

[戻る](#)

## WHOが公表した重症急性呼吸器症候群(SARS)の「伝播確認地域」 (「最近の地域内伝播」が疑われる地域)

### お知らせ

本日をもって伝播確認地域の更新を終了します。  
なお、今後は、WHOが新たに地域を指定した場合には、更新を行っていく予定です。

( 7月15日現在 印)

7月15日現在 なし

7月5日現在～  
なし  
(台湾を削除)

7月2日現在～  
台湾  
(トロントを削除)

6月24日現在～  
トロント、台湾  
(北京を削除)

6月23日現在～  
トロント、北京、台湾  
(香港を削除)

6月13日～  
トロント、北京、香港、台湾  
(広東省、河北省、湖北省、内モンゴル自治区、吉林省、江蘇省、山西省、陝西省、天津を削除)

(5月分は削除しています)

(注1) WHOが示す、重症急性呼吸器症候群(SARS)の「最近の地域内伝播」が疑われる地域の定義

感染の発生した環境にかかわらず、最近20日以内に、その地域内での感染が強く疑われる複数のSARS可能性例が報告された地域

---

[トップへ](#)

---

[戻る](#)

東南アジア等で流行している「重症急性呼吸器症候群」関連情報

[戻る](#)

資料2

健感発第0701002号  
平成15年7月1日

各 検 疫 所 長 殿

結核感染症課長  
( 公 印 省 略 )

重症急性呼吸器症候群（SARS）に関する検疫所の対応について

標記については、平成15年4月3日付健感発第0403002号通知等により対応しているところではありますが、SARSの流行も一応の終息に向かい、WHOの指定するSARSの地域内伝播が疑われる地域も台湾及びトロントのみとなったことから、当分の間、SARSの検疫体制を下記の通りとすることとしましたので、遺漏のなきようよろしくお願いいたします。

なお、SARSの再流行の可能性も指摘されていることから、今後とも、引き続き検疫の警戒体制を維持されるよう併せてお願いします。

記

1

WHOの指定するSARSの地域内伝播が疑われる地域からの便について  
WHOの指定するSARSの地域内伝播が疑われる地域からの便による入国者  
に対しては、質問票を機内で配布するとともに、SARS患者との接触の有無を  
確認する。

広東省、香港及び北京からの便について

入院患者が依然として多く、入院先の病院の医療従事者等、SARSに感染するリスクの高い者が日本に入国する可能性の高い地域（広東省、香港、北京）からの便による入国者に対しても機内で質問票を配布し、SARS患者との接触の有無を確認する。

及び 以外の地域からの便について

及び 以外の地域からの便による入国者に対しては、機内及び検疫ブース付近でのアナウンス、ポスターの掲示等により別紙 1 に示した内容の周知を行い、SARS患者との接触の有無について自己申告を求める。

- 2 健康カードの記載事項を別紙 2 に改め、1 及び の便による入国者に対して、質問票を回収する際に配付する。1 の便による入国者に対しては、検疫ブースの付近に配置し、入国者が取り易いようにする。
- 3 原則として、すべての到着便について、サーモグラフィー等を用いた体温測定を実施する。
- 4 WHOの指定するSARSの地域内伝播が疑われる地域から来航する船舶の検疫については、平成15年6月5日付健感発第0605001号における対応を引き続き行い、広東省及び香港から来航する船舶についても同様の対応を行う。

## 日本に入国される方に

SARSの疑いのある人との到着前 10日間以内の接触がある方は検疫官まで申し出てください。

例えば

SARSの疑いがある患者を治療している医療機関で働いたことがある方

同居の家族の方で SARSの疑いで入院した人がいる方

SARSの疑いで入院している患者の見舞いをするなど接触した方

SARSの地域内伝播があった地域に  
滞在された入国者の方へ

入国後は次の注意に従って下さい。

1. SARSの潜伏期間は10日間といわれています。

この間は、念のため、以下のような対応をしてください。

(1)入国後10日間は朝夕の体温測定を実施し、各人の健康状態を確認してください。

(2)下記の症状が一つでもでたら、保健所に相談するか、感染地域からの帰国であることをあらかじめ告げてから医師の診察を受けてください。その際は、マスクを着用してください。

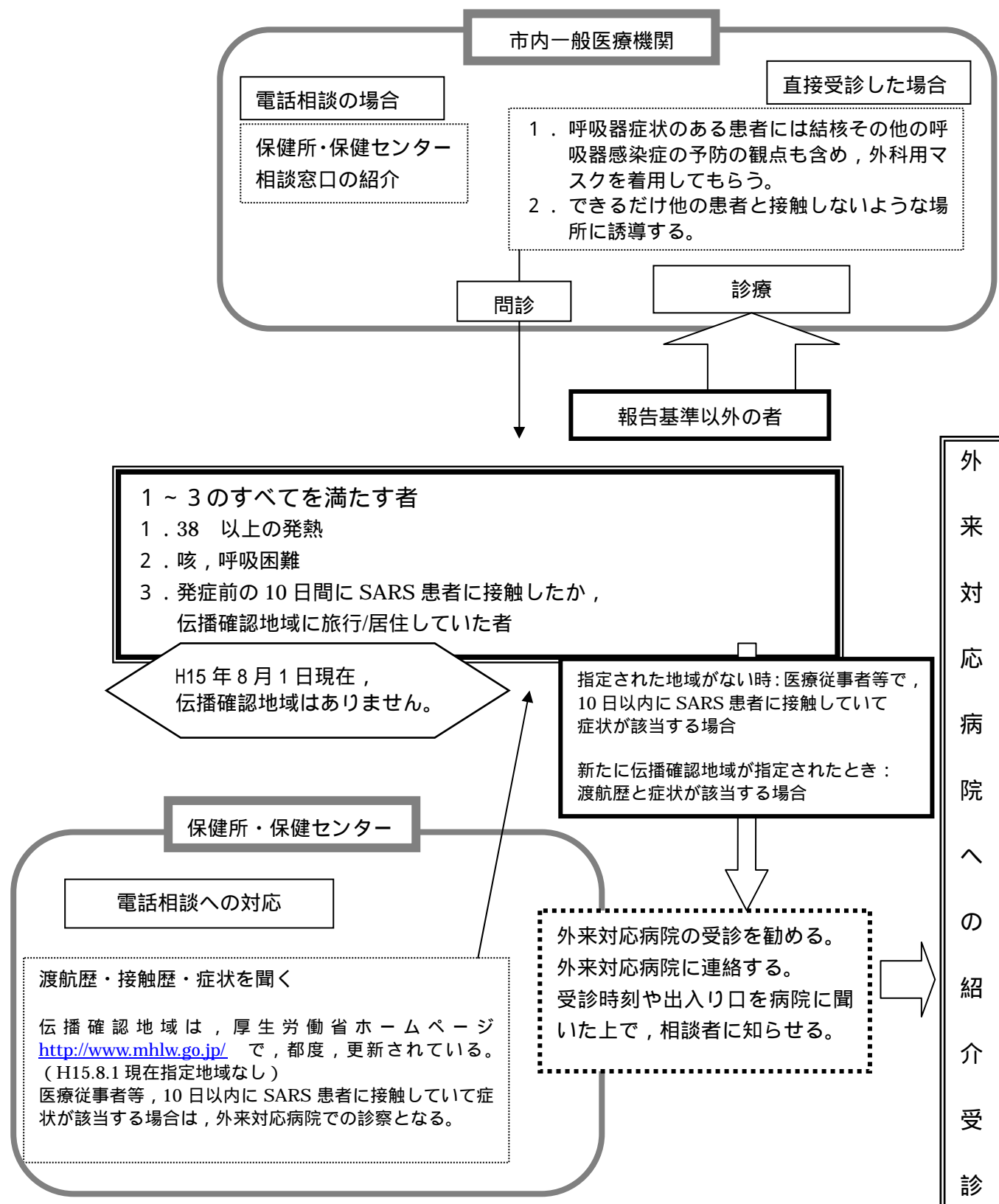
・発熱            ・せき            ・呼吸困難

2. 貴方及び家族を含め貴方が接触した人(特に症状が発生して以後)に症状が発生したら、SARSに感染しているおそれがある旨、事前に医療機関又は最寄りの保健所に電話で相談のうえ、その指示に従って下さい。

厚 生 労 働 省

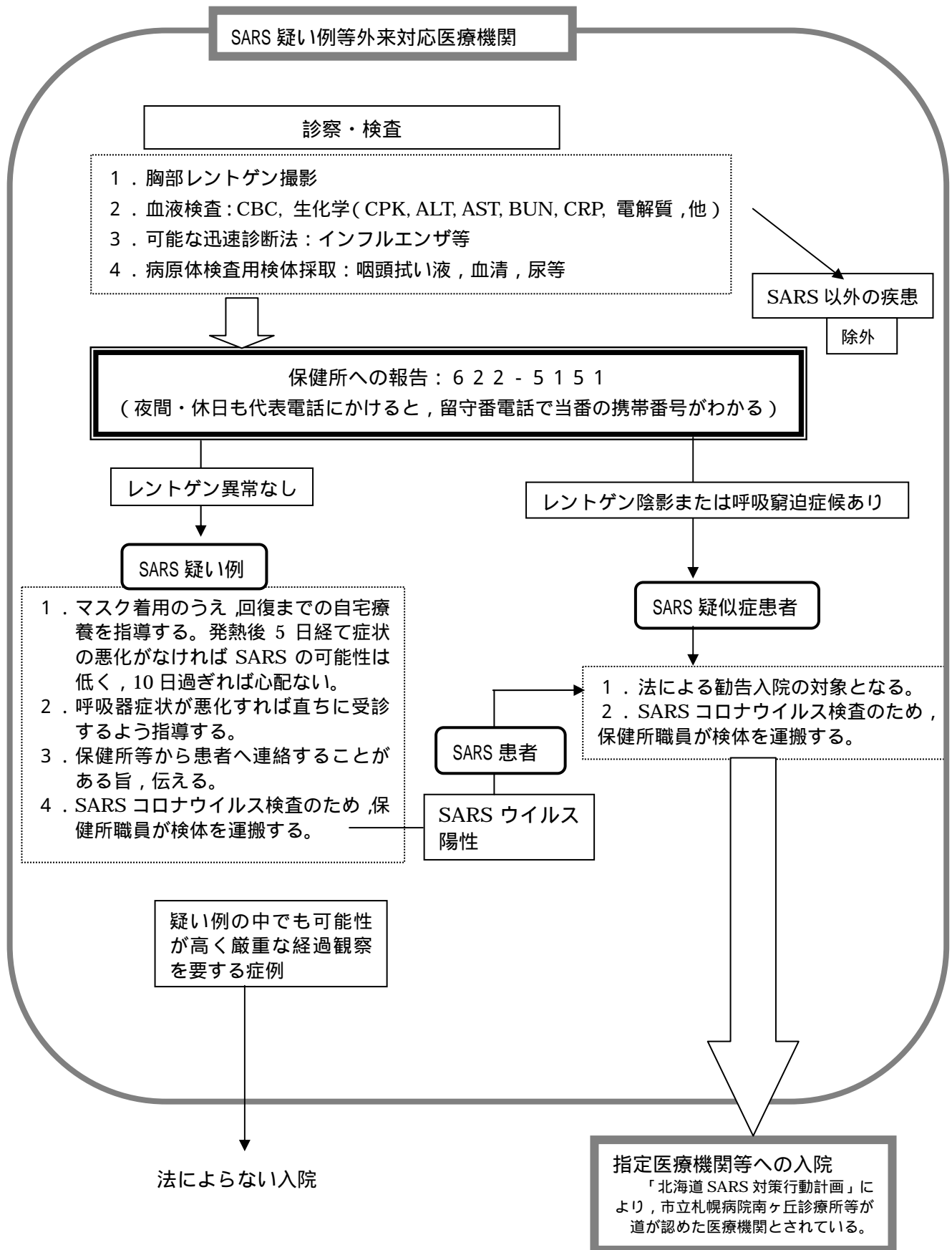
## 伝播確認地域への渡航歴のある患者に対する医療機関連携図（1）

（重症急性呼吸器症候群（SARS）を考慮して）





## 渡航歴のある患者に対する医療機関連携図（２）



## SARS コロナウイルスの行政検査要領

### 1 医療機関における対応

#### (1) 疑い例と可能性例の検体採取

- ① 検体の採取にあたっては、保健所の指示に従う。  
採取前に保健所に連絡し、採取方法、採取至適時期、検体の種類を確認したうえで採取時期を決定し、採取を行う（参考1）。
- ② 採取する検体の種類は、検査指針の3に基づく  
（ウイルス分離同定用検体については、その至適採取時期を考慮し、必ず抗体検査用のペア血清（急性期と発症後21日以降の回復期）を確保する必要がある）
- ③ 疑い例の検体採取にあたっては、事前に本人の了解を得て行う。

#### (2) 検体の送付

- ① 検体の送付に際しては保健所に連絡する。

#### (3) SARS コロナウイルス以外の検査について

- ① SARS コロナウイルス以外の病原体の検査については、従来の基準に従う。

### 2 保健所における対応

- (1) 医療機関から連絡を受けた保健所は、検体の採取方法、採取時期について地方衛生研究所と調整し、地方衛生研究所への検体送付／搬入等の事務を行う。
- (2) 「疑い例」・「可能性例」の報告様式中の症例IDを厚生労働省結核感染症課に確認し、医療機関に教示すると共に、今後の情報管理に使用する。
- (3) (2)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の施行に伴う感染症発生動向調査事業の実施について」（厚生省保健医療局長通知平成11年3月19日付け健医発第458号）に基づいて行う。

### 3 地方衛生研究所における対応

#### (1) 検体の取扱について

- ① 医療機関における検体採取方法（参考1）

医療機関における検体採取方法等について、技術的な支援を行うとともに、搬入／送付時間、方法等を打ち合わせて受け入れ態勢を準備する。

② 医療機関からの検体取扱（参考1）

届いた検体は適切な方法で処理を行い、SARS コロナウイルスの検査を行う場合には、必ずオリジナルの臨床検体を適切な形で-80℃にて保存する。

③ 国立感染症研究所への検体送付方法（参考1）

検体を送付する際には、事前に国立感染症研究所情報センターに検体提出票にて連絡し、入手した検体 ID を検体にラベル貼付して送付する。

(2) 検査方法について

① PCR 検査（参考2）

② ウイルス分離（参考3）

(3) 検査結果の取扱について

① 国立感染症研究所への連絡

検査結果は陰性陽性にかかわらず、感染症情報センターに連絡し、陽性の場合には、確認検査の依頼を行う。

② 管轄の保健所および医療機関への連絡

あらかじめ地域で合意された方法に従って、医療機関および保健所に検査結果とその後の対応を連絡する。

4 国立感染症研究所における対応

(1) 検査方法について

① PCR 検査

SARS-コロナウイルスに特異的なプライマーで RT-PCR を行う。現時点で、感染研で使用しているプライマー、PCR 条件については、参考2を参照。

② ウイルス分離

地衛研から送付されたウイルス分離用検体について、VeroE6 細胞を用いて SARS-コロナウイルスの分離を行う。検体の処理法等については、参考3を参照。

③ 抗体検査

中和試験、ELISA、間接蛍光抗体法などによって、急性期と回復期のペア血清で抗体価の上昇によって判定する。現在、地衛研への配布が可能な抗体検査用の抗原を開発中であるが、当面は、抗体検査は感染研で行

う。なお、血清の採取時期などについては、感染研情報センターHPに掲載する予定である

(2) 検査結果の取扱いについて

① 地方衛生研究所への連絡

RT-PCR、ウイルス分離および抗体検査で陽性結果が確認された場合は、感染研情報センターから速やかに連絡する。

② 厚生労働省への連絡

RT-PCR、ウイルス分離および抗体検査で陽性結果が確認された場合は、感染研情報センターから速やかに連絡する。

**参考**

(以下の参考文献については、国立感染症研究所感染症情報センターホームページで、随時、最新情報を提供中)

<http://idsc.nih.go.jp/others/urgent/update.html>

**参考 1** SARS コロナウイルスに関する検査対応について  
(国立感染症研究所 感染症情報センター)

**参考 2** RT-PCR 法による SARS コロナウイルス遺伝子の検出  
(国立感染症研究所 ウイルス第三部第 1 室)

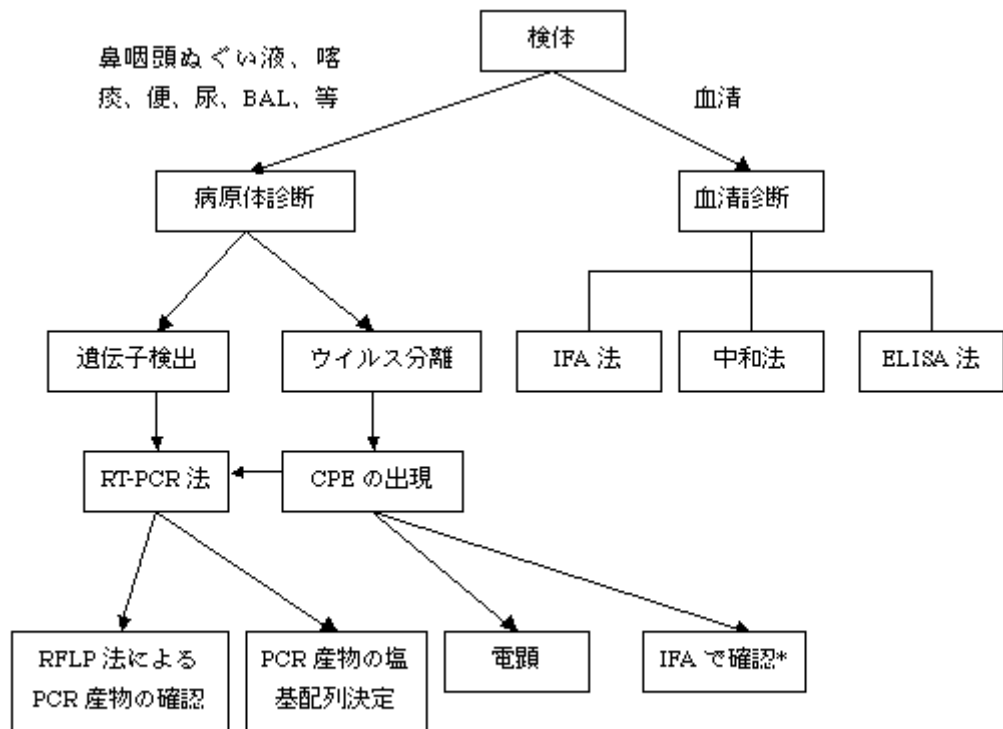
**参考 3** SARS コロナウイルス検出のためのウイルス分離用検体の採取・  
処理法およびウイルス分離  
(国立感染症研究所 ウイルス第三部第 1 室)

## SARS コロナウイルスに関する検査対応について(3訂)

(国立感染症研究所 感染症情報センター)

### 1. SARS における病原体検査方針

- (1) 国立感染症研究所ウイルス第三部第1室(以下感染研)では SARS コロナウイルスに関する特異的検査を行うが、それ以外の既知の病原体の検査は地衛研もしくは病院検査部で行う。
- (2) 疑い例(suspected case)、可能性例(probable case)全員について SARS コロナウイルス特異的ウイルス学的検査を実施する。  
疑い例(suspected)で SARS コロナウイルス特異的検査において、複数の施設の結果が陽性であった場合、その時点で可能性例(probable case)として扱う。
- (3)-1 (SARS コロナウイルス以外の病原体検査)  
すべての疑い例(Suspected case)、可能性例(Probable case)について、原則的には地衛研もしくは病院検査部において、通常の病原体取り扱いに準じて飛沫感染、接触感染の予防に特に留意をしながら BSL レベル2で既知の肺炎を起こす(異型肺炎含む)病原体の一次スクリーニングを行うものとする。これには、一般細菌培養、迅速診断法(連鎖球菌など一般細菌、レジオネラ、クラミジア、マイコプラズマ、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、RS ウイルス、その他について、地域における患者発生状況を考慮して、必要な病原体について検討する)、血清学的方法(マイコプラズマ、クラミジア)を含む。
- (3)-2 SARS コロナウイルスの検査対応



\* 現時点では、SARS コロナウイルス同定用の抗血清が無いため、基本的には RT-PCR 法により同定検査を行う

### (3)-2a (SARS コロナウイルスの分離)

(3)-1 に加えて、すべての疑い例(Suspected case)、可能性例(Probable case)について、ウイルス分離が可能な BSL レベル3施設を有する地衛研では SARS コロナウイルスを目的としたウイルス分離を行う。SARS コロナウイルス分離に使用する培養細胞は VeroE6 とする。LLCMK2 細胞は当初疑われていた human metapneumovirus について感受性があるが、SARS コロナウイルスには感受性はない。CPE が出現した場合には培養上清、培養細胞、当該臨床検体を感染研に送付する。地衛研においてウイルス分離が困難である場合は、臨床検体を感染研に送付する。感染研に送付する場合は、原則として行政検査として対応するため、「5. 検体受付」に基づいて実施する。

### (3)-2b (SARS コロナウイルスの遺伝子検索)

SARS: 診断検査の入手状況と検査方法の実際(5月1日 5訂)

- ・臨床検査結果の解釈に関する提言
- ・SARS の臨床検査に対する提言

<http://idsc.nih.go.jp/others/sars/update45-lab.html> を参照のこと。

地衛研において RT-PCR 法を用いて SARS コロナウイルスの検出を試みる際は、上記マニュアル RT-PCR 法による SARS コロナウイルス遺伝子の検出(国立感染症研究所ウイルス第三部第1室)を参照し実施する。複数の施設での陽性確認が必要であるため、陽性結果が得られた場合は感染研にも検体を送付する。地衛研において実施が困難な場合は、臨床検体を感染研に送付する。送付に際してはウイルス分離と同様行政検査として「5. 検体受付」に基づいて実施する。

## 2. 病原体検査のための検体採取方針

現行の SARS コロナウイルス特異的病原体検査はこれまでの研究成果から得られた方法を用いて、現在日本で実施可能である検体検査です。研究途上の検査方法ですので、今後の研究の進展により、方法あるいは検体採取方法が変更になる場合がありますので、ご留意下さい。そのため、現在のところ**医療上の診断目的としては認可されておらず、また感度が十分とは言えない**場合があります。**陰性であっても疾患としての SARS を否定するものではありません**のでご注意くださいようお願い申し上げます。また、多くの検体依頼が寄せられているため検査結果を迅速に還元できない場合があります。

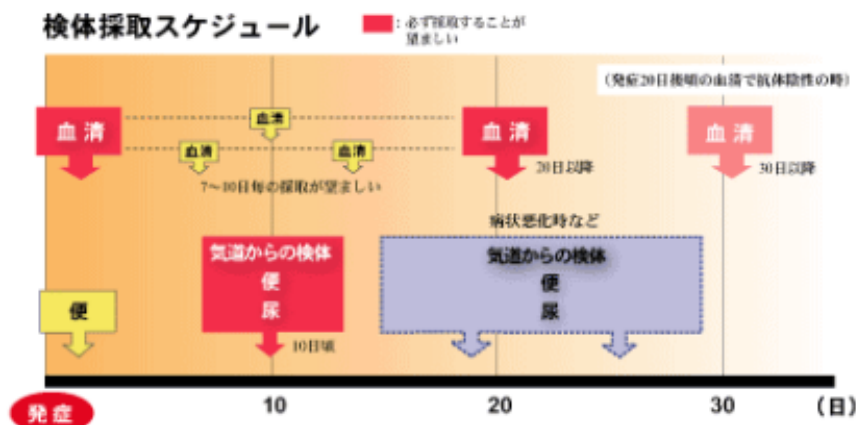
以上のことをご考慮の上、SARS 検査(行政上及び研究目的)への協力を被験者、被験者が小児の場合はその保護者に十分説明の上、**インフォームド・コンセントを頂いた上**でお送り下さいますようお願い申し上げます。

頂いた検体については **SARS コロナウイルス感染の検査及び研究目的以外には使用しない**ことをあらかじめお断りいたします。

1) SARS の診断検査のための検体採取について (Peiris JSM et al.: Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. Lancet 361, 1767-1772, 2003、WHO による重症急性呼吸器症候群 (SARS) 多国同時集団発生の報告 (6 月 2 日、更新第 71 報) 診断検査の現状と中国での研修コース) を参照のこと。

#### 検体の採取時期:

ウイルス量は発症 10 日頃をピークとしているため、発症 10 日後の便、気道からの検体(鼻咽頭ぬぐい液、喀痰等)は必ず採取することが診断上望ましい。また、抗体価測定のための血清は(1) 発症 10 日以内(通常初診時)と(2) 発症 20 日以降(陽性率約 65%)のペアが望ましい。ただし、発症 20-29 日の検体で抗体陰性であった場合は、発症 30 日以降(陽性率約 95%)の検体を必ず採取することが診断上望ましい。



画面をクリックすると拡大します。

- ア) 気道からの検体(鼻咽頭拭い液、喀痰等)は、特に発症 10 日頃の検体が有用である (Peiris et al. Lancet 361, 1767-1772, 2003)。
- イ) 尿は RT-PCR 法を用いても発症早期の場合ウイルスが検出されないため、少なくとも

発症4日以降の検体を用いる。発症10日頃が最も検出率が高いがその場合の検出率も50%との報告あり (Peiris et al. Lancet 361, 1767-1772, 2003)。

- ウ) 便については、RT-PCR法を用いると発症早期より検出が可能であり、発症10日頃をピーク(ほぼ100%検出可能)として、発症1カ月頃まで検出が可能である。尚、発症1カ月後の便の感染性については不明である。
- エ) 血清はできれば1週間毎に1-2mlを冷凍保存し、可能な限り多くの病日で経時的に抗体価を測定する。上記に記載した通り抗体価測定のための血清は(1)発症10日以内(通常初診時)と(2)発症20日以降(陽性率約65%)のペアで必ず採取することが望ましい。ただし、発症20-29日の検体で抗体陰性であった場合は、発症30日以降(陽性率約95%)の検体を必ず採取することが望ましい。

## 2) 検体毎の採取方法と検体送付方法

全ての検体について、48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。48時間以上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。ドライアイスは密閉した容器に入れられないこと。梱包の方法は(送付容器 PDF 版)を必ず参照のこと。

なお、各検体にはラベルID(「5. 検体受付」を参照)を記載したラベルを貼付する。

- (ア)便(発症早期から発症1カ月頃までRT-PCR法で検出可能であるが、発症10日頃の検体の陽性率が最も高くほぼ100%。): 10~50mlの便を50mlの生食に懸濁し、遠心分離後、上清2~3mlを蓋付き容器に入れ、パラフィルムにてシールし、ビニール袋にいれる。
- (イ)喀痰(疾患初期及び病状悪化時の検体): 通常の方法にて、自分で出せる場合には滅菌生理食塩水もしくは水道水で複数回うがいをして口腔内雑菌を除いた後、喀痰を採取してもらおう(唾液の混入は可能な限り避け、口腔内常在菌の混入を抑える。)。密栓できる喀痰専用容器(滅菌済み)に入れてフタをしてジップ付きプラスチック袋に入れて速やかに提出する。検体採取の際は、周りの人に飛沫が飛ばないように、区切られた部屋で行うなどの対策を講じる必要がある。採痰ブース(陰圧)があればより理想的である。人工呼吸器管理の場合には無菌的な操作のもとに、滅菌されたカテーテルを使って気管吸引液を採取する。採痰容器は密栓できる喀痰専用容器(滅菌済み)に採取後、ジップ付きプラスチック袋に入れて速やかに提出する。
- (ウ)鼻咽頭拭い液あるいは鼻咽頭洗浄液/吸引液(疾患初期及び病状悪化時の検体): 通常の方法にて、鼻咽頭拭い液の場合には両方の鼻孔内を、口腔鼻咽頭拭い液の場合には咽頭後壁および扁桃領域を拭い、スワブを2ml [注: 綿棒が乾燥する状態や、大量の液体に浸した状態ではウイルスの検出が困難になります。1.5~2mlであれば綿棒が適度に液体に浸る程度となり、ウイルスの検出に最適です。] のウイルス輸送液体培地、ない場合は生理食塩水内に入れ、柄を折りとったのち、蓋をする。洗浄液/吸引液の場合には、1~1.5mlの生理食塩液を鼻腔内に注入し、その後鼻咽頭分泌物を吸引する。もう一方の鼻孔についても同様に行い、吸引液は清潔試験管にいれる。
- (エ)尿(発症後3日間は検出されないため、少なくとも発症4日以降の検体。発症10日頃の検出率は50%程度で、その後検出率は漸減する。): 50mlの尿を遠心分離し、沈査を2~3mlの上清に懸濁させ、コンカル試験管(ファルコンなど)にいれ、パラフィルムにてシールする。
- (オ)血清(最低限、急性期と発症20日以降の2点): 急性期血清はSARSが疑われた時点で即座に、回復期血清は発症20日以降に採取、輸送する。血液は血清に分離した後、それぞれ血清で1~2ml程度が必要である。できれば、1週間毎に血清を保存し、可能な限り多くの病日の検体を輸送する。



### 3. コロナウイルスについて、SARS コロナウイルスの安定性、抵抗性について

コロナウイルスは、ヒトではこれまで風邪症候群の原因ウイルスの一つでしかなかったが、動物ではかなり様々な病気をおこす。実験動物の分野ではマウス肝炎ウイルス、家畜の分野では豚伝染性胃腸炎、鶏伝染性気管支炎など、愛玩動物の分野では猫伝染性腹膜炎等々がある。コロナウイルスに属するウイルスは3つの血清型に分けられる。ウイルス粒子の表面にはS (spike, surfaceあるいはE2), M (membrane), E (small membrane), HE (hemagglutinin esterase) 蛋白、内部にN (nucleocapsid) 蛋白がある。このうち、HE 蛋白は1部のウイルスにのみ存在する。S 蛋白は中和活性、膜融合、レセプターとの結合を担っている。コロナウイルスの特徴として mutation 及び RNA recombination の頻度が高いことが挙げられる。

検体の採取、検査の実施にあたっては、以下の情報をよく理解しておくことが重要である。WHO 研究施設ネットワークが集積した SARS コロナウイルスの安定性と抵抗性に関する最初のデータ (WHO 5月15日)を参照のこと。

- 1) 37℃で4日間保存すると、検出限界以下にウイルス量は減少する。
- 2) 4℃では、21日目にも感染性が残る。4℃4日間保存のウイルス量は10の5.7乗程度
- 3) 再凍結(-80℃)4日間保存でのウイルス量は10の6.7乗程度。
- 4) 室温でプラスチックなどに乾燥した状態でウイルスが付着していると2日間程度感染性がある。
- 5) 便中、特にpHの高い下痢便中では4日間程度生存する。
- 6) 血清については、56℃30分の通常の処理で感染性はなくなる。
- 7) エタノールでは10分程度でウイルスは不活化する。
- 8) アセトン20分間処理あるいはエーテル10分間処理で、完全にウイルスが不活化されない報告もあり注意が必要。
- 9) 0.1%程度のNP40では20分処理しても感染性が残る(ドイツの研究所からの報告)。
- 10) 石鹼やリタージェントでの感染性の不活化は困難である。

### 4. 感染研での検査の範囲と結果報告

- (1) 感染研において行う検査は、SARS コロナウイルスについての特異的検査とする。
- (2) 暫定的結果の報告は可及的速やかに行うものとする。
- (3) 結果は情報センターを通して、依頼された機関へ報告する。
- (4) 情報センターでは、すべての情報をいれたデータベースを維持し、結果報告の管理も併せて行う。

### 5. 検体受付

- (1) 感染研による検査は、医療機関、保健所、都道府県、地衛研などの合意の元、行政からの依頼によることを原則とする。検体受付は情報センターにおいて、以下の手順で行う。検体


受付時間は、原則として休日を除く勤務時間帯(9:00～17:00)とするが、緊急の場合には個別に対応する。

病院からの直接の問い合わせについては、情報センターにて、ここに記載した原則を説明することとする。

- (2)各自治体の担当者は、まず情報センターへ電話で一報を入れた後、必要事項を記入した「SARSに関する検体提出フォーム(.doc/厚生労働省通知4月7日)」をFAXする(注:症例ID及び検体IDは記入しなくてよい)。この情報に基づき、情報センターは症例ID、検体ID、ラベルIDを記入した「SARS連絡票」を作成し、返信する。今後は、すべての連絡にここに記載されたID番号を使用する。
- (3)検体の輸送は、基本的に天然痘の検査材料の輸送方法(添付2)に準ずるものとし、送付するか、持参するものとする。検体の搬入は、原則として休日を除く午前中着とし、到着予定時刻と方法についてあらかじめ連絡しておく。但し、緊急の場合や搬入時間の多少の遅れについては、個別に情報センターを介してウイルス第三部と相談し、対応する。
- (4)情報センターは、ウイルス第三部へ「SARS連絡票」を送付すると共に、検体搬入予定日時を連絡する。

(添付)検体の送付方法はこの中に詳しく説明されています。

1.「重症急性呼吸器症候群(SARS)管理指針」 (PDF 100K)

2.「検査材料の採取・送付に関する追加情報」 (PDF 64K)

### 連絡先

国立感染症研究所感染症情報センター  
〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1  
TEL03-5285-1111(代)、FAX03-5285-1129

### 検体送付先

国立感染症研究所ウイルス第三部  
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1  
TEL042-561-0771、FAX042-561-0812

(注)この検査対応方針は、現時点までの知見に基づく、暫定的なものであって、今後の新たな知見の発見、あるいは国内の状況によって、随時更新されるものとする。

## RT-PCR法によるSARSコロナウイルス遺伝子の検出

(国立感染症研究所ウイルス第三部)

### はじめに

現在 [WHO webサイト](http://www.who.int/csr/sars/primers/en/) ( <http://www.who.int/csr/sars/primers/en/> ) には、RT-PCR法でSARS-コロナウイルスのポリメラーゼ遺伝子を検出するための約10種類のプライマーセットが公表されている。これらは、特異性は高いものの感度が鈍いという欠点があり、このため使用するプライマーセットによっては偽陰性による見落としの可能性もある。感染研においても、これらプライマーを用いて至適条件を検討しているが、陽性の臨床検体が限られていることから、現在のところ臨床材料から高感度にウイルス遺伝子を検出できる条件を決定するには至っていない。しかしながら、今回各地方衛生研究所等でSARS-コロナウイルスの遺伝子検出試験が実施されるに際して、不完全ではあるが感染研で行っているRT-PCR法について解説し、参考として供することとした。

PCRの感度は使用する酵素のメーカーやPCRチューブの材質、サーマルサイクラーの機種によっても大きく影響を受けることが知られている。現在まで感染研が行った検討においてはNPconS2/As1のプライマーセットを用いると、比較的高感度にウイルス遺伝子を検出できると考えているが、米国 ( CDC )、香港、フランクフルト等の研究施設からSARS-コロナウイルスの全塩基配列が報告されていることから、今後さらに検出感度の高いプライマーの設計、RT-PCR条件の改良等を行っていく予定である。

従って、実施される各地方衛生研究所等の現場担当者の方々からの提案等についても検討をして、共同で検出方法の手順の標準化を行っていきたいので、引き続きご協力をお願い致します。

### <原則>

現時点では、ここに示すプライマーを用いたRT-PCR法は、感度、検体の採取日、個人差等で偽陰性となることがあるので、陰性の検査結果はSARS-コロナウイルス

感染を否定するものではないことに注意していただきたい。

< PCR陽性検体が確認された場合の対応 >

1陽性結果が出た際には、直ちに陽性と判断してはならない。異なる検査施設においてダブルチェックを行うとのWHOの指針に基づいて、最初の臨床検体を感染研に送付し、確認試験を行った上で最終的に判定すること。

2現時点では、PCR陽性となる病日、検体の種類、個人差などの成績が十分に集積していないので、1検体のみでの判定では信頼性が低い。PCRの結果の解釈に関しては、PCRの結果およびウイルス分離結果を、ペア血清における抗体価の測定結果と比較検討していく必要がある。

3PCRで陽性例が検出されたときの具体的な対応としては、異なるプライマーセットで再度PCRを行い、予想されるバンドが増幅されるか確認し、さらに塩基配列の決定によりPCR産物を確認する（詳細はマニュアルを参照）。

< RT-PCR法の実際 >

1. プライマーについて

感染研ではWHO webサイトおよび論文で公表されている約10種類のプライマーについて、分離ウイルスを陽性対照として種々のPCR条件で検出感度を検討した。それらの中で比較的感度が高かったプライマーは表の4セットである。

表 SARS-コロナウイルス検出用プライマー

プライマー	配列	PCR産物	アニーリング温度	検出感度	非特異反応産物	RFUP法
1 NPconS2 NPconAs1	5'-ACCGATGAAAGGAGGTAGTGG 5'-CGGTAGTAGGCGAATTGGTGAAC	251bp <sup>1</sup>	95°C	10 <sup>-1</sup>	ほとんどない	3rdで288bp+83bpに切断
2 SAR1s SAR1as	5'-GCTCTCTGCTGCTGCTGCGAR 5'-TATAGTGAGGCGGCGACAGATG	121bp <sup>2</sup>	95°C	10 <sup>-1</sup>	少ない	PCR産物が短いのでRFUP法には不向きである
3 Cor-p-F2(+) Cor-p-R1(-)	5'-CTAAGCGGTGAGGAAATGGF 5'-GAGGTAGGCGTAAACCGACG	388bp <sup>3</sup>	52°C	10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-8</sup>	検出感度が落ちる	FspIで268bp+100bpに切断
4 Cor-p-F3(+) Cor-p-R1(-)	5'-GCGCTCTCTGCTGCTGCTGCGAR 5'-TATAGTGAGGCGGCGACAGATG	348bp <sup>3</sup>	54°C	10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-8</sup>	検出感度が落ちる	FspIで268bp+80bpに切断

クリックすると拡大します

<sup>1</sup> SARSCoronavirus Urbani の配列を参照  
<sup>2</sup> N.Engl. J. Med. April 10, 2003  
<sup>3</sup> N.Engl. J. Med. May 15, 2003

2 各プライマーセットの感度比較

- NPconS2/As1: 10<sup>-7</sup>
- SAR1s/as: 10<sup>-7</sup>
- Cor-p-F2 (+)/R1(-): 10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-8</sup>
- Cor-p-F3 (+)/R1(-): 10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-8</sup>

### 3 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法による解析

- ・ NPconS2/As1を使用したPCRで得られる陽性産物は、制限酵素XhoIで37℃、1時間処理すると188bp + 63bpに切断される。
- ・ Cor-p-F2 (+)/R1(-)およびCor-p-F3 (+)/R1(-) を使用したPCRで得られる陽性産物は、制限酵素FspI (NEB) で37℃、1時間処理すると以下の泳動像が得られる。
  - Cor-p-F2 (+)/R1(-): 268 bp + 100 bp
  - Cor-p-F3 (+)/R1(-): 268 bp + 80 bp

### 4 PCRの非特異反応産物について

臨床検体のRT-PCRを行う場合しばしば非特異反応が問題となる。感染研におけるSARS-コロナウイルス検査の際も、SARS1s/as、Cor-p-F2 (+)/R1(-)、Cor-p-F3 (+)/R1(-)を使用したPCRで喀痰、尿および便から非特異反応産物を検出した。NPconS2/As1を使用したPCRでは非特異反応産物は見られなかった。

非特異反応産物は、そのサイズが陽性コントロールと明らかに違う場合はそれほど問題にならないと思われる。しかし、似通ったサイズの場合には、RFLP法やシーケンス反応による塩基配列の決定を行う必要がある。

### 5 感染研で現在行っている検体からのRNA抽出およびRT-PCR法の詳細

#### 1) 検査の流れ

- ・ NPconS2/As1で最初のスクリーニングを行う。
- ・ 最初のPCRで陽性が疑われる場合には、
  - PCR産物を制限酵素XhoIで切断し確認する。
  - PCR産物の塩基配列を決定する。
  - 別のプライマーセットで臨床検体またはRT産物から再検を行い、RFLP法による解析および塩基配列の決定を行う。

#### 2) RNA抽出

ウイルスRNAの抽出には市販のキット（例えばQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)）を使用し、方法は添付のマニュアルに準拠している。

#### 検体の処理方法

血清、尿、検体を接種した細胞培養上清等の液体状のサンプルは140 µlをAVL buffer 560 µlと混合し、それ以降のステップに使用している。その他の主な検体の処理方法は以下の通りである。

喀痰：

QIAamp Viral RNA Mini Kitでは検体の粘性を除く前処理を必要とする。検体の粘性を除く方法として以下の方法が報告されている。検体に対して等容のNALCバッファー(0.9% NaCl, 10g/L N-acetyl-L-cysteine)を添加し、穏やかに30分間振盪する。遠心して上清を140  $\mu$ lを抽出に使用する (N Engl J Med. 2003 348:1967-1976)。

鼻咽頭拭い液、洗浄液、吸引液：

140  $\mu$ lをAVL bufferと混合する。洗浄液、吸引液に粘性がある場合は喀痰と同様の処理をする。

便：

適量を5～10倍量の0.89% NaCl溶液に懸濁する。4000  $\times$  gで20分遠心後、上清を0.22  $\mu$ mのフィルターで濾過し、140  $\mu$ lをAVL buffer 560  $\mu$ lと混合する。

組織：

組織からのRNA抽出にはQIAGEN RNeasy Mini Kitを使用している。適量をRLT bufferに入れ、ペッスルで破碎する。20ゲージの注射針をつけた1mlディスプレイザルシリンジで液の出し入れを繰り返し、さらに細かく破碎した後、遠心して上清を使用する。

RNAの溶出

最終的に60  $\mu$ lのAVE bufferで溶出し、50  $\mu$ lを逆転写 (RT) 反応に使用する。

3) 逆転写 (RT) 反応

市販のキット (現在はReady-to-Go RT-PCR Beads\* (Amersham Biosciences)) を使用してRT産物を合成している。プライマーは付属のpd(N)<sub>6</sub> プライマーを0.5  $\mu$ g/ $\mu$ lに希釈して使用する。

\* Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) はOne-stepでPCRまで行うことのできるキットだが、感染研では試薬調製の手間を省くためこれをRT反応に使用し、RT産物の一部を次のPCRに使用している。

RNA 50  $\mu$ l

pd(N)<sub>6</sub> primer (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l

以上をBeadsの入ったチューブに入れる

42 30分

95 5分

5  $\mu$ lをPCRへ、残りを-80 で再検用に保存。

このように精製したRNAからcDNAを合成しておくことによって再検に使用でき、RNAを保存したものより安定した結果が得られる。

#### 4) PCR

市販のキット（PCR Master Mix (Promega)）を使用している。サーマルサイクラーはBioRad iCycler（0.2mlチューブ）を使用している。

RT product	5 $\mu$ l
Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Nuclease free water	18 $\mu$ l
PCR Master Mix, 2 $\times$	25 $\mu$ l

95 4分

95	30秒	} $\times$ 40
52 ~ 56	30秒	
72	1分	

72 7分

（注意1）：本プロトコールで特定のメーカーの商品名を示しているのは、それらの使用を推奨しているものではなく、本研究所での実施条件を明らかにする目的からである。

（注意2）：現在、SARS-コロナウイルス検出用として市販されている種々のPCRキットについては、現時点では性能試験または研究用にのみ使用し、診断用に使用してはならない。

[IDSCホームページへ](#)

---

## SARSコロナウイルス検出のためのウイルス分離用検体の採取・処理法およびウイルス分離

(国立感染症研究所ウイルス第三部第1室)

### <原則>

現時点では、ウイルス分離検査において検体の採取日、個人差等で陰性となることがあるので、陰性の検査結果はSARSコロナウイルス感染を否定するものではないことに注意していただきたい。

1SARS-コロナウイルスは当面、WHOではBSL3で扱うことが決まっている。また、感染研においても現時点ではBSL3で対応することが決まっている。

2SARS関連の患者検体の処理は、BSL 2 またはそれ以上のレベルで行わなければならない。

3細胞への検体の接種は、BSL3で対応しなければならない。従って、必ず安全キャビネット内ですべて処理できるように、また検体の飛散や汚染の拡大が起こらないように工夫する必要がある。

下記に示す方法は通常ウイルス分離検査で行われている方法であり、SARS-コロナウイルスの分離においても基本的には同様の操作で行う。

臨床検体からウイルスの分離率を高めるためには、採取された検体は可能な限り早期に細胞に接種される必要がある。検体採取から細胞に接種するまでは、4℃に冷やしておく。

### 細胞の準備：

VeroE6細胞はSARSコロナウイルスに感受性がある。

96穴のマイクロプレートや24穴のマイクロプレート、細胞培養用カルチャーボトル等にウイルス分離に使用する細胞の単層を作製する。普通3～4日後に単層ができるように細胞を調製して細胞をまく。



## 検体の処理と接種：

### 1. 咽頭スワブ，鼻腔スワブの場合：

#### a) 輸送培地：

[Eagle's MEM(E-MEM)+0.5%ゼラチン + ペニシリンG 500 U/ml，ストレプトマイシン 500  $\mu$ g/ml]

\* 輸送培地に含まれるゼラチンはオートクレーブ処理してから使用する必要があるため、オートクレーブ可能なEagle's MEM (Nissui) などを使用すると簡単に輸送培地を準備できる。

#### b) 検体を培養細胞へ接種後の維持培地

E-MEM + ペニシリンG 500 U/ml，ストレプトマイシン 500  $\mu$ g/ml  
+ 2%FBS

\* 咽頭スワブや鼻腔スワブを滅菌された綿棒で採取したら、輸送培地に攪拌する。一般的に呼吸器ウイルスは細胞内に多く存在するので、できるだけ多く細胞成分を擦過して得るようにする。ただし、スワブを数時間以内に培養細胞に接種できる場合には、スワブのついた綿棒を輸送培地の代わりに維持培地に攪拌してもよい。

#### c) 接種

検体を接種する場合には、細胞をPBSで洗浄してから行う。

スワブが攪拌された輸送培地を4 で、3,000回転15分間遠心し（混在する細菌を除去するため）、その上清液を細胞に接種するための検体とする。

細胞がマイクロプレートで培養されている場合には、維持培地（抗生物質と2%FBS含有D-MEM）を細胞が培養されているウェルに培養に必要な量の半分（96ウェルマイクロプレートの場合は0.1 ml、24ウェルマイクロプレートの場合は0.5 ml）を加えておき、等量の検体を接種する。

ボトルやチューブで細胞が培養されている場合には、検体を細胞全体にひろがるくらい加え、1時間経ってから（検体に含まれていると想定されているウイルスを細胞に吸着させてから）維持培地を適量加えるとよい。

また、複数の患者からの検体を接種する際は、異患者間のクロスコンタ

ミネーションを防ぐために、別のプレートに接種するか、やむなく同一プレートを用いる場合は、接種穴の間隔を十分にとる。

2． 気管洗浄液、鼻腔吸引液および喀痰の場合：

生理食塩水やPBSで得られた気管洗浄液や鼻腔洗浄液の場合には、維持培地で10倍程度に希釈し、4 で、3,000回転15分間遠心して得られた上清液を検体とする。

PBSで洗浄した細胞に、この検体を咽頭スワブや鼻腔スワブの場合と同様に接種する。

3． 尿の場合：

検体である尿を4 で、3,000回転15分間遠心し、その上清液を接種する。

検体を細胞に接種後、37 で1時間培養（吸着反応）する。吸着反応後にPBSで3回洗浄し、適量の維持培地で細胞を培養する。

\* 尿は細胞毒性が比較的強く、吸着反応の時間を30分にしたほうがよい場合もある。

4． 便の場合：

通常の5倍量の抗生物質が入ったPBSで便の懸濁液を作る。マイクロ遠心機で

4 , 6,000回転5分間遠心し、その上清を接種する。細胞毒性が比較的強い場合が多いことから、検体接種後、炭酸ガス孵卵器内で30～60分の吸着が終わったら、PBSで3回以上よく細胞を洗浄することが重要である。

5． 組織の場合（参考）：

約10倍程度の容積の維持培地に肺組織を加え、滅菌された器具を用いて組織を破壊懸濁液を作る。4 で3,000回転15分間遠心し、その上清液を接種する。

吸着時間の後、適量の維持培地で細胞を培養する。

\* 細胞毒性が出ることもあるので、吸着反応後に検体を除去する方がよい場合もある。

6． 血清の場合（参考）：

維持培地で血清を1：10に希釈する。

4 で、3000回転15分間遠心し、その上清を接種する。

吸着時間の後、適量の維持培地で細胞を培養する。

細胞培養および細胞変性効果 ( cytopathic effect, CPE ) の観察 :

検体接種後の細胞の培養は35 ~ 37 が適当と思われる。ちなみに感染研では、37で培養している。

検体接種後には、毎日CPEの出現の有無、細胞の性状を観察する。さらに、SARS関連のコロナウイルスのCPEの出現は接種検体にもよるが比較的早い ( 3 ~ 6 日目 ) と報告されている。必ず非接種細胞を対照として置く。

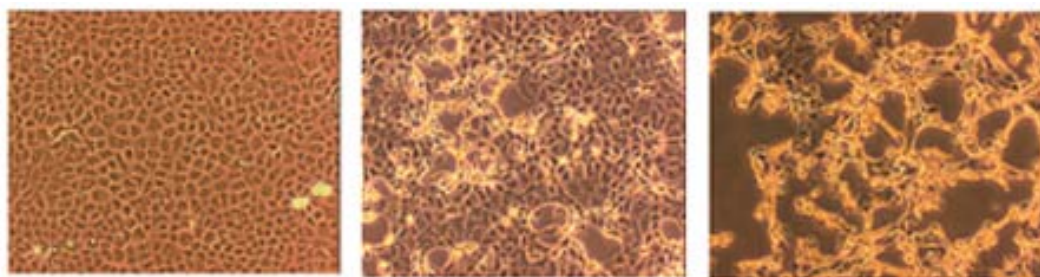
( 参考 )

- 1 現在、感染研では24 穴プレートに検体を接種し、1 週間後に新しい維持培地を0.5 ml追加して、合計 2 週間CPEを観察している。
- 2 臨床検体の種類によっては、接種後に細胞毒性による細胞の変化が起こることがあるので、CPEと混同しないように注意する。また、細胞毒性による細胞の変化が疑われる際は、新しい維持培地に交換することによって細胞が正常に戻ることもある。
- 3 海外でのSARSコロナウイルス分離成功例によれば、検体接種後 3 ~ 6 日目頃には細胞の円形化、一部脱落などのCPEが観察され、その上清を新しい細胞に継代すると比較的速やかに ( 24 ~ 48時間 ) CPEが出現し、48時間ごろまでには大部分の細胞が剥がれ落ちるといふ観察結果が報告されている。
- 4 VeroE6細胞にSARS-Coronaウイルス ( moi of >1.0 ) を感染させた時のCPEの形態。CPEが出現し始めると、その進行は比較的早い。

Mock

24 h

28.5 h



( 参考文献 ; The New England Journal of Medicine, April 10, 2003 ; <http://www.nejm.org/> )

分離ウイルスの同定 :

VeroE6細胞によるウイルス分離では、SARSコロナウイルスだけでなく単純ヘルペスウイルス、エンテロウイルス、パラインフルエンザウイルス、RSウイルス、レオウイルス1,2,3、等の種々のウイルスが分離される可能性がある。このため、CPEが

出現してもコロナウイルスか否かを同定する必要がある。

現時点では、SARSコロナウイルス同定用の抗血清が無いため、基本的にはRT-PCR法により同定検査を行う。CPE陽性の培養上清を変性剤含有バッファー（RLT buffer）で処理するまでは、BSL3で行う。それ以降のRNA抽出操作はBSL2で行ってもよい。

RT-PCR法による新型コロナウイルスの同定については、[WHO webサイト](#)

（<http://www.who.int/csr/sars/primers/en/>）や参考文献（The New England Journal of Medicine, April 10, 2003; <http://www.nejm.org/>）に掲載されている。また、現時点で感染研で採用しているプライマーやPCRの条件については、感染研情報センターHPに掲載している。しかし、現時点では、検出感度の高い至適プライマーやPCR条件の開発が進行中であることから、偽陰性による見落とし例の問題点が指摘されている。従って、新規のプライマーやPCRの条件等の情報は暫時更新されるので、情報センターHPを時々チェックしていただきたい。

CPE陽性の培養上清は、分離ウイルスの同定確認試験のために、もとの臨床検体および地衛研で行った他の病原体除外試験の成績とともに、感染研に送付する。

CPE陽性が出た場合の最終判定は感染研での確認試験と合わせて行う。

サンプル送付先：

国立感染症研究所ウイルス第三部第1室 小田切孝人  
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1  
TEL042-561-0771、FAX042-561-0812

[IDSCホームページへ](#)



[SARSトップ](#) > [ガイドラインその他](#) > [検査・診断](#)

# 資料5

**更新情報** 2003/6/6 (最新)

**ガイドラインおよびその他詳細情報**

**更新情報**

・2. 病原体検査のための検体採取方針を改訂しました(6月6日)。



## SARSコロナウイルスに関する検査対応について(3訂)

(国立感染症研究所 感染症情報センター)

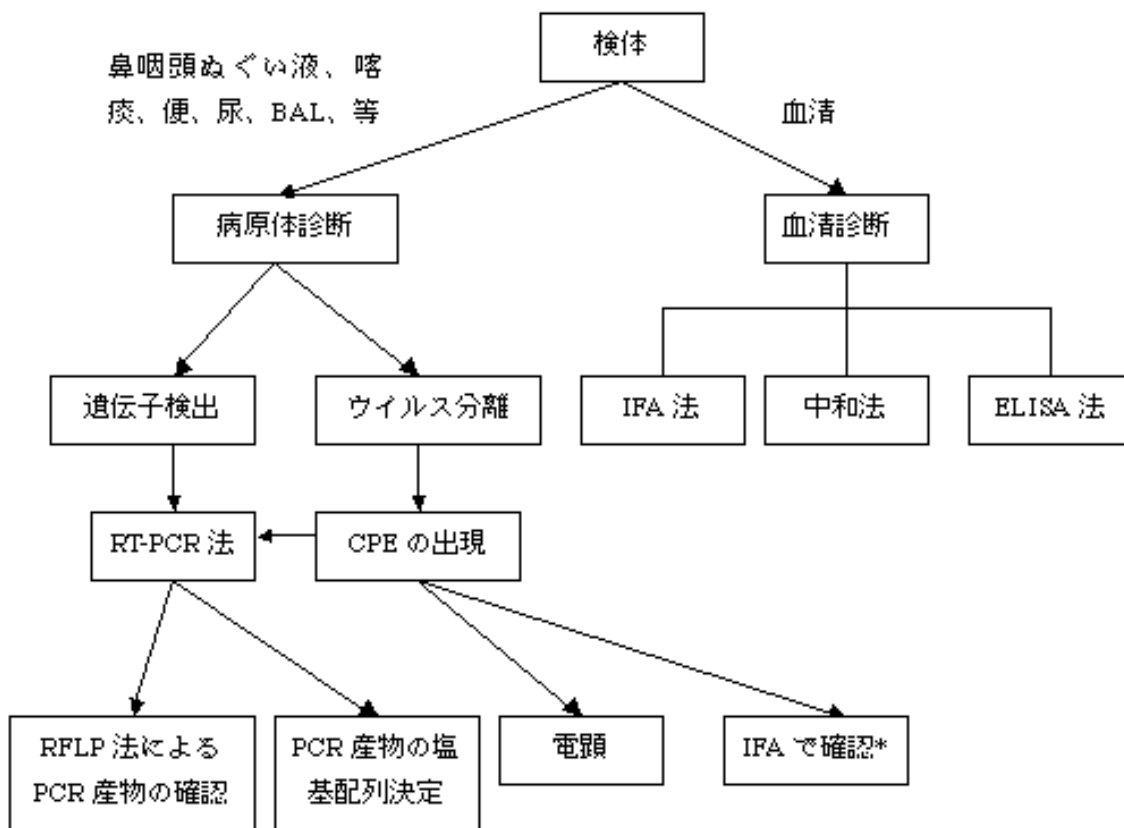
### 1. SARSにおける病原体検査方針

- (1) 国立感染症研究所ウイルス第三部第1室(以下感染研)ではSARSコロナウイルスに関する特異的検査を行うが、それ以外の既知の病原体の検査は地衛研もしくは病院検査部で行う。
- (2) 疑い例(suspected case)、可能性例(probable case)全員についてSARSコロナウイルス特異的ウイルス学的検査を実施する。  
疑い例(suspected)でSARSコロナウイルス特異的検査において、複数の施設の結果が陽性であった場合、その時点で可能性例(probable case)として扱う。

(3)-1 (SARSコロナウイルス以外の病原体検査)

すべての疑い例(Suspected case)、可能性例(Probable case)について、原則的には地衛研もしくは病院検査部において、通常の病原体取り扱いに準じて飛沫感染、接触感染の予防に特に留意をしながらBSLレベル2で既知の肺炎を起こす(異型肺炎含む)病原体の一次スクリーニングを行うものとする。これには、一般細菌培養、迅速診断法(連鎖球菌など一般細菌、レジオネラ、クラミジア、マイコプラズマ、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、RSウイルス、その他について、地域における患者発生状況を考慮して、必要な病原体について検討する)、血清学的方法(マイコプラズマ、クラミジア)を含む。

(3)-2 SARSコロナウイルスの検査対応



\* 現時点では、SARS コロナウイルス同定用の抗血清が無いため、基本的にはRT-PCR法により同定検査を行う

(3)-2a ( [SARSコロナウィルスの分離](#) )

(3)-1に加えて、すべての疑い例(Suspected case)、可能性例(Probable case)について、ウイルス分離が可能なBSLレベル3施設を有する地衛研ではSARSコロナウィルスを目的としたウイルス分離を行う。SARSコロナウィルス分離に使用する培養細胞はVeroE6とする。LLCMK2細胞は当初疑われていたhuman metapneumovirusについて感受性があるが、SARSコロナウィルスには感受性はない。CPEが出現した場合には培養上清、培養細胞、当該臨床検体を感染研に送付する。地衛研においてウイルス分離が困難である場合は、臨床検体を感染研に送付する。感染研に送付する場合は、原則として行政検査として対応するため、「5. 検体受付」に基づいて実施する。

(3)-2b ( [SARSコロナウィルスの遺伝子検索](#) )

SARS：診断検査の入手状況と検査方法の実際（5月1日 5訂）

- ・ 臨床検査結果の解釈に関する提言
- ・ SARSの臨床検査に対する提言

<http://idsc.nih.go.jp/others/sars/update45-lab.html> を参照のこと。

地衛研においてRT-PCR法を用いてSARSコロナウィルスの検出を試みる際は、[上記マニュアルRT-PCR法によるSARSコロナウィルス遺伝子の検出（国立感染症研究所ウイルス第三部第1室）](#)を参照し実施する。複数の施設での陽性確認が必要であるため、陽性結果が得られた場合は感染研にも検体を送付する。地衛研において実施が困難な場合は、臨床検体を感染研に送付する。送付に際してはウイルス分離と同様行政検査として「5. 検体受付」に基づいて実施する。

2. 病原体検査のための検体採取方針

現行のSARSコロナウィルス特異的病原体検査はこれまでの研究成果から得られた方法を用いて、現在日本で実施可能である検体検査です。研究途上の検査方法ですので、今後の研究の進展により、方法あるいは検体採取方法が変更になる場合がありますので、ご留意下さい。そのため、現在のところ医療上の診断目的としては認可されておらず、また感度が十分とは言えない場合があります。陰性であっても疾患としてのSARSを否定するものではありませんのでご注意くださいようお願い申し上げます。また、多くの検体依頼が寄せられているため検査結果を迅速に還元できない場合があります。

以上のことをご考慮の上、SARS検査（行政上及び研究目的）への協力を被験者、被験者が小児の場合はその保護者に十分説明の上、インフォームド・コンセントを

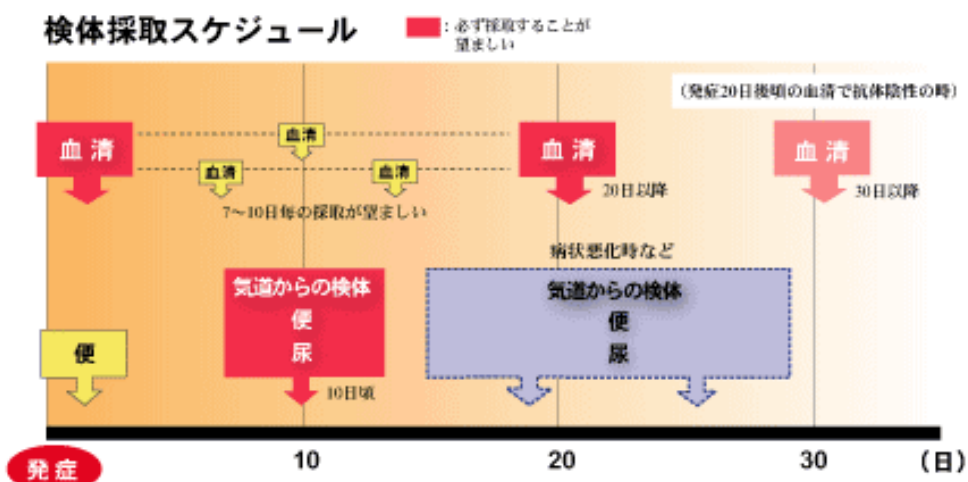
頂いた上でお送り下さいますようお願い申し上げます。

頂いた検体についてはSARSコロナウイルス感染の検査及び研究目的以外には使用しないことをあらかじめお断りいたします。

1) [SARSの診断検査のための検体採取について \( Peiris JSM et al. : Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. Lancet 361, 1767-1772, 2003、WHOによる重症急性呼吸器症候群 \(SARS\) 多国同時集団発生 の報告 \(6月2日、更新第71報\) 診断検査の現状と中国での研修コース \)](#) を参照のこと。

検体の採取時期：

ウイルス量は発症10日頃をピークとしているため、発症10日後の便、気道からの検体（鼻咽頭ぬぐい液、喀痰等）は必ず採取することが診断上望ましい。また、抗体価測定のための血清は(1) 発症10日以内（通常初診時）と(2)発症20日以降（陽性率約65%）のペアが望ましい。ただし、発症20-29日の検体で抗体陰性であった場合は、発症30日以降（陽性率約95%）の検体を必ず採取することが診断上望ましい。



画面をクリックすると拡大します。

ア) 気道からの検体（鼻咽頭拭い液、喀痰等）は、特に発症10日頃の検体が有用である（[Peiris et al. Lancet 361, 1767-1772, 2003](#)）。

イ) 尿はRT-PCR法を用いても発症早期の場合ウイルスが検出されないため、少なくとも発症4日以降の検体を用いる。発症10日頃が最も検出率が高いがその場合の検出率も50%との報告あり（[Peiris et al. Lancet 361, 1767-1772, 2003](#)）。



- ウ) 便については、RT-PCR法を用いると発症早期より検出が可能であり、発症10日頃をピーク（[ほぼ100%検出可能](#)）として、発症1カ月頃まで検出が可能である。尚、発症1カ月後の便の感染性については不明である。
- エ) 血清はできれば1週間毎に1-2mlを冷凍保存し、可能な限り多くの病日で経時的に抗体価を測定する。上記に記載した通り抗体価測定のための血清は(1)発症10日以内（通常初診時）と(2)発症20日以降（[陽性率約65%](#)）のペアで必ず採取することが望ましい。ただし、発症20-29日の検体で抗体陰性であった場合は、発症30日以降（[陽性率約95%](#)）の検体を必ず採取することが望ましい。

## 2) 検体毎の採取方法と検体送付方法

全ての検体について、48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。48時間以上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。ドライアイスは密閉した容器に入れないこと。梱包の方法は（[送付容器PDF版](#)）を必ず参照のこと。

なお、各検体にはラベルID（「5. 検体受付」を参照）を記載したラベルを貼付する。

(ア)便（発症早期から発症1カ月頃までRT-PCR法で検出可能であるが、発症10日頃の検体の陽性率が最も高くほぼ100%。）：10～50mlの便を50mlの生食に懸濁し、遠心分離後、上清2～3mlを蓋付き容器に入れ、パラフィルムにてシールし、ビニール袋に入れる。

(イ)喀痰（疾患初期及び病状悪化時の検体）：通常の方法にて、自分で出せる場合には滅菌生理食塩水もしくは水道水で複数回うがいをして口腔内雑菌を除いた後、喀痰を採取してもらう（唾液の混入は可能な限り避け、口腔内常在菌の混入を抑える。）。密栓できる喀痰専用容器（滅菌済み）に入れてフタをしてジップ付きプラスチック袋に入れて速やかに提出する。検体採取の際は、周りの人に飛沫が飛ばないように、区切られた部屋で行うなどの対策を講じる必要がある。採痰ブース（陰圧）があればより理想的である。人工呼吸器管理の場合には無菌的な操作のもとに、滅菌されたカテーテルを使って気管吸引液を採取する。採痰容器は密栓できる喀痰専用容器（滅菌済み）に採取後、ジップ付きプラスチック袋に入れて速やかに提出する。

(ウ)鼻咽頭拭い液あるいは鼻咽頭洗淨液 / 吸引液 (疾患初期及び病状悪化時の検体) : 通常の方法にて、鼻咽頭拭い液の場合には両方の鼻孔内を、口腔咽頭拭い液の場合には咽頭後壁および扁桃領域を拭い、スワブを2 ml [注: 綿棒が乾燥する状態や、大量の液体に浸した状態ではウイルスの検出が困難になります。1.5~2 mlであれば綿棒が適度に液体に浸る程度となり、ウイルスの検出に最適です。]のウイルス輸送液体培地、ない場合は生理食塩水内に入れ、柄を折りとったのち、蓋をする。洗淨液 / 吸引液の場合には、1~1.5mlの生理食塩液を鼻腔内に注入し、その後鼻咽頭分泌物を吸引する。もう一方の鼻孔についても同様に行い、吸引液は清潔試験管にいれる。

(エ)尿 (発症後3日間は検出されないため、少なくとも発症4日以降の検体。発症10日頃の検出率は50%程度で、その後検出率は漸減する。) : 50mlの尿を遠心分離し、沈査を2~3mlの上清に懸濁させ、コニカル試験管 (ファルコンなど) にいれ、パラフィルムにてシールする。

(オ)血清 (最低限、急性期と発症20日以降の2点) : 急性期血清はSARSが疑われた時点で即座に、回復期血清は発症20日以降に採取、輸送する。血液は血清に分離した後、それぞれ血清で1~2ml程度が必要である。できれば、1週間毎に血清を保存し、可能な限り多くの病日の検体を輸送する。

### 3. コロナウイルスについて、SARSコロナウイルスの安定性、抵抗性について

コロナウイルスは、ヒトではこれまで風邪症候群の原因ウイルスの一つでしかなかったが、動物ではかなり様々な病気をおこす。実験動物の分野ではマウス肝炎ウイルス、家畜の分野では豚伝染性胃腸炎、鶏伝染性気管支炎など、愛玩動物の分野では猫伝染性腹膜炎等々がある。コロナウイルスに属するウイルスは3つの血清型に分けられる。ウイルス粒子の表面にはS (spike, surfaceあるいはE2), M (membrane), E (small membrane), HE (hemagglutinin esterase) 蛋白、内部にN (nucleocapsid) 蛋白がある。このうち、HE蛋白は一部のウイルスにのみ存在する。S蛋白は中和活性、膜融合、レセプターとの結合を担っている。コロナウイルスの特徴としてmutation及びRNA recombinationの頻度が高いことが挙げられる。

検体の採取、検査の実施にあたっては、以下の情報をよく理解しておくことが重要である。[WHO研究施設ネットワークが集積したSARSコロナウイルスの安定性と抵抗性に関する最初のデータ](#)（WHO 5月15日）を参照のこと。

- 1) 37℃で4日間保存すると、検出限界以下にウイルス量は減少する。
- 2) 4℃では、21日目にも感染性が残る。4℃4日間保存のウイルス量は10の5.7乗程度の5.7乗程度
- 3) 再凍結（-80℃）4日間保存でのウイルス量は10の6.7乗程度。
- 4) 室温でプラスチックなどに乾燥した状態でウイルスが付着していると2日間程度感染性がある。
- 5) 便中、特にpHの高い下痢便中では4日間程度生存する。
- 6) 血清については、56℃30分の通常の処理で感染性はなくなる。
- 7) エタノールでは10分程度でウイルスは不活化する。
- 8) アセトン20分間処理あるいはエーテル10分間処理で、完全にウイルスが不活化されない報告もあり注意が必要。
- 9) 0.1%程度のNP40では20分処理しても感染性が残る（ドイツの研究所からの報告）。
- 10) 石鹼やリタージェントでの感染性の不活化は困難である。

#### 4. 感染研での検査の範囲と結果報告

- (1) 感染研において行う検査は、SARSコロナウイルスについての特異的検査とする。
- (2) 暫定的結果の報告は可及的速やかに行うものとする。
- (3) 結果は情報センターを通して、依頼された機関へ報告する。
- (4) 情報センターでは、すべての情報をいれたデータベースを維持し、結果報告の管理も併せて行う。

## 5 . 検体受付

(1)感染研による検査は、医療機関、保健所、都道府県、地衛研などの合意の元、行政からの依頼によることを原則とする。検体受付は情報センターにおいて、以下の手順で行う。検体受付時間は、原則として休日を除く勤務時間帯（9：00～17：00）とするが、緊急の場合には個別に対応する。

病院からの直接の問い合わせについては、情報センターにて、ここに記載した原則を説明することとする。


(2)各自治体の担当者は、まず情報センターへ電話で一報を入れた後、必要事項を記入した「[SARSに関する検体提出フォーム \(.doc / 厚生労働省通知4月7日\)](#)」をFAXする（注：症例ID及び検体IDは記入しなくてよい）。この情報に基づき、情報センターは症例ID、検体ID、ラベルIDを記入した「SARS連絡票」を作成し、返信する。今後は、すべての連絡にここに記載されたID番号を使用する。

(3)検体の輸送は、基本的に天然痘の検査材料の輸送方法（添付2）に準ずるものとし、送付するか、持参するものとする。検体の搬入は、原則として休日を除く午前中着とし、到着予定時刻と方法についてあらかじめ連絡しておく。但し、緊急の場合や搬入時間の多少の遅れについては、個別に情報センターを介してウイルス第三部と相談し、対応する。

(4)情報センターは、ウイルス第三部へ「SARS連絡票」を送付すると共に、検体搬入予定日時を連絡する。

（添付）検体の送付方法はこの中に詳しく説明されています。

1. 「重症急性呼吸器症候群（SARS）管理指針」  (PDF 100K)

2. 「検査材料の採取・送付に関する追加情報」  (PDF 64K)

### 連絡先

国立感染症研究所感染症情報センター

〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

TEL03-5285-1111（代）、 FAX03-5285-1129

### 検体送付先

国立感染症研究所ウイルス第三部

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1

TEL042-561-0771、FAX042-561-0812

(注) この検査対応方針は、現時点までの知見に基づく、暫定的なものであって、今後の新たな知見の発見、あるいは国内の状況によって、随時更新されるものとする。



[IDSCホームページへ](#)

[SARS トップページ](#) > ガイドラインなどの詳細情報 > SARSに関する消毒

更新情報 2003/12/18

## SARSに関する消毒（三訂版）

（感染症情報センター）

現在のところSARSコロナウイルス感染症は2003年9月8日、シンガポールでの実験室内での感染者を最後に患者は確認されていない。今後、SARSが再流行するかどうかは不明であるが、(1) 既存のコロナウイルス感染症は冬季に流行することが多い。(2) SARSコロナウイルスは熱には弱いですが、低温では長期間生存することがわかっている。

(<http://idsc.nih.go.jp/others/sars/update56-data.html>) などの理由により、今冬のSARSの再流行に備えておく必要があり、インフルエンザワクチンの接種などSARS及びその他の呼吸器感染症を含めた対策について、WHOの見解などを感染症情報センターのウェブサイトから紹介している (<http://idsc.nih.go.jp/others/sars/index.html>)。

SARSコロナウイルスへの感染の最終的な確認のためには実験室診断が必要である。SARSコロナウイルスの迅速診断キットが発売される可能性があるものの、現在は医療機関等がすぐにSARSコロナウイルスの検査が行うことは不可能であり、また検査実施機関も限られているために、SARSコロナウイルスの感染確認には時間を要することが考えられる。

従って、消毒及び清掃はSARSが確定されなくても、疑われた患者が発生した段階で実施する必要がある。最近になって、台所用合成洗剤がSARSコロナウイルスの処理に効果が高いことが実験的に確認され、家庭などでの消毒としての選択肢が増えた。SARSが臨床的に疑われる患者が発生した場合などにはここに示す例を参考に消毒を行うことが推奨される。消毒に関する要点は以下の通りである。

1:家庭などで使用する際の一般的な消毒薬としては下記のいずれかが推奨される。

(1) エタノール（70～80％）

(2) 界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5％以上）

「おおむね1リットルのぬるま湯に対して5～10cc程度以上の台所用合成洗剤\*を加えたもの。」

\*効果が確認されているのは食器・野菜洗浄用の家庭用合成洗剤であり、成分として直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムもしくはアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムを16％以上含むもの。

2: SARSが疑われる患者、あるいはSARSが確認された患者の部屋などの消毒にあたって

は、最寄りの保健所等と相談して適切な対応を取る。手袋、マスク（サージカルマスク以上の性能のもの）、ゴーグル、ガウン等を着用して消毒作業を行う。

3:なるべく外窓を開け放し、十分な換気を行うとともに、可能な限り日光が部屋の中に入届くようにする。

4: 消毒剤を噴霧することにより、ウイルス等が空気中に舞い上がる可能性が否定できないため、消毒にあたっては可能な限り清拭することが望ましい。また、消毒剤が長期間残留するほど効果があるため、唾液、体液などの汚染のある場所には、それらの十分な清拭とともに、消毒剤を用いて2度拭きすることや、界面活性剤の場合では、界面活性剤に浸したティッシュペーパーなどで汚染された場所を覆い、5分程度以上経過したあとで拭きするなどの対応も効果的であると思われる。

5: 消毒する対象の材質などによっては、劣化、退色などを引き起こす場合もあり、心配な場合には部分的に試してから行うこと、あるいは十分な拭き取りを行うことも推奨される。また、電子機器など精密機器の消毒には、消毒剤が内部に入り込み障害を起こさないよう細心の注意を払うことも必要である。

6: エタノールについては引火性があることから、消防法、労働安全衛生法、航空法などでの規制があるため、大量に使用する場合には界面活性剤の使用が推奨される。

7: 台所用合成洗剤を溶かす場合は冷たい水よりも、温度が高い方がより効果的であると考えられている。



## 家庭、職場などでの一般的な消毒方法について (例)

注) SARSが疑われる患者の喀痰などが確認された場所については特に念入りに拭き取りを行うことが望ましい。

### 居間・食事部屋

【対象】ドアノブ・窓の取手・照明のスイッチ・ソファー・テーブル・椅子・電話機・コンピュータのキーボードとマウス・小児の玩具・床・壁など

【方法】界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上）に浸した雑巾で2度拭きする。

### 台所

【対象】食器、箸、調理器具

【方法】以下のいずれかの方法

・界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上）に5分以上浸した後、通常の洗浄を行う。

・80 以上の熱湯に10分以上浸したあと、通常の洗浄を行う。

・80 以上の熱水洗浄をする。

【対象】ダイニングテーブル・流し台・壁・床

【方法】界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上）に浸した雑巾で2度拭きする。

#### 浴室

【対象】水道の蛇口・シャワーヘッド・浴槽・洗面器・ドアノブ・窓の取っ手・照明スイッチ・排水溝・壁・床など

【方法】界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上）に浸した雑巾で2度拭きする。

#### トイレ

【対象】水洗便器と流水レバー・便座とフタ・汚物入れ

【方法】流水レバー、便座、フタについては界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上）に浸した雑巾で2度拭きする。便器の内側については界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上、またはやや濃い目の溶液）を用いて、トイレ清掃用のブラシ（取っ手付きスポンジブラシなど）を用いて飛び散らないよう丁寧にこする。フタをして5分以上経過してからフタをしたままフラッシュする。使ったブラシは界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上、またはやや濃い目の溶液）の中に5分間以上漬けておく。

#### その他

衣類・寝具

【方法】

（1）SARS患者あるいは疑似症患者が使用した衣類や寝具については、界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上）に5分以上浸してから洗濯機にかける。又は

（2）80℃以上10分間以上のお湯につけるなど熱水洗濯を行う。

#### 2：職場や集合住宅の共用部分

現在のところ建物全体や近所の家などに対して特別な消毒は必要ないと考えられるが、以下の共用部分などSARSが疑われる患者の手が触れた場所や、喀痰などが付着している可能性のある場所については清掃・消毒を行うことが推奨される。

【対象】

・エレベーター（昇降機）あるいはエスカレーター

特にエレベーターの呼出しボタン、停止階ボタン、エスカレーターの手摺り部分

・建物への出入り口

建築の入口にあるドアノブやハンドル、セキュリティ対応のオートロックボタンなど不特定の人が触れる部分。

・共用のトイレ、給水場所など

【方法】界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上）



に浸した雑巾で2度拭きする。トイレについては上記の「トイレ」の項目を参照のこと。



## SARSコロナウイルスに対する消毒剤 より詳しい説明

推奨する消毒剤の例は、これまでに得られた知見に基づき、エンベロープ\*のあるウイルスに対する消毒方法として作成したものです。適切な消毒剤についての情報は、新たなデータの集積により改定される可能性があります。

### \*エンベロープ(envelope)のあるウイルス

ウイルス粒子の一番外側にある膜のあるウイルス。この膜は脂質2重層に、糖タンパクが挿入された構造をとる。消毒剤を作用させたときこの膜のあるウイルスの方が膜のないウイルスよりも消毒剤で感染力がなくなりやすい。SARSコロナウイルスはエンベロープを有するウイルスである。

#### 1. 加熱滅菌可能なもの

- (ア) 高圧蒸気（オートクレーブ）滅菌（121℃、20分）
- (イ) 乾熱滅菌（180～200℃、1時間 あるいは 160～170℃、2時間）
- (ウ) 煮沸消毒（98℃以上、15分以上）

#### 2. 加熱滅菌不可能なもの

現在のところ、その効果と入手の容易さなどから、消毒用エタノール及び界面活性剤の使用が推奨される。

- ・基本的に消毒剤の噴霧は避け、広い面などでは拭き取り、可能なものについては消毒剤へ漬け置きすることも検討する。
- ・消毒剤が触れている時間が長い方がより効果が高い。（床などでは界面活性剤を浸したティッシュなどで覆って5分程度置いてから拭き取りなども検討する。）

#### 消毒用エタノール(70～80%)：

- ・人体に対する毒性が少なく、手指の消毒などに適している。ただし、密閉した容器に保存しないとアルコール分が蒸発し、濃度が保たれないため効果が激減する。
- ・脱脂効果のため皮膚が荒れることがあるので、スキンケアが重要である。
- ・粘膜面には使用できない。アルコール系消毒剤として、イソプロパノール（70%）が使用されることもあるが、ウイルスに対する効果はエタノールより劣っている。
- ・手指の消毒には速乾性皮膚消毒剤（例：商品名ウエルパス、ヒビスコールなど；塩化ベンザルコニウム又はグルコン酸クロルヘキシジン、エタノール、界面活性剤、湿潤剤含有）の利用頻度が高い。
- ・血液などが付着している場合などには、内部まで届かないことがあり洗い落とす必要がある。
- ・引火性、揮発性があるので、取り扱いに注意が必要であり、広範囲な噴霧や放置には

向いていない。また、消防法、労働安全衛生法、航空法などでの規制がある。

#### 界面活性剤

- ・従来のコロナウイルス及びSARSコロナウイルスに対しては有効性が確認されている（感染症研究所未発表データ）。
- ・効果が確認されているのは食器・野菜洗浄用の家庭用合成洗剤であり、成分として直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムもしくはアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムを16%以上含むものである。
- ・家庭用合成洗剤における界面活性剤の濃度は製品により異なるが、SARSコロナウイルスの消毒として推奨される「界面活性剤をぬるま湯に溶かしたもの（台所用合成洗剤として濃度0.5%以上）」は15-17%の界面活性剤を含む台所用合成洗剤の濃度として計算されている。これより濃度が高いものはもちろん有効である。

#### 過酢酸

- ・低濃度(0.001-0.2%)で芽胞を含むすべての微生物に対して効果がある。また、有機物が存在していても有効である。
- ・最終的に水、酸素、酢酸に分解し、有害物質が残留しない。
- ・一部の金属を腐食する。
- ・刺激臭がある。

#### グルタルアルデヒド（2%、pH8）：

- ・化学作用、蛋白変性作用が強く、殺菌力も強いいためあらゆる微生物を消毒することが可能である。
- ・刺激が強いため人体には使用できない。
- ・器具の消毒には血液や体液を十分に除去した後、2%グルタラル液に1時間浸漬の後、十分に水洗する。
- ・排泄物や体液の消毒には2時間以上浸漬する方が確実である。
- ・床の消毒には0.2%液で清拭し、30分以上放置の後、水拭きする。
- ・内視鏡の消毒などには、3%液での15分消毒が過程に組み込まれていることがある。
- ・消毒にあたっては保護具の使用、換気が必要である。

ホルムアルデヒド（液体：1-5%溶液、ガス：1m<sup>3</sup>あたりホルマリン15ml以上を水40ml以上と共に噴霧又は蒸発させ、7-24時間）：

- ・液体は医療器具の浸漬消毒あるいは清拭に用いる。
- ・室内の殺菌をする場合にガス状にして使用することができるが、毒性、刺激性が強い。

#### エチレンオキシドガス：

- ・濃度約500mg/L、55-60℃、3時間以上処理。中央材料室などで非耐熱性器具等の滅菌に利用する。その後のガス残留がないように注意する。
- ・吸入すると気道の炎症や吐気、めまい、神経症状を起こし、催奇性、発癌性のリスクも指摘されているため、十分に換気することが必要である。

#### ヨウ素系消毒剤（ヨードホール）：

- ・ヨウ素とキャリア（非イオン系界面活性剤）の複合体を作り、水溶液としたものであ

る。アルカリ性になると効果がなくなり、有機物の混在によって効果が減弱する。

- ・喀痰や血液が付着していると効果は著しく低下する。
- ・一般の金属には腐食作用があり、皮膚、粘膜、布類への着色がある。
- ・手術部位の皮膚消毒には10%溶液、10%エタノール液が用いられる。
- ・手指、皮膚の消毒に7.5%スクラブ液も用いられる。
- ・創傷部位の消毒には10%ゲルが用いられる。
- ・高濃度のヨウ素系消毒剤には皮膚に対する刺激作用があり、ヨード過敏症を起こすことがある。
- ・うがいには7%濃度のものを添付書類の指示に従って希釈し用いられる。

次亜塩素酸ナトリウム：

- ・有効塩素濃度は0.02-0.05%（200-500ppm）で1時間以上浸漬使用することが多いが、確実な殺ウイルス作用を期待するためには0.1%（1,000ppm）以上30分以上の作用が有効である。
- ・布、金属に対して腐食性があり、有機物が付着していると効果が低下する。
- ・人体には使用できない。
- ・リネンには0.1%（1,000ppm）で30分浸漬後水洗、食器などには水洗後0.01-0.02%（100-200ppm）で5分以上浸漬する。
- ・排泄物の消毒には0.1-1%（1,000-10,000ppm）濃度が有効である。
- ・合成洗剤入りの次亜塩素酸ナトリウム製剤の方がSARSコロナウイルスにはより有効と考えられる。

3. 塩化ベンザルコニウム、クロルヘキシジンにも消毒効果があると考えられるが、効果が十分得られない場合がある。

-----  
日本医師会のウェブから一般的な消毒剤に関する情報が入手可能である。

[1類、2類、3類微生物の消毒方法\(p d f\)](#)

[消毒・滅菌の概要\(p d f\)](#)

[消毒薬一覧\(p d f\)](#)



[IDSCホームページへ](#)