTATGGCATTCG
H2R (178 bp)	CGGTTAACGATTGGAAATCATTAACGGATAGCAAAACAAAATTAGAA AGTGATAGAGGTAAACTTCTAGCCGCTGGTAAGGATGATATATTCGA CTTCAAATGTGTGGATTTCGGCGCCTATTTTATAGCTATGCGATTG GATAAGAAAACATATCTGCCGCAAGCTATTAGGCGAGG

4-1-4. サル痘ウイルスの F3L 遺伝子（FAM による検出）と水痘帯状疱疹ウイルスの ORF38 遺伝子（VIC による検出）をターゲット領域とするリアルタイム PCR（マルチプレックス系）

4-1-4-1. プライマー・プローブミックスの作製

後述の PCR 反応液を作製する際に使用する 25x プライマー・プローブミックスを作製する。ここでは 100 reaction 分の調製を示す。適宜調製量を増減しても良い。直ちに使用しない場合は-80℃で保管する。年単位での保管が可能である。

プライマー/プローブ原液 （全て 50μM）	液量（μL）	PCR 反応液中の終濃度（μM）
MPXV F3L upper	10	0.2
MPXV F3L lower	10	0.2
VZV ORF38 upper	10	0.2
VZV ORF38 lower	10	0.2
MPXV F3L probe (FAM)	10	0.2
VZV ORF38 probe (VIC)	10	0.2
H2O	40	
合計	100	0.2 each

4-1-4-2. Standard DNA 希釈列の準備

4-1-4-2-1. Standard DNA 希釈列（陽性コントロール DNA 希釈列）、Non-Template Control（Nuclease-free water）を氷上に用意する。

4-1-4-2-2. 配布する Standard DNA （共通スタンダード。オルソポックスウイルス属ウイルス全般用スタンダードと同じものである）はサル痘ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスの Standard を 3μL 中に 10^5 コピー含む。従って Standard DNA 原液 10μL を 90μL の TE で希釈すると溶液 3μL 中に 10^4 コピー存在することになる。同様に Standard DNA 10μL を 90μL の TE で希釈する操作を繰り返す。これにより、Standard DNA 希釈列を作製する（3μL 中に 10^1 コピー含む溶液まで作製する。10^4 から 10^1 まで)。リアルタイム PCR では、この 10^4 から 10^1 コピーまでを鋳型として使用する。
作製した 10^4 から 10^1 コピーの希釈列については冷蔵保存(-80°C保存が望ましい)であれば 1 週間使用が可能である。

4-1-4-3. リアルタイム PCR 反応液の準備
リアルタイム PCR 反応液を調製する。QuantiTect Probe PCR Kit を用いる場合を示す（1 サンプルあたり、必要な本数分＋α で用意)。

2x QuantiTect probe PCR Mix	12.5μL
25x プライマー・プローブミックス	1.0μL
H_2O	8.5μL
Total	22μL

0.2 ml PCR 用チューブに 22μL ずつ反応液を入れる。

4-1-4-4. Standard DNA、Non Template Control、検体の添加
5-4-2.で作製した Standard DNA、Non Template Control（H_2O)、または検体 3μL をリアルタイム PCR 反応液に加える（計 25μL)。

4-1-4-5.PCR チューブにフタをする。

4-1-4-6.ウェルの壁についている反応液をスピンダウンし、サーマルサイクラーにセットする。

4-1-4-7. リアルタイム PCR 装置の設定
下記の条件設定後ランを開始する

Temp	Time	Step
95°C	10 min	PCR initial activation
95°C	15 sec	
63°C	60 sec	
step cycling total 45 cycles		
40°C	30 sec	Cooling

4-1-4-8.結果の解釈について
40 サイクル以内に Standard DNA の 10^2 コピーのシグナルの立ち上がりが確認されれば本検出系は成立しているとみなす。その時、検体については 40 サイクル以降にシグナルが立ち上がっても陽性

と判断する。サル痘ウイルス DNA は FAM による蛍光、水痘帯状疱疹ウイルス DNA は VIC による蛍光が検出される。 FAM のシグナル増幅が認められた場合にはサル痘ウイルス陽性と判断する。VIC のシグナル増幅が認められた場合には水痘帯状疱疹ウイルス陽性の可能性が高いため、国立感染症研究所ウイルス第一部第四室（ヘルペス担当）へ連絡し陽性と見做すかの判断を確認する（本法は水痘の病原体検出マニュアルと方法が異なっており確認を要するため)。
なお、オルソポックスウイルス属 PCR（4-1-3）が陽性、サル痘・水痘帯状疱疹 PCR（4-1-4）が陰性の場合には、サル痘以外のオルソポックスウイルスの可能性があるため、国立感染症研究所ウイルス第一部第一室へ連絡する。

参考　プライマー・プローブ配列 Standard DNA の配列

サル痘 F3L と水痘 ORF38 を検出するリアルタイム PCR のターゲット領域とプライマー/プローブの配列

Target gene	プライマー/プローブ名	Sequence (5'-3')
サル痘 F3L	MPXV F3L upper	CATCTATTATAGCATCAGCATCAGA
	MPXV F3L lower	GATACTCCTCCTCGTTGGTCTAC
	MPXV F3L probe	FAM-TGTAGGCCGTGTATCAGCATCCATT-MGB
水痘 ORF38	VZV ORF38 upper	AAACCGCACATGATAACGC
	VZV ORF38 lower	GATTAGGACCATCCCCCG
	VZV ORF38 probe	VIC-ACAATGAGTAGTGGCTTTATGGCGAG-MGB

Standard DNA 溶液中には以下の二種類の配列を持つ DNA 断片が含まれている。プライマー領域は下線、プローブ領域は**小文字**で示す。

Standard DNA	Sequence (5'-3')
サル痘ウイルス F3L (79 bp)	GATCCATCTATTATAGCATCAGCATCAGAATCtgtaggccgtgtatcagcatccatt GTCGTAGACCAACGAGGAGGAGTATCTCGA
水痘ウイルス ORF38 (89 bp)	GATCTAAATATAACCTCGTCCGCAAAAAAAACCGCACATGATAACGC GCGGATACaatgagtagtggctttatGGCGAGGATCCCAAATGTCCATTACCCG GGGGATGGTCCTAATCTTCGA

4-2.ウイルス分離

4-2-1. T25 フラスコにサル痘ウイルス感受性細胞（Vero 細胞、VeroE6 細胞、LLC-MK2 細胞、BSC-40 細胞等）を subconfluent にしたものを用意する。

4-2-2.培養上清を DMEM に FCS を 2%加えた培地（DMEM-2FCS）5mL と置換する。培地としては抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）や抗真菌剤（アムホテリシン B）等が添加されたも

のを推奨する。
4-2-3. 3-2（検体の処理）で得られたウイルス分離用の材料（100μL など）を 4-2-2 の培養細胞に添加し、1-3 時間程度培養する。バクテリア等のコンタミネーションを低減させるため、ウイルス分離用の材料をあらかじめ遠心（10000g, 10 分等）し、その上清を細胞に添加しても良い。
4-2-4.上清を除き、5 mL の DMEM-2FCS あるいは PBS で 2 回程度細胞を洗浄する。
4-2-5. 5 mL の DMEM-2FCS 存在下で細胞を最大 7 日間培養する。
4-2-6.細胞変性効果が認められた場合あるいは 7 日間培養した後、培養上清の一部より 4-1（リアルタイム PCR）で示した方法でサル痘ウイルスの遺伝子の存在の有無を調べる。

4-3.電子顕微鏡法によるオルソポックスウイルス感染症の検査（参考検査）
4-3-1.必要な試薬・器具等
マイクロチューブ、ペレットミキサー、マイクロピペット、ピペットチップ、チップ捨て、蒸留水、phosphate buffer (pH7.2, 0.01M)、固定液（2.5%GA 1%PFA in 0.1MPB)、濾紙（小片)、プラスティックディッシュ、ピンセット、適当な大きさに切ったパラフィルム
安全キャビネット、遠心機、透過型電子顕微鏡)
4-3-2.グリッドの準備
200-400 メッシュのグリッド：コロジオン+カーボン膜処理済み、使用時にイオンスパッタ装置による親水化処理を行う
4-3-3.染色液の準備
2% sodium phosphotungstate(pH7.0)：DW20ml にリンタングステン酸 1g を溶かし、0.1N KOH30ml をゆっくり加え濾過して使用。あるいは酢酸ウランを使用してもよい。
4-3-4.検体の準備
ウイルス分離材料用に作製した乳剤上清の一部（0.05 mL 程度）を使用する（例：マイクロチューブ中で検査材料と phosphate buffer の乳剤を作製する。径 5mm のポックに対して 0.3-0.5ml)。不活化を目的として固定液（例：2.5%GA 2%PFA in 0.1MPB）を等量混合する。室温放置 15 分以上。いずれも安全キャビネット内で実施する。
4-3-5.染色手順（いずれも安全キャビネット内で実施する）
4-3-5-1. 固定済みのサンプルを 5,000 rpm, 1 分以上遠心し、材料の上清を採取する（サンプルによっては上清を 2 － 8 倍希釈し、標本を作製した方がよい。サンプルによって適宜工夫する)。
4-3-5-2. パラフィルムに材料上清、蒸留水、染色液（PTH あるいは酢酸ウラン)、蒸留水の順番で各 10-30 μL の水滴を準備する。
4-3-5-3. 材料上清の水滴に親水化処理済みグリッドを裏返しに置き、20-30 秒以上放置する。
4-3-5-4. ピンセットでグリッドを支持し、濾紙で余分な液を吸水する。
4-3-5-5. 次に蒸留水の水滴にグリッドを裏返しに乗せ、すぐに余分な水を吸い取る。(この過程でエンベロープウイルスはエンベロープが壊れ、染色液が内部にはいり内部構造が明確になる。)
4-3-5-6. 続いて染色液の水滴に 10-20 秒インキュベートする。過染に注意すること。
4-3-5-7. ピンセットでグリッドを支持し濾紙で余分な液を吸水する。
4-3-5-8. 10 分間 UV 照射(254nm)し殺菌処理を施す。表・裏いずれも 10 分間照射する。

4-3-5-9. グリッドが乾燥したら透過電子顕微鏡で観察を行う。

4-3-6.評価方法

ウイルス粒子はリンタングステン酸によりネガティブに染色され、250-300nm の大型の粒子として観察される。オルソポックスウイルスは増殖ステージによって形態が異なり（M 型、C 型)、エンベロープで覆われている場合と壊れている場合がある。特異性には欠けるため、オルソポックスウイルス粒子が検出された場合はオルソポックスウイルス感染症との診断にとどめる。パラポックスウイルスやヘルペスウイルスなどと鑑別が可能である。

参考文献 https://www.cdc.gov/smallpox/pdfs/negative-stain.pdf

5.　サル痘の診断基準

次のいずれかが満たされた場合、サル痘と診断する。

・PCR 法によるサル痘ウイルスの遺伝子の検出

・分離・同定によるサル痘ウイルスの検出

いずれの場合もより精密な検査を行なうため国立感染症研究所ウイルス第一部第一室へ連絡する。

なお、電子顕微鏡法による検査ではオルソポックスウイルス感染症との診断にとどめる。

6. 連絡先

国立感染症研究所ウイルス第一部第一室
TEL: 042-848-0771（代表）

国立感染症研究所感染病理部
TEL: 03-5285-1111（代表）

国立感染症研究所ウイルス第一部第四室
TEL: 03-5285-1111（代表）