

(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、おたふく風邪、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その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、国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所のホームページ（<https://id-info.jihs.go.jp/surveillance/nesvdp/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2040）

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 予防接種研究部 第四室
〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
TEL 03-5285-1111（代）（内線 5349、5351）

◎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

国立健康危機管理研究機構 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

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所長 殿

〇〇県衛生研究所長 殿

私は血液などを『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』に提供する血液が抗体測定に利用され、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

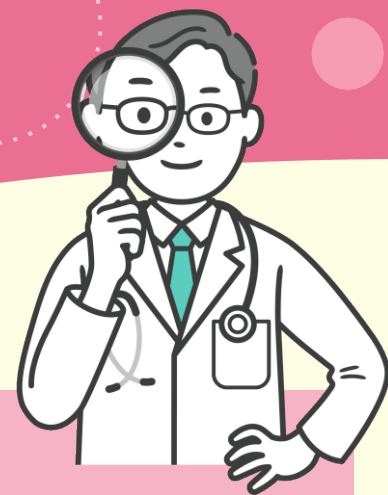
自筆署名

保護者署名 (未成年者の場合)

説明者署名又は記名押印

みなさんの協力が日本の未来の健康を守ります

感染症の抗体検査にご協力ください



なんのための調査？

予防接種によってどのくらいの人が病気にかかりにくくなっているかを調べています

この調査では、

- わたしたちの体にどんな免疫(抗体)があるのか
- どんな感染症が広がっているか

を調べています。その結果は、予防接種の時期の見直しや、感染症対策の計画などに役立てられています。

どんなことをするの？

ご協力の流れはとってもシンプルです！

- ① 説明を聞いて、同意したらサイン
- ② 少しだけ血液を採取(1本程度)
- ③ 年齢やワクチン接種の簡単なアンケートに回答

所要時間：約10～15分程度。費用等はかかりません。

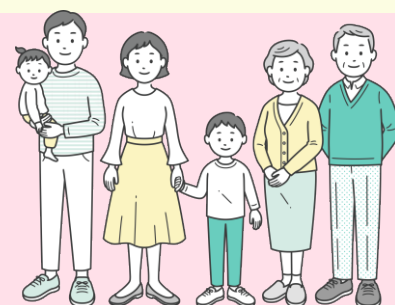
検査対象疾患 ※ 調査実施年、自治体ごとに調査対象疾患が異なります

- ポリオ
- 風疹
- 水痘
- ジフテリア
- おたふく風邪
- インフルエンザ
- 麻疹
- B型肝炎
- 破傷風
- 日本脳炎
- HPV
- 百日咳
- COVID-19



あなたの小さな協力が
大きな役割を果たします

将来の流行を未然に防ぐ



調査のしくみ

感受性調査(抗体の有無を調べる)

同意をいただいた方から採血し、風しんや麻しんなどの抗体が体にあるかどうかを調べます。

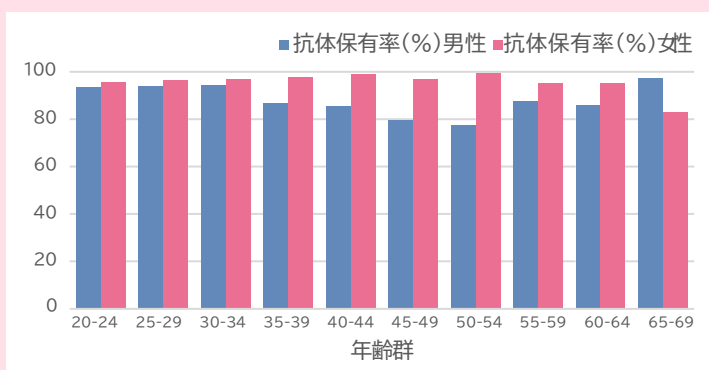


疫学情報との関連付け

年齢・性別・接種歴などの情報と照らし合わせ、どこにリスクがあるかを明らかにします。

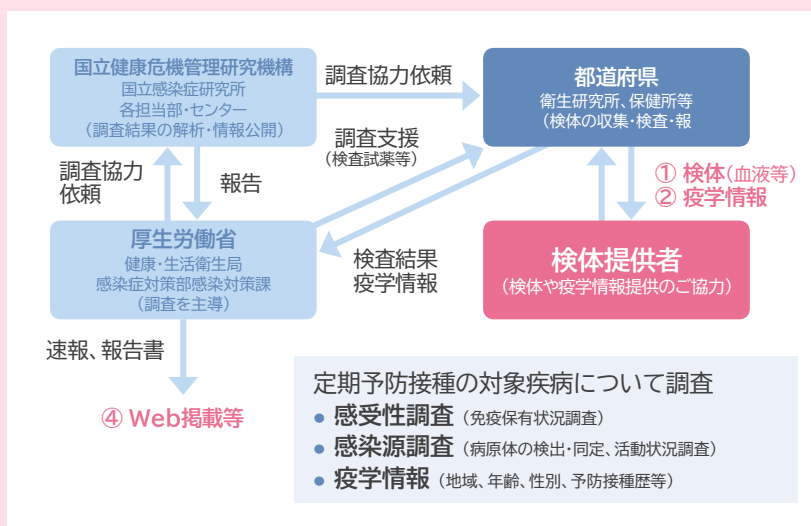
活用されている調査結果の例(風しん)

妊婦さんが風しんにかかると、赤ちゃんが難聴や心臓の病気などを持って生まれる可能性があります。この調査で、40～50代の男性の抗体保有率が少ないことがわかり、無料の追加接種制度(第5期定期接種)が始まりました。このように、調査結果が政策にしっかり活かされています。



実施体制

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。



よくある質問 Q&A

Q 採血は痛いですか？

A 健康診断などと同じくらいです

Q どれくらい時間がかかりますか？

A 数分で終わります

Q 結果は見られますか？

A 結果の返却については自治体ごとに対応が異なります。詳しくはお住まいの自治体または担当者まで確認ください。

これまでの調査結果は国立健康危機管理研究機構感染症情報提供サイトにて公開しています



(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（採血日、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健康危機管理研究機構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、国立健康危機管理研究機構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

◎国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所予防接種研究部第四室
〒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 5349、5351)

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・献血者共用)

『国内血清銀行』への血清提供に関する同意書

国立健康危機管理研究機構 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)

予防接種歴・罹患歴調査票(20歳以上の方用)

参考資料4

回答日: 年 月 日

氏名		性別	男・女	生年月	西暦	年 月 日
居住地	都・道・府・県			年齢	歳 か月	
母子手帳の所持	あり・なし			所属について	医療関係・それ以外	
				採血について	献血・健診・それ以外	

母子健康手帳や記録等を見ながら記入してください。

予防接種歴(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○)	接種回数 (いずれかに○)	最後に接種した年月 (わかる範囲で)	商品名(主なもの)
1. 肺炎球菌(※主に65歳以上を対象とした定期接種)				
肺炎球菌 23価(PPSV23)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	23価莢膜ポリサッカライド (ニューモバックスNP)
肺炎球菌 13価(PCV13)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	プレバナー13
肺炎球菌 15価(PCV15)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	プレバナー15
肺炎球菌 20価(PCV20)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	プレバナー20
肺炎球菌 21価(PCV21)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	プレバナー21
2. ジフテリア・百日せき・破傷風・ポリオ				
2種混合:DT	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	DTビック
3種混合:DPT	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	トリビック
IPV(不活化ポリオワクチン)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	イモバックスポリオ
ポリオ経口生ワクチン(OPV)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—
3. MR・風しん・麻疹				
風しん・麻疹混合(MR)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ミールビック、 はしか風しん混合生ワクチン
風しん・麻疹・ムンプス混合(MMR)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ミムリット(2026年~)
風しん	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—
麻疹(はしか)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—
4. 帯状疱疹(※主に65歳以上を対象とした定期接種)				
帯状疱疹 生ワクチン 通常1回接種	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ビケン
帯状疱疹 不活化ワクチン 通常2か月間隔で2回接種	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	シングリックス
5. 日本脳炎				
日本脳炎	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	エンセバック、ジェービック
6. ヒトパピローマウイルス感染症				
ヒトパピローマウイルス 2価(HPV) 女性のみ接種可能	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	サーバリックス
ヒトパピローマウイルス 4価(HPV)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ガーダシル
ヒトパピローマウイルス 9価(HPV)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	シルガード
7. インフルエンザ				
季節性インフルエンザ 2025/26シーズン 2025年10月から本日までの接種歴	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—
季節性インフルエンザ(不活化高容量75歳以上) 2025/26シーズン 2025年10月から本日までの接種歴				
8. 新型コロナウイルス感染症				
特例臨時接種(最大7回) ~2024年3月31日までの接種歴	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—
2025/26シーズン 2025年10月から本日までの接種歴 (※主に65歳以上を対象とした定期接種)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—

裏面につづきます。

表面からつづきます。

罹患歴（これまでにかかった病気の種類や時期など）

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	西暦 年 月	新型コロナウイルス感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月
ジフテリア	有り・無し・不明	西暦 年 月	ヒトパピローマウイルス感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月
破傷風	有り・無し・不明	西暦 年 月	水痘（水ぼうそう）	有り・無し・不明	西暦 年 月
ポリオ	有り・無し・不明	西暦 年 月	B型肝炎	有り・無し・不明	西暦 年 月
麻しん（はしか）	有り・無し・不明	西暦 年 月	ロタウイルス感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月
風しん	有り・無し・不明	西暦 年 月	おたふくかぜ	有り・無し・不明	西暦 年 月
日本脳炎	有り・無し・不明	西暦 年 月	髄膜炎菌感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月
インフルエンザ菌感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月	A型インフルエンザ (2025年10月～採血日)	有り・無し・不明	西暦 年 月
肺炎球菌感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月	B型インフルエンザ (2025年10月～採血日)	有り・無し・不明	西暦 年 月
帯状疱疹	有り・無し・不明	西暦 年 月	インフルエンザ（型不明）(2025年10月～採血日)	有り・無し・不明	西暦 年 月

その他の予防接種歴（子ども時代には定期接種ワクチンでなかったものなど）

※以下では、子どもの頃には定期接種でなかったワクチンなどの接種歴をおたずねします。

ワクチン	接種の有無 (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)	商品名(主なもの)
1. 肺炎球菌				
肺炎球菌 7価 (PCV7)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	プレベナー
2. ポリオ				
4種混合: DPT-IPV	①阪大ビケン	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月 ①テトラビック
	②KMバイオロジクス	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月 ②クアトロバック
	③第一三共 (北里第一三共)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月 ③スクエアキッズ
	④製造所までは不明	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月
3. ヒブ（インフルエンザ菌b型, Hib）（※冬季の季節性インフルエンザとは異なります）				
ヒブ（インフルエンザ菌b型）	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	アクトヒブ
4. 水痘				
水痘	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	乾燥弱毒生水痘ワクチン
5. B型肝炎				
B型肝炎	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ビームゲン、 ヘプタバックス-II
6. おたふくかぜ（ムンプス）				
おたふくかぜ (MMR以外)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	おたふくかぜ生ワクチン
7. RSV				
RSV(アブリスボ:ファイザー)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	アブリスボ
RSV(アレックスビー:GSK)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	アレックスビー
RSV(メーカー等不明)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	

その他の予防接種歴（予備欄）

上記以外のワクチンの接種歴がある方は、ご記入ください。

ワクチン名	接種回数 (いずれかに○)	最後に接種した年月 (わかる範囲で)
	不明・わかる(回)	西暦 年 月
	不明・わかる(回)	西暦 年 月
	不明・わかる(回)	西暦 年 月
	不明・わかる(回)	西暦 年 月

ご協力ありがとうございました。

予防接種歴・罹患歴調査票（19歳以下の方用）

回答日： 年 月 日

氏名		性別	男・女	生年月	西暦	年	月	日
居住地		都・道・府・県		年齢		歳		か月
母子手帳の所持	あり・なし		所属について	医療関係・それ以外				
			採血について	献血・健診・それ以外				

母子健康手帳や記録等を見ながら記入してください。

予防接種歴（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○)	接種回数 (いずれかに○)	最後に接種した年月 (わかる範囲で)	商品名	
1. ヒブ（インフルエンザ菌b型，Hib）（※冬季の季節性インフルエンザとは異なります）					
ヒブ（インフルエンザ菌b型）	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	アクトヒブ	
2. 小児用肺炎球菌					
小児用肺炎球菌 7価 2013年4月～11月のみ定期接種でした	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	プレベナー	
小児用肺炎球菌 13価 2013年11月～2024年9月まで定期接種でした	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	プレベナー13	
小児用肺炎球菌 15価 2024年4月より定期接種となりました	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	バクニューバンス	
小児用肺炎球菌 20価 2024年10月より定期接種となりました	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	プレベナー20	
3. ジフテリア・百日せき・破傷風・ポリオ					
2種混合:DT	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	DTビック	
3種混合:DPT	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	トリビック	
4種混合: DPT-IPV	①阪大ビケン（ビケン）	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	①テトラビック
	②KM/バイオロジクス	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	②クアトロバック
	③第一三共（北里第一三共）	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	③スクエアキッズ
	④製造所までは不明	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	
5種混合:DPT-IPV-Hib 2024年4月より定期接種となりました	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ゴービック、クイントバックなど	
IPV（不活化ポリオワクチン） 2012年9月より定期接種となりました	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	イモバックスポリオ	
ポリオ 経口生ワクチン（OPV） 2012年9月より定期接種から外れました	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	経口生ポリオワクチン	
4. MR・風しん・麻しん					
風しん・麻しん混合（MR）	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ミールビック、はしか風しん混合生ワクチン	
MMR新規	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ミムリット(2026年～)	
風しん	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	乾燥弱毒生風しんワクチン	
麻しん(はしか)	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—	
5. 日本脳炎					
日本脳炎	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	エンセバック、ジェービック	
6. ヒトパピローマウイルス感染症					
ヒトパピローマウイルス 2価（HPV） 女性のみ接種可能	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	サーバリックス	
ヒトパピローマウイルス 4価（HPV）	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ガーダシル	
ヒトパピローマウイルス 9価（HPV）	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	シルガード	

裏面につづきます。

ワクチン	接種の有無 (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)	商品名
7. 水痘				
水痘 2014年10月より定期接種となりました	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	乾燥弱毒生水痘ワクチン
8. B型肝炎				
B型肝炎 2016年10月より定期接種となりました	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ビームゲン、 ヘプタバックス-II
9. ロタウイルス				
ロタウイルス 1価(飲むワクチンです) 2020年10月より定期接種となりました	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ロタリックス
ロタウイルス 5価(飲むワクチンです) 2020年10月より定期接種となりました	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	ロタテック
10. インフルエンザ				
季節性インフルエンザ 2025/26シーズン 2025年10月から本日までの接種歴	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—
経鼻インフルエンザ 2025/26シーズン 2025年10月から本日までの接種歴	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	フルミスト
11. 新型コロナウイルス感染症				
特例臨時接種 ～2025年3月31日までの接種歴	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—
2025/26シーズン 2025年10月から本日までの接種歴	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	—
12. おたふくかぜ(ムンプス)				
おたふくかぜ	受けた・受けてない・不明	不明・わかる(回)	西暦 年 月	おたふくかぜ生ワクチン

罹患歴(これまでにかった病気の種類や時期など)

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	西暦 年 月	新型コロナウイルス感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月
ジフテリア	有り・無し・不明	西暦 年 月	ヒトパピローマウイルス感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月
破傷風	有り・無し・不明	西暦 年 月	水痘(水ぼうそう)	有り・無し・不明	西暦 年 月
ポリオ	有り・無し・不明	西暦 年 月	B型肝炎	有り・無し・不明	西暦 年 月
麻疹(はしか)	有り・無し・不明	西暦 年 月	ロタウイルス感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月
風しん	有り・無し・不明	西暦 年 月	おたふくかぜ	有り・無し・不明	西暦 年 月
日本脳炎	有り・無し・不明	西暦 年 月	髄膜炎菌感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月
インフルエンザ菌感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月	A型インフルエンザ (2024年10月～採血日)	有り・無し・不明	西暦 年 月
肺炎球菌感染症	有り・無し・不明	西暦 年 月	B型インフルエンザ (2024年10月～採血日)	有り・無し・不明	西暦 年 月
帯状疱疹	有り・無し・不明	西暦 年 月	インフルエンザ(型不明) (2024年10月～採血日)	有り・無し・不明	西暦 年 月

その他の予防接種歴(予備欄)

上記以外のワクチンの接種歴がある方は、ご記入ください。

ワクチン名	接種回数(いずれかに○)	最後に接種した年月(わかる範囲で)
	不明・わかる(回)	西暦 年 月
	不明・わかる(回)	西暦 年 月
	不明・わかる(回)	西暦 年 月
	不明・わかる(回)	西暦 年 月
	不明・わかる(回)	西暦 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)を定期的に取り出し、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。

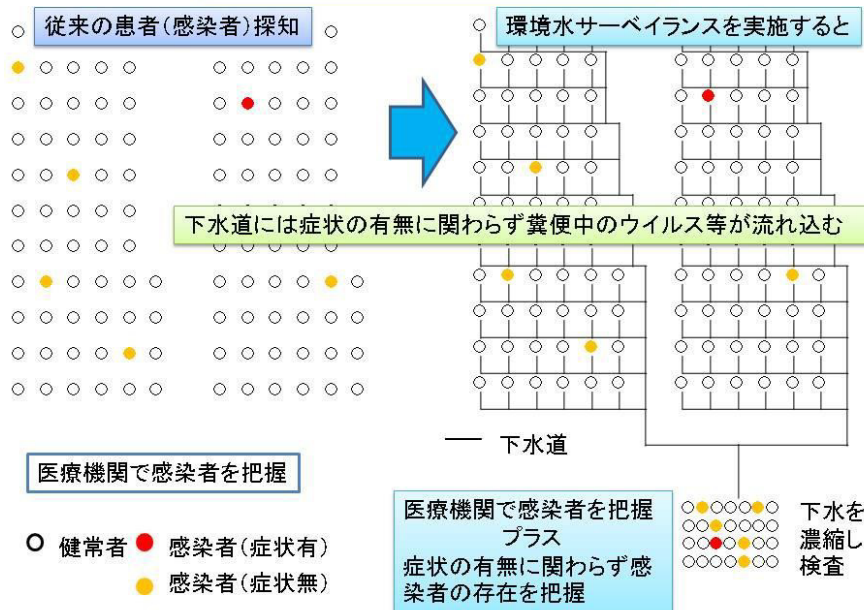
ポリオについて

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だけの情報であり、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

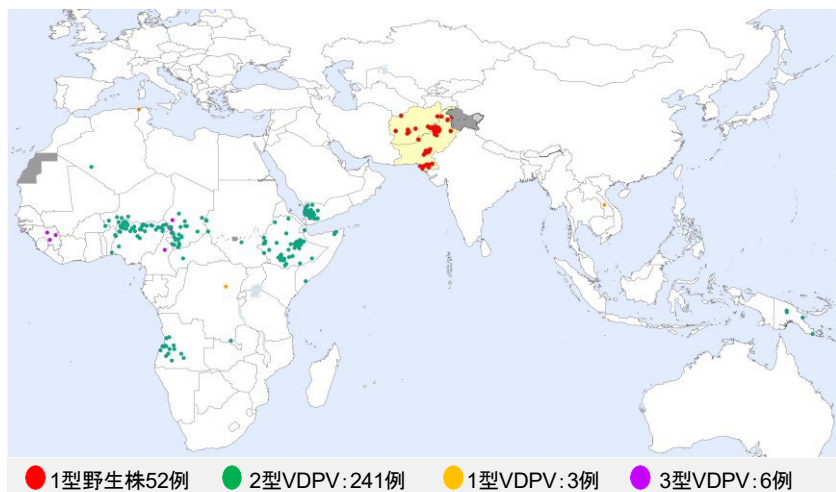
ポリオウイルス感染後、ウイルスは糞便中に排出されます。しかし、その多くは不顕性感染であるため、ウイルス保有者の検知は困難です。世界では、いまだ野生型(左下図)、そしてワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)感染による患者が報告されています。

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。



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)、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→**2回/月**）

(イ) 採水場所を増やす（1箇所→近隣の数カ所）

(2) 強化の期間

6ヶ月間を目途とします。

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) 数週の間隔に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→月2回)

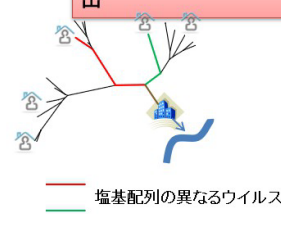
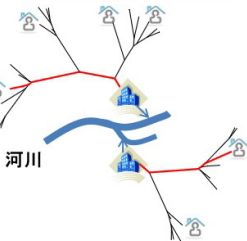
別の下水処理場でも採水/検査

(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

住民
下水処理場
下水網



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

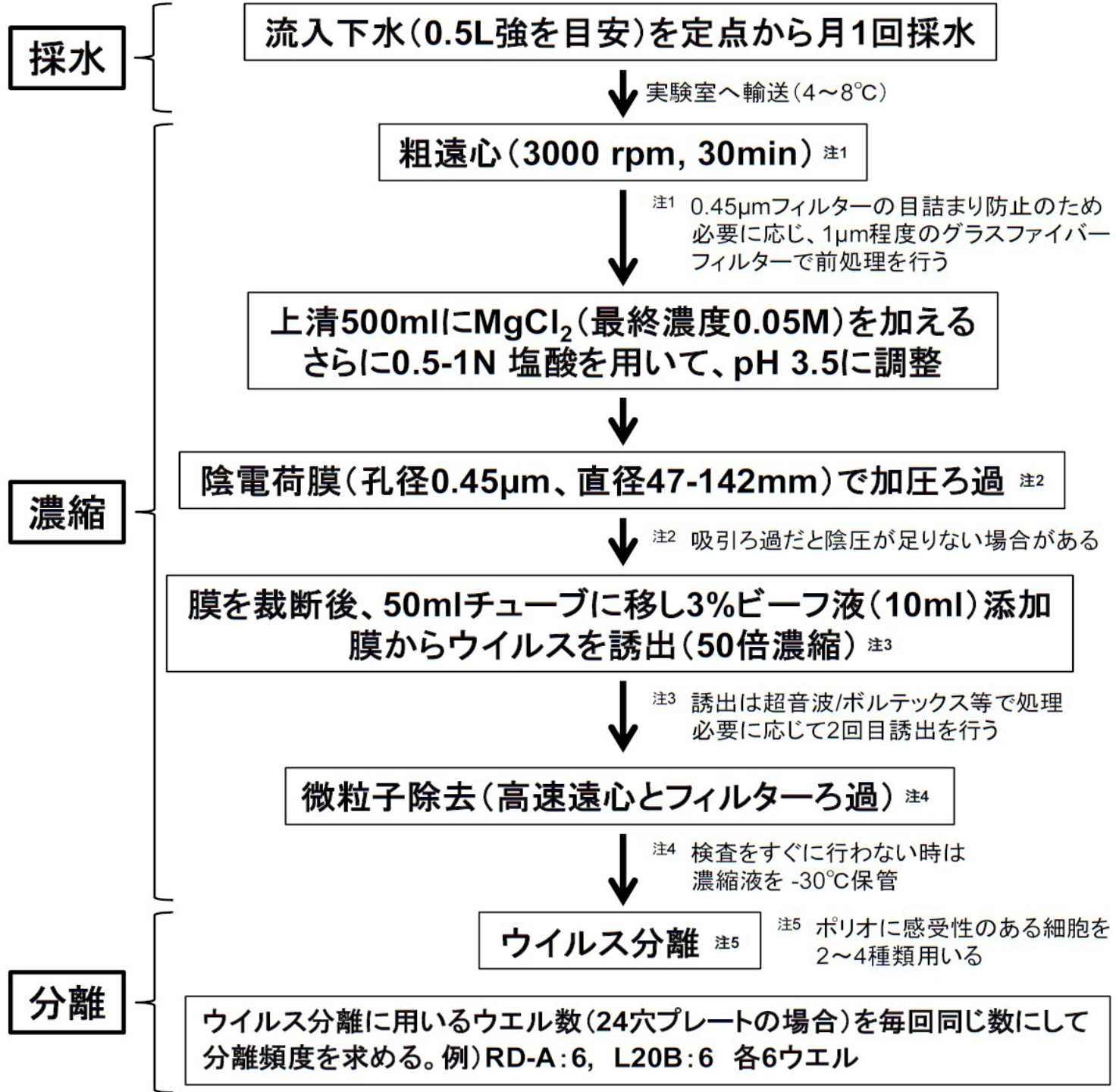
複数の遺伝子配列を持つウイルスが検出された場合

(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

陰電荷膜を用いた 流入下水濃縮の例

- 濃縮倍率は下水処理場対象地域の人口に基づき適宜調整 (50-100倍)
- 濃縮倍率を上げることでウイルス検出率は上昇する



(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健康危機管理研究機構国立感染症研究所(以下、感染研)予防接種研究部に連絡すると共に、速やかに検体を感染研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 → 2回/月)
- (イ) 採水場所を増やす(1箇所 → 近隣の数カ所)

(2) 強化の期間

6ヶ月を目途

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予防接種研究部に連絡する。また、検体(分離株)は確定診断のため速やかに感染研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

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

CPE 出現例 (2-3 代継代後)

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="radio"/> 検体からウイルス分離の可否
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(その名)を入力 ※『その他』を選択した場合は同じ番号の(その名)を入力 ※『その他』を選択した場合は同じ番号の(その名)を入力
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、
1-ウイルス型 (その他)	<input type="text"/> ださい ※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"/>

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 ※半角数字
下水処理場名(必須)	〇〇浄化センター ※採水地
関連市町村名	※下水処理
採水日(必須)	2022年7月1日
検査日	2022年7月10日
分類結果(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欄に「ウイルス名(その他)」を入力
1-ウイルス型	CB5 ※半角5文字 ※型別不能の場合は「NT」と入力
1-ウイルス名(その他)	※「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3文字 ※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: #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確認されているので「+」

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、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つた場合

#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	※半角5字以内。型別不能の場合、または「ウ
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	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
編 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

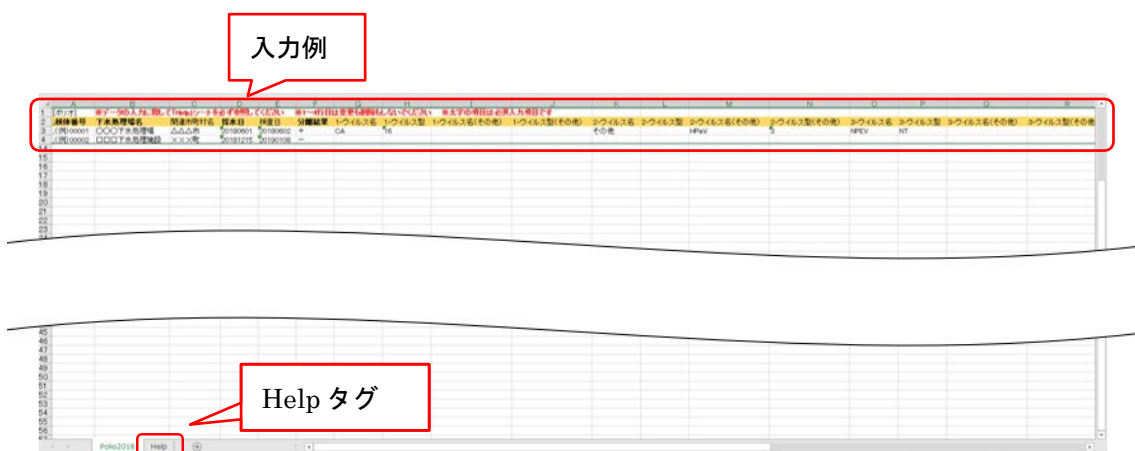
年度 (西暦) 2022 表示

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"/> インフルエンザ感染症	2022年5月20日～2023年6月30日	インフルエンザ感染症
<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 ファイルの選択 ファイルが選択されていません

確認 メニューへ戻る

- (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&mp%3BisAllowed=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
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン 100 µg/ml ストレプトマイシン
アンフォテリシンB	25 µg/ml
Albumin Solution 35% in DPBS(BSA)	0.50 %
NaHCO ₃ (7.5%(W/V))	8800 mg/l
HEPES Buffer Solution	0.01 M
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。

(参考資料 12)

ウイルス分離用培地

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 µg/ml ストレプトマイシン	5 ml
アンフォテリシンB	2.5 µg/ml	5 ml
ゲンタマイシン (GIBCO #15710064)	5 µg/ml	250 µl

(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6 版) (令和7 年9 月) に準ずる (<https://id-info.jihs.go.jp/relevant/manual/010/influenza20251002v2.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' -TGACAGRATYGGTCTTGCTTTAGCCAYTCCA
MP-96-75ProbeAs 5' -(FAM) ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG (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 TMPPrimer-F1 5' -GGAGCAACCAATGCCAC
NIID-TypeB TMPPrimer-R1 5' -GKTAGCGGTCTTGACCAG
NIID-TypeB Probe2 5' -(FAM) ATAACTTYGAAGCAGGAAT (MGB)

PCR 産物の長さ： 105bp

2. リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) 反応例

TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG 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)

試薬	容量(μl)	最終濃度
4×TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	5	1×
Forward primer (10 μM)	1.2	0.6 μM
Reverse primer (10 μM)	1.2	0.6 μM
Probe (5 μM)	0.4	0.1 μM
RNase-free water	7.2	
RNA template	5	
Total 容量	20 μl	

—QuantStudio 5 (Applied Biosystems, 以下 QS5)、LightCycler 480 システム II (Roche, 以下 LC480II) 又は、LightCycler PRO システム (Roche, 以下 LCPro) を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度 (°C)	時間	Ramp Rate (°C/sec)**	Acquisition Mode**
UNG 反応*	1	25	2 分		
逆転写反応	1	50	15 分	4.4	None
PCR 初期変性	1	95	2 分	4.4	None
PCR	45	95	3 秒	4.4	None
		60	30 秒	2.2	Single
冷却**	1	40	30 秒	2.2	None

*LCII および LCPro を使用する場合には、UNG 反応 (25°C) は設定できないが、PCR 反応への影響はない。

**LC480II 又は LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

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)

試薬	容量(µl)	最終濃度
2×RT-PCR Buffer	12.5	1×
25×RT-PCR Enzyme Mix	1	
RNase inhibitor (20 Units/µl)	0.1	
Forward primer (10 µM)	1.5	0.6 µM
Reverse primer (10 µM)	1.5	0.6 µM
Probe (5 µM)	0.5	0.1 µM
RNase-free water	2.9	
RNA template	5	
Total 容量	25 µl	

—QS5、LC480II 又は LCPro を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度 (°C)	時間	Ramp Rate (°C/sec)*	Acquisition Mode*
逆転写反応	1	50	10 分	4.4	None
PCR 初期変性	1	95	10 分	4.4	None
PCR	45	95	15 秒	4.4	None
		56	30 秒	2.2	Single
		72	15 秒	4.4	None
冷却*	1	40	30 秒	2.2	None

*LC480II 又は LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

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	歳	月	年齢(1歳未満は必須) 日
性別(いずれかに○)	男性・女性・不明		
臨床診断名	該当する診断名に○をつけてください。 該当の診断名以外は臨床診断名その他となります。 臨床診断名その他は5つ以内を記載してください。選択し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 (該当に○ 複数選択可)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・不明		
臨床診断名その他: 上記以外の臨床診断名を記載(5つまで)	①()	②()	③() ④() ⑤()
その他診断名選択肢	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, 癲癇, 以上でない場合は自由記載		
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 日 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 日 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 日 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 日 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 日 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		
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1(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		

検体の種類が複数の場合には裏面へ記載してください。

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2(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3(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4(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5(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									

参考資料15

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	歳	月齢(1歳未満は必須)	か月
性別(いずれかに○)	男性・女性・不明		
臨床診断名	該当する診断名に○をつけてください。 該当の診断名以外は臨床診断名その他となります。 臨床診断名その他は5つ以内を記載してください。選択し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(該当に○ 複数選択可)	髄膜炎・肺炎・敗血症・菌血症・不明		
臨床診断名その他:上記以外の臨床診断名を記載(5つまで)	①()	②()	③() ④() ⑤()
その他診断名選択肢	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, 痲痺, 呼吸困難, 痙攣, 以上にはない場合は自由記載		
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、接種歴を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・PCV20・PPSV23・PCV21・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、接種歴を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・PCV20・PPSV23・PCV21・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、接種歴を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・PCV20・PPSV23・PCV21・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、接種歴を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・PCV20・PPSV23・PCV21・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、接種歴を記載してください)	PCV7・PCV13・PCV15・PCV20・PPSV23・PCV21・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		
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1(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_血清型_ワクチン含有 (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1_血清型_ワクチン非含有 (複数の場合は / で区切って記載: 例 11A/11E)			
検体の種類1_型別不能(該当は○)			

検体の種類が複数の場合には裏面へ記載してください。

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2(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_血清型 (いずれかに○)	1・2・3・4・5・6A・6B・7F・8・9N・9V [▲] 11A・12F・14・15B・17F・18C・19A・19F・20・22F・23F・33F			
検体の種類2_血清型_ワクチン非含有 (複数の場合は / で区切って記載:例 11A/11E)				
検体の種類2_型別不能(該当は○)				
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3(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_血清型 (いずれかに○)	1・2・3・4・5・6A・6B・7F・8・9N・9V [▲] 11A・12F・14・15B・17F・18C・19A・19F・20・22F・23F・33F			
検体の種類3_血清型_ワクチン非含有 (複数の場合は / で区切って記載:例 11A/11E)				
検体の種類3_型別不能(該当は○)				
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4(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_血清型 (いずれかに○)	1・2・3・4・5・6A・6B・7F・8・9N・9V [▲] 11A・12F・14・15B・17F・18C・19A・19F・20・22F・23F・33F			
検体の種類4_血清型_ワクチン非含有 (複数の場合は / で区切って記載:例 11A/11E)				
検体の種類4_型別不能(該当は○)				
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5(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_血清型 (いずれかに○)	1・2・3・4・5・6A・6B・7F・8・9N・9V [▲] 11A・12F・14・15B・17F・18C・19A・19F・20・22F・23F・33F			
検体の種類5_血清型_ワクチン非含有 (複数の場合は / で区切って記載:例 11A/11E)				
検体の種類5_型別不能(該当は○)				

ご協力ありがとうございました。

参考資料16

ロタウイルス感染症 感染源調査用 調査票

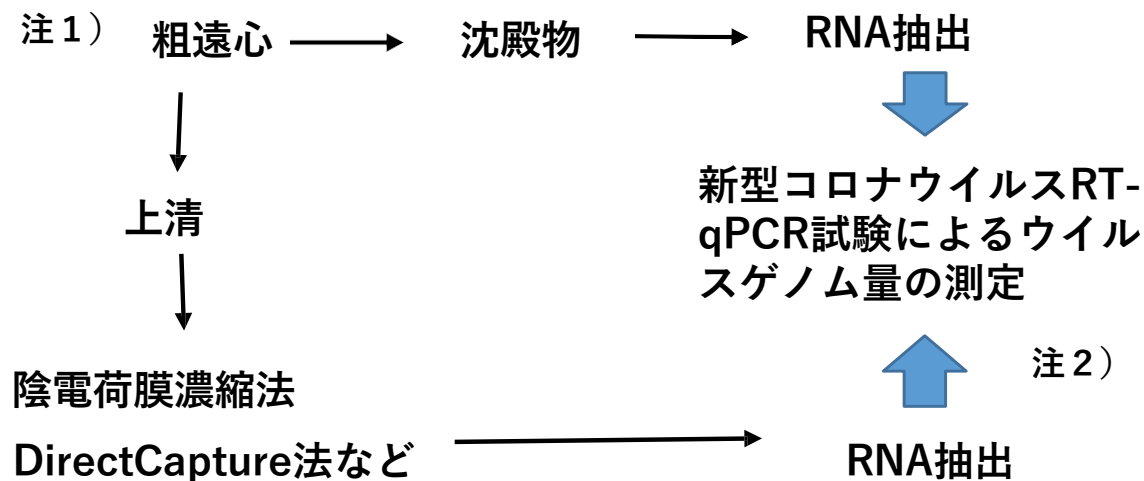
記載日	西暦	年	月	日
番号※都道府県で記入				
年齢	歳	月齢(1歳未満は必須)		か月
生年月日	西暦	年	月	日
性別(いずれかに○)	1:男性 ・ 2:女性 ・ 9:不明			
受診状況	1:一般外来 ・ 2:救急外来 ・ 9:不明			
入院の有無	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
きょうだいの有無	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
保育所・幼稚園 入所 ※未就学児のみ	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
周囲での胃腸炎流行	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
周囲での胃腸炎流行場所(周囲での胃腸炎流行ありの場合に記載。複数選択可)	1:家庭 ・ 2:保育所/幼稚園 ・ 3:学校 ・ 4:その他 不明			
臨床診断				
下痢の有無	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
下痢の回数(1日あたり)	1:0回 ・ 2:1~3回 ・ 3:4~5回 ・ 4:6回以上 ・ 9:不明			
下痢持続日数(日)	1:0日 ・ 2:1~4日 ・ 3:5日 ・ 4:6日以上 ・ 9:不明			
嘔吐の有無	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
嘔吐の回数(1日あたり)	1:0回 ・ 2:1回 ・ 3:2~4回 ・ 4:5回以上 ・ 9:不明			
嘔吐持続日数(日)	1:0日 ・ 2:1日 ・ 3:2日 ・ 4:3日以上 ・ 9:不明			
発熱の有無	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
発熱時の最高体温	0: 37.0℃以下 ・ 1: 37.1~38.4℃ ・ 2: 38.5~38.9℃ ・ 9: 39.0℃以上			
けいれんの有無	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
脳症の有無	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
その他の臨床診断の有無	1:あり ・ 0:なし ・ 9:不明			
その他の臨床診断の詳細(自由記載)				
発症日	西暦	年	月	日

裏面に続きます。

ロタウイルスワクチン接種歴				
ロタウイルスワクチン接種歴 (該当に○をつけてください)	0:なし ・ 9:有り接種回数・種類不明 ・ 99:接種歴不明			
	≪1回のみ接種≫ 1: RV1(ロタリックス)1回 ・ 2: RV5(ロタテック)1回のみ ≪2回接種≫ 3: RV1(ロタリックス)2回 ・ 4: RV5(ロタテック)2回 ・ 5: R1(ロタリックス)1回+RV5(ロタテック)1回(順不同) ≪3回接種≫ 6: RV5(ロタテック)3回 ・ 7: RV5(ロタテック)2回+RV1(ロタリックス)1回(順不同) ・ 8: RV5(ロタテック)1回+RV1(ロタリックス)2回(順不同)			
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)	RV1(ロタリックス)・RV5(ロタテック)	西暦	年 月 日	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)	RV1(ロタリックス)・RV5(ロタテック)	西暦	年 月 日	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)	RV1(ロタリックス)・RV5(ロタテック)	西暦	年 月 日	接種年月不明
検体検査結果				
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。)	1:便 ・ 2:肛門ぬぐい液 ・ 3:その他1(種類名:) ・ 9:不明			
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
ロタウイルススクリーニング(いずれかに○)	1: + ・ 0: -			
ロタウイルスコピー数	. × 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)	判定不能 ・ G1 ・ G2 ・ ヒトG3 ・ ウマ様G3 ・ G4 ・ G9 ・ G12			
ロタウイルス全遺伝子型結果 (実施した場合)				
ノロウイルスGIスクリーニング(いずれかに○)	1: + ・ 0: -			
ノロウイルスGIコピー数	. × 10 [^]			
ノロウイルスGIIスクリーニング(いずれかに○)	1: + ・ 0: -			
ノロウイルスGIIコピー数	. × 10 [^]			
サポウイルススクリーニング(いずれかに○)	1: + ・ 0: -			
サポウイルスコピー数	. × 10 [^]			

(参考資料 17) 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0.5～1.0L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) 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ウェ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

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

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、φ6 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。

(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が考えられる)。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 (0.5~1.0L) を採取する。検体の状態によっては、検出限界未満である可能性もあるため、採水量は 0.5L 以上を用いること。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

下水検査には下水中に含まれるウイルス RNA を得るため、粗遠心後の上清を用いる方法 (濃縮後に RNA 抽出、あるいは直接 RNA 精製) と沈殿画分を用いた方法に大別できる。様々な手法が考案されており、市販の商業キットが利用可能である。利用したキットの情報は、検査法評価の為に利用する場合があるため、記録を残しておくこと。

あらかじめ異なる原理の RNA 精製方法を比較検討し選択することが望ましい。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。

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。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。

PCR反応阻害物質が検査結果に影響を及ぼすことがあるが、完全な除去は困難であるため、測定値の解釈はPMMoVを用いたプロセスコントロールの測定やφ6、VLPを用いる添加回収試験などを実施し、検査結果の妥当性を総合的に判断することが望ましい。

また、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。

(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。月 1 回流入下水 (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 (φ 6 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。

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。

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 (0.45 μm)、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 (1 μm) (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 0.45 μm、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℃, 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℃, 20 分) 後、乾燥させる。

注) シリンジ濃縮の場合 100 ml 当たり、フィルター1枚を使用。500 ml 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 50 ml チューブ等を用いて粗遠心 (3000 rpm、30 分、4℃)。
- ② 上清 (500 ml) 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(1um)を用いて微粒子を除去する工程を加える。
- ③ ビーカーをマグネスティクス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 50 ml 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 50 ml 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 3000 rpm (15 min, 4℃) で遠心。
- ⑯ 上清を各々 0.45 μm 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℃)。
- 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。

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 μ L-1,000 μ L)、ディスポザルピペット (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℃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。
(注釈) 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℃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。
(注釈) 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℃）。

(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。

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。

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 μ L-1,000 μ L)、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)。

10^7 ストックから 100 倍希釈で 10^5 、以下、EASY Dilution 45 μ L で 10^0 まで段階希釈 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 の4つを 5 μ L ずつ陽性コントロールとして使用 ($5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^0$)。

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 μ L、2 穴以上を用いて測定)

40 μ L x (サンプル+陰性+陽性コントロール+ α 注積)

(注積) サンプル分 (あるいは全体の 10%) 余分に作成しておくといよい。

試薬	容量 (μ L)	1 サンプル当たりの調整量 (μ L)
RT-qPCR Mix (2 \times)	10	20
Primer/Probe mix (SARS-CoV-2) (10 \times)	2.0	4.0
ROX Reference Dye/Dye II* (50 \times)	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いる。このため、検査毎に検査結果の妥当性を評価するため、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を必ず実施する。この PMMoV の検出濃度は、新型コロナウイルスRNA検出の補正值として使用する。

加えて、疑似ウイルス粒子 (VLP) や ϕ 6 添加によるウイルス回収試験測定を妥当性評価の Internal Control として利用することができる。

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) PMMoV をマーカーとするプロセス評価試験

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-Step 試薬を用いたリアルタイムPCR法による PMMoV の検出

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

TTATGGCATACACAGTTACCAGTGGTAATGGTAGCTGTGGTTTCAAATGAGAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGAGAGGCTACCGA
AGCAAATGTCGCACTTGCAATTGCAACCGACAATTACATCAAAGGAGGAAGGTTTCGTTGAAGATTGTACGTGGGCTACAACTCCTTA
ACC

1-Step 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	×1
For. PMMV-FP1-rev (20μM)	0.2	0.2 (μM)
Rev. PMMV-RP1 (20μM)	0.2	0.2 (μM)
PMMV-Probe1 (5μM)	0.8	0.2 (μM)
ROX Dye II	0.1	×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 $\phi 6$ 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 $25\mu\text{L}$ 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 $50\mu\text{L}$ 以上で混合・調製する。
(例) 1×10^4 GC/ μ L $5\mu\text{L}$ + TE Buffer $45\mu\text{L}$ = $50\mu\text{L}$
- 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 $20\mu\text{L}$ 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 $40\mu\text{L}$ 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

- q PCR (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 (5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 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： 5×10^4 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