

# 病原体検出マニュアル

## サル痘ウイルス

第2版

令和4年8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。致死率は約 10%以下とされ、子供、妊婦、免疫不全の状態にある者では致死率は高まる。痘そうと類似点は多いが、重症度や致死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これまでと比べ非常に少なく、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バ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に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。咽頭等の粘膜スワブ、尿、血液、精液からもウイルスが検出された事例が知られている。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	<b>皮膚病変</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>2 箇所以上の皮膚病変から採取。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> </ul>	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鉗を用いて水疱・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	<b>粘膜病変</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>肛門管粘膜、直腸粘膜、陰部粘膜、口腔粘膜等の粘膜疹や潰瘍病変部から採取。</li> </ul>	病変部スワブ	病変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 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。
		組織生検検体	ウイルス検査以外の診断目的で粘膜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。
3	<b>非病変部</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>皮膚・粘膜病変に比べて検出感度は低下するが、サル痘ウイルスが検出されればサル痘と診断可能</li> </ul>	咽頭スワブ、鼻腔スワブ、その他非病変部の粘膜スワブ	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。
		尿、精液、血液	常法に則り採取	尿、精液は滅菌プラスチックチューブに入れ密栓。血液は EDTA 管に採取。冷蔵保管。

### 【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 マスクを含む个人防护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个人防护具の着用は必須である。

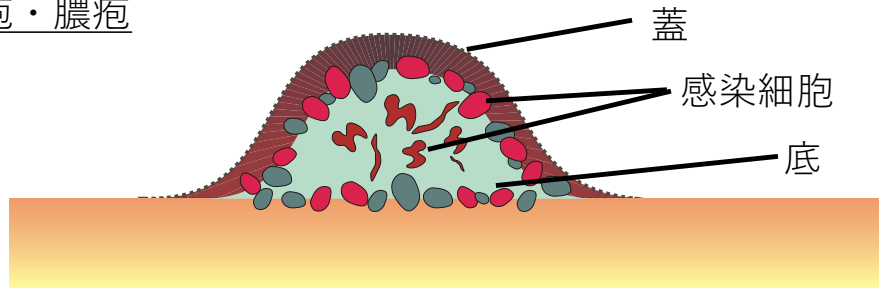
採取後の検体輸送に際しては、検体送付の担当者は必ず検査機関の担当者と打ち合わせること。検体は、原則、基本三重梱包を行ない、公用車・社用車等の自動車または、カテゴリーB に分類される臨床検体等の取扱い可能な輸送業者を利用して送付する。また、飛行機、電車、バス、タクシーなどの公共交通機関を利用して輸送する場合は、航空法および各公共交通機関の約款等ルールを遵守する。なお、核酸抽出液についてはカテゴリーB に分類される臨床検体としての取り扱いは不要となるので、基本三重梱包を目安に適切に梱包する。

\*カテゴリーB に分類される臨床検体等の梱包・運搬時の注意事項等は「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(2021年3月19日更新版)」を参照のこと。

図 1 検査検体を採取する皮膚病変

## 検査に使用する皮膚病変

### ● 水疱・膿疱



### ● 痂皮

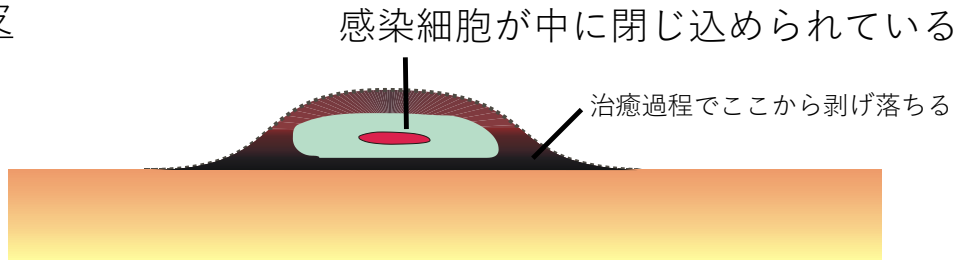
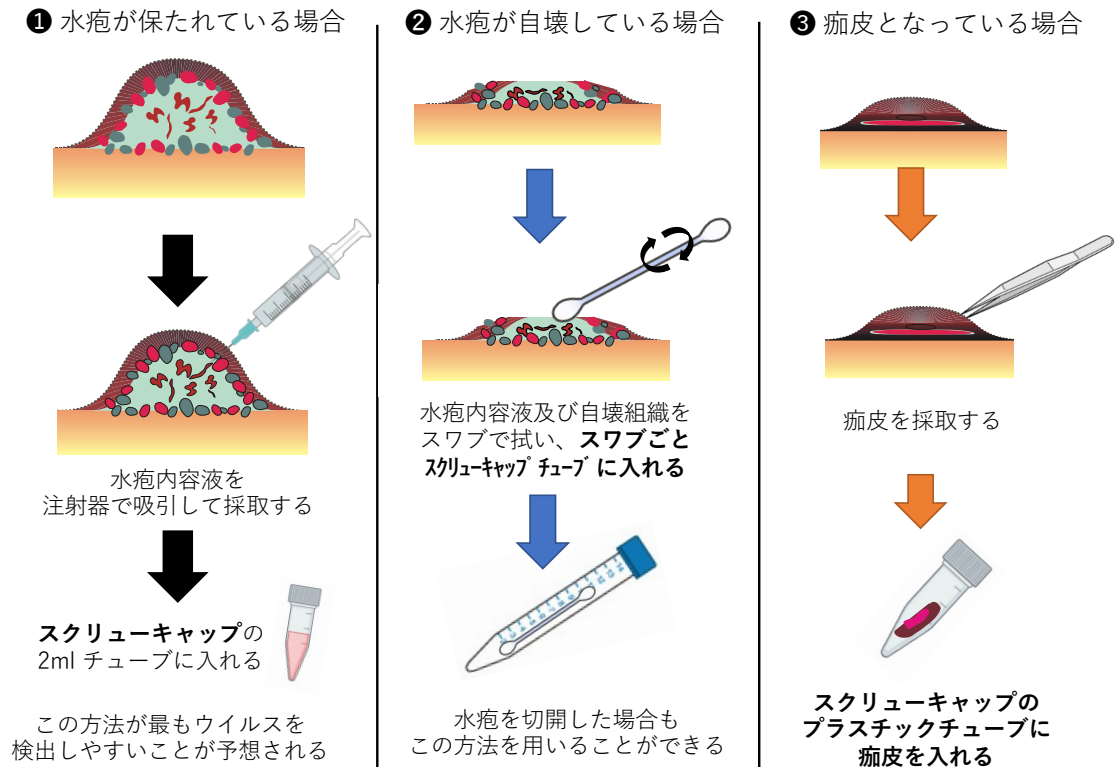


図 2 皮膚検体の採取方法

### 局所の皮膚病変別の検体の採取方法



## 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 500 $\mu$ L 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 500 $\mu$ L 等）が入った 1.5mL チューブにスワブを入れ、附着物を浮遊させる。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 500 $\mu$ L 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、添付の攪拌棒を用い 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°C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°C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 50 $\mu$ M）	液量（ $\mu$ L）	PCR 反応液中の終濃度（ $\mu$ M）
A3L f2	12.5	0.25
A3L r3	12.5	0.25
H <sub>2</sub> O	225	
合計	250	0.25 each

## H2R

プライマー原液 (全て 50 $\mu$ M)	液量 ( $\mu$ L)	PCR 反応液中の終濃度 ( $\mu$ M)
H2R f3	12.5	0.25
H2R r1	12.5	0.25
H <sub>2</sub> O	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 3 $\mu$ L 中に 10<sup>5</sup> コピー含む。従って Standard DNA 原液 10 $\mu$ L を 90 $\mu$ L の TE で希釈すると溶液 3 $\mu$ L 中に 10<sup>4</sup> コピー DNA が存在することになる。同様に Standard DNA 10 $\mu$ L を 90 $\mu$ L 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 (3 $\mu$ L 中に 10<sup>1</sup> コピー含む溶液まで作製する。10<sup>4</sup> から 10<sup>1</sup> まで)。リアルタイム PCR では、この 10<sup>4</sup> から 10<sup>1</sup> コピーまでを鋳型として使用する。

作製した 10<sup>4</sup> から 10<sup>1</sup> コピーの希釈列については冷蔵保存 (-80 $^{\circ}$ 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 +  $\alpha$  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	12.5 $\mu$ L
10x プライマーミックス	2.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ L
<hr/>	
Total	22 $\mu$ L

0.2 ml PCR 用チューブに 22 $\mu$ L 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 3 $\mu$ L をリアルタイム PCR 反応液に加える (計 25 $\mu$ L)。

### 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ドウンし、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	プライマー名	Sequence (5'-3')
A3L	A3L f2	TTGTAACGATGATGATGCGG
	A3L r3	CGAATGCCATAGAATAAATATCCTTGG
H2R	H2R f3	CGGTAAACGATTGGAAATCATTAACGG
	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)	<u>TTGTAACGATGATGATGCGGT</u> AGATCCCCATCTAATGAAGATTATTC ATACTGGATGCTCTCAAGTTATGACAGATGAGGAACAGATATTGGCT TCTATTTTGTCTATAGTTGGATTTAGACCTACGTTGGTTTCTGTGGC TAGACCTATAAACGGCATCAGTTACGATATGAACTTCAGGCGGCAC CATACATAGTTGTTAATCCTATGAAGATGATCACAAACATCCGACAGT CCGATTTCTATCAATT <u>CCAAGGATATTTATTCTATGGCATT</u> CG
H2R (178 bp)	<u>CGGTAAACGATTGGAAATCATTAAACGG</u> ATAGCAAACAAAATTAGAA AGTGATAGAGGTAACTTCTAGCCGCTGGTAAGGATGATATATTCGA CTTCAAATGTGTGGATTTCCGGCGCCTATTTTATAGCTATGCGATTG GATAAGAAAACATATCTG <u>CCGCAAGCTATTAGGCGAGG</u>

#### 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°C 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 3 $\mu$ L 中に 10<sup>5</sup> コピー含む。従って Standard DNA 原液 10 $\mu$ L を 90 $\mu$ L の TE で希釈すると溶液 3 $\mu$ L 中に 10<sup>4</sup> コピー存在することになる。同様に Standard DNA 10 $\mu$ L を 90 $\mu$ L 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（3 $\mu$ L 中に 10<sup>1</sup> コピー含む溶液まで作製する。10<sup>4</sup> から 10<sup>1</sup> まで）。リアルタイム PCR では、この 10<sup>4</sup> から 10<sup>1</sup> コピーまでを鋳型として使用する。作製した 10<sup>4</sup> から 10<sup>1</sup> コピーの希釈列については冷蔵保存(-80 $^{\circ}$ 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 +  $\alpha$  で用意）。

2x QuantiTect probe PCR Mix	12.5 $\mu$ L
25x プライマー・プローブミックス	1.0 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	8.5 $\mu$ L
<hr/>	
Total	22 $\mu$ L

0.2 ml PCR 用チューブに 22 $\mu$ L 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<sub>2</sub>O)、または検体 3 $\mu$ L をリアルタイム PCR 反応液に加える（計 25 $\mu$ L）。

#### 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ドウンし、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 $^{\circ}$ C	10 min	PCR initial activation
95 $^{\circ}$ C	15 sec	
63 $^{\circ}$ C	60 sec	
step cycling total 45 cycles		
40 $^{\circ}$ 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<sup>2</sup> 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（本方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)	GATCC <u>CATCTATTATAGCATCAGCATCAGA</u> ATCtgtaggccgtgtatcagcatccatt GTCG <u>TAGACCAACGAGGAGGAGTATCTCGA</u>
水痘ウイルス ORF38 (89 bp)	GATCTAAATATAACCTCGTCCGCAAAAAA <u>ACCGCACATGATAACGC</u> GCGGATACaagtagtagtgctttatGGCGAGGATCCCAAATGTCCATTAC <u>CCCG</u> 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 (100 $\mu$ L 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)、プラスチックディッシュ、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  $\mu$ L 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。ただし、同じポックスウイルス科の伝染性軟属腫（水いぼ）との鑑別は困難である。

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: 042-561-0771 (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)