

アルボウイルス・レファレンス関連会議

2026年7月15日(水)

国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所
ウイルス第1部第2室

イム チャンガン
林 昌 宏

感染症法に掲載されているフラビウイルスとトガウイルスに起因する疾患

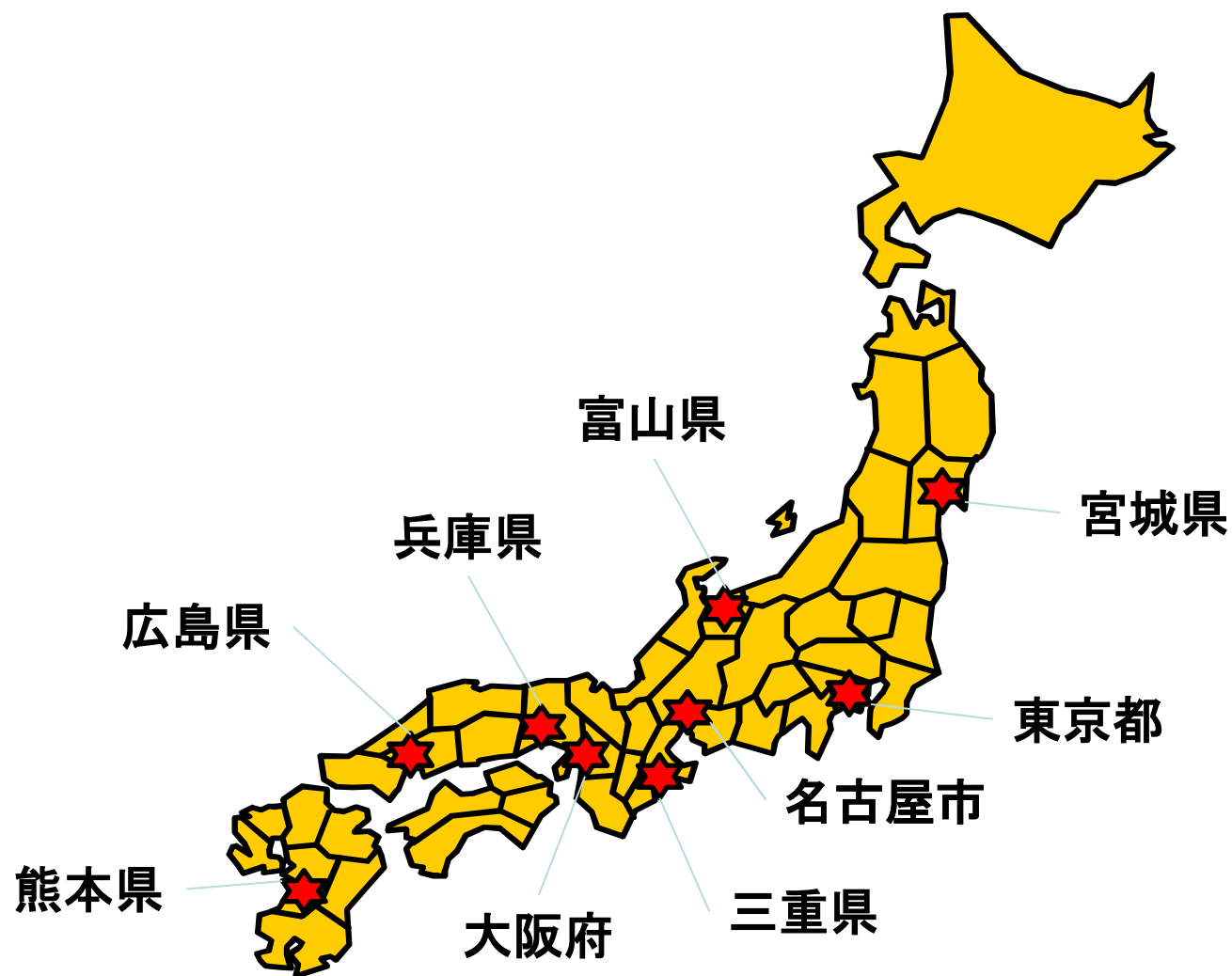
➤ フラビウイルス

- 黄熱(四類)
- 日本脳炎(四類)
- ウエストナイル熱(四類)
- デング熱(四類)
- ジカ熱(四類)
- ダニ媒介脳炎(四類)
- オムスク出血熱(四類)
- キヤサヌル森林病(四類)

➤ トガウイルス

- 東部馬脳炎(四類)
- 西部馬脳炎(四類)
- ベネズエラ馬脳炎(四類)
- チクングニア熱(四類)

アルボウイルス感染症レファレンスセンター



蚊媒介感染症の診療ガイドライン

(第5.2版)

2015年5月22日第1版*作成

2016年3月11日第2版作成

2016年7月14日第3版作成

2016年12月14日第4版作成

2019年2月7日第5版作成

2023年9月6日第5.1版作成

2026年6月26日第5.2版作成

国立健康危機管理研究機構

国立国際医療センター/国立感染症研究所

蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針

平成 27 年厚生労働省告示第 260 号

(一部改正 平成 28 年厚生労働省告示第 119 号)

(一部改正 令和 3 年厚生労働省告示第 334 号)

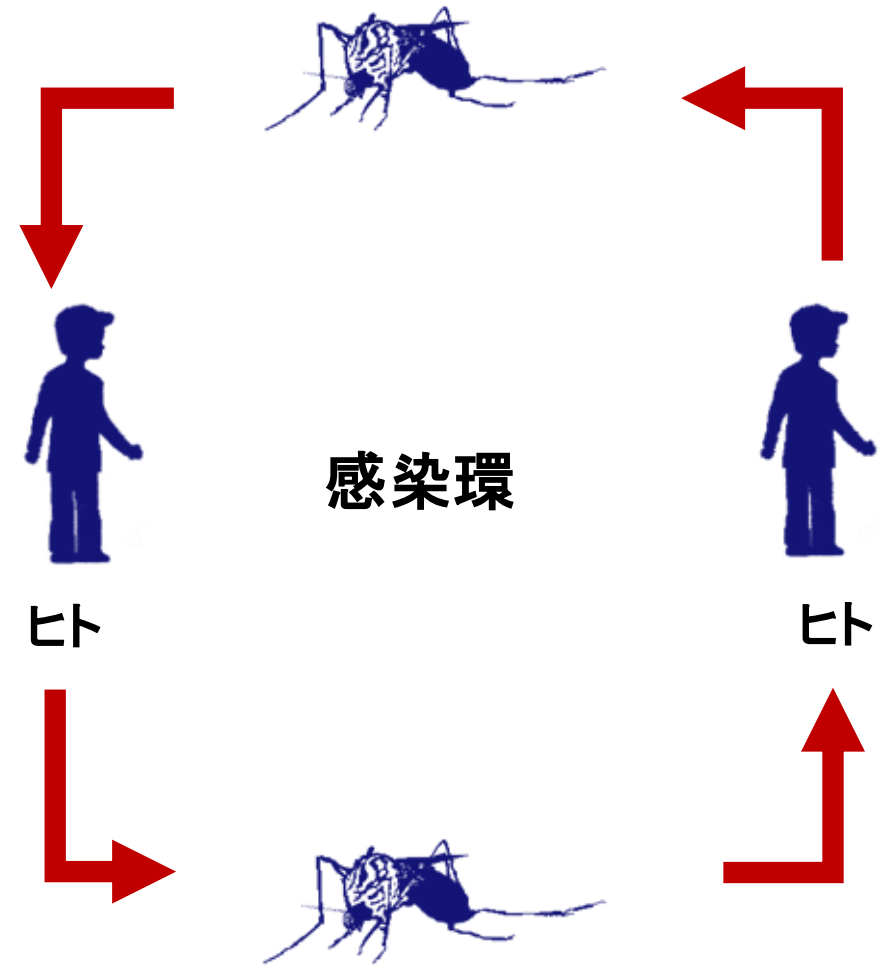
(一部改正 令和 7 年厚生労働省告示第 52 号)

(一部改正 令和 8 年厚生労働省告示第 254 号)

厚 生 労 働 省

デングウイルス

デングウイルスの感染環



ヒトスジシマカ (*Ae. albopictus*)
ネッタイシマカ (*Ae. aegypti*)

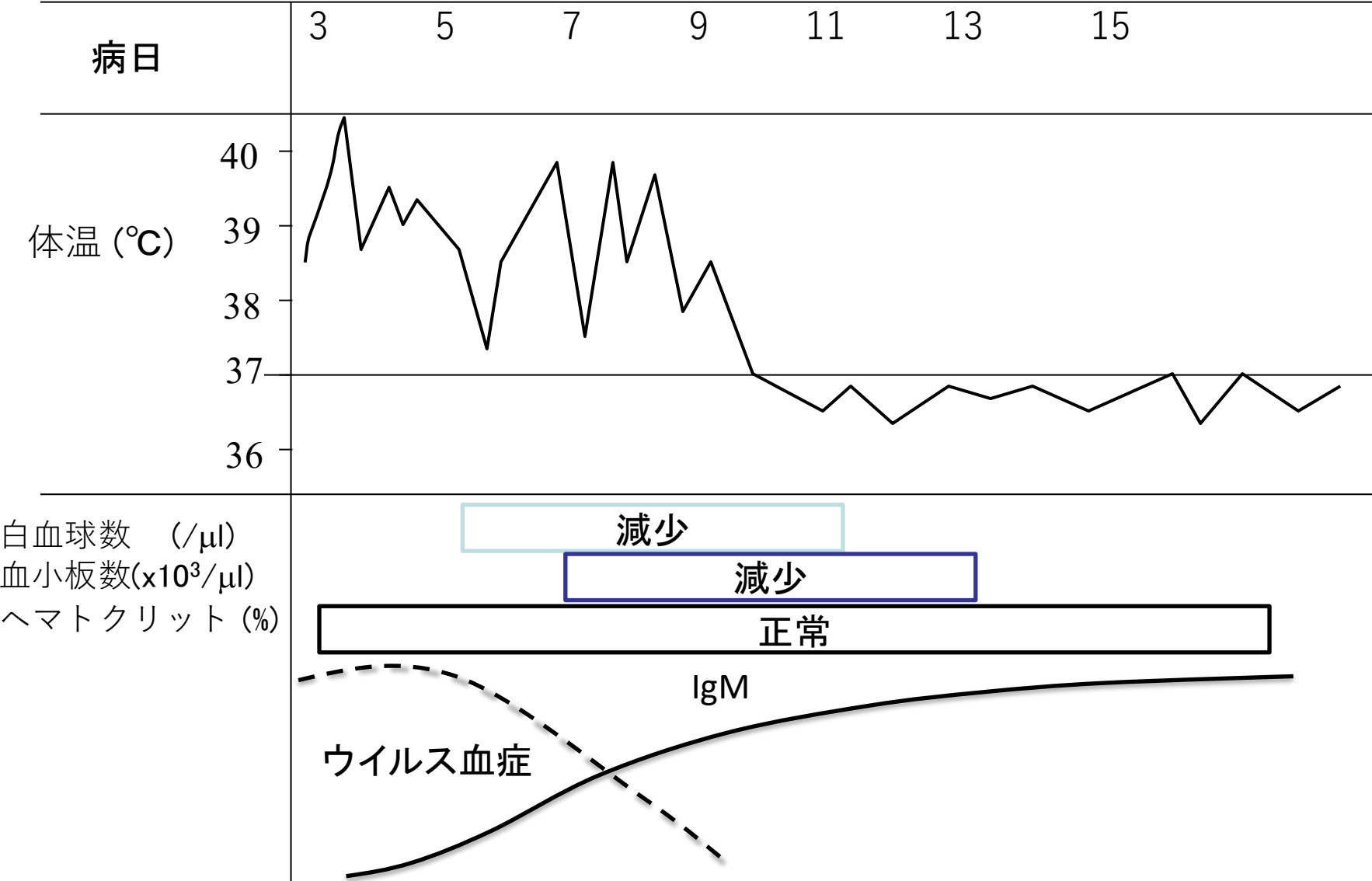
重症デング熱



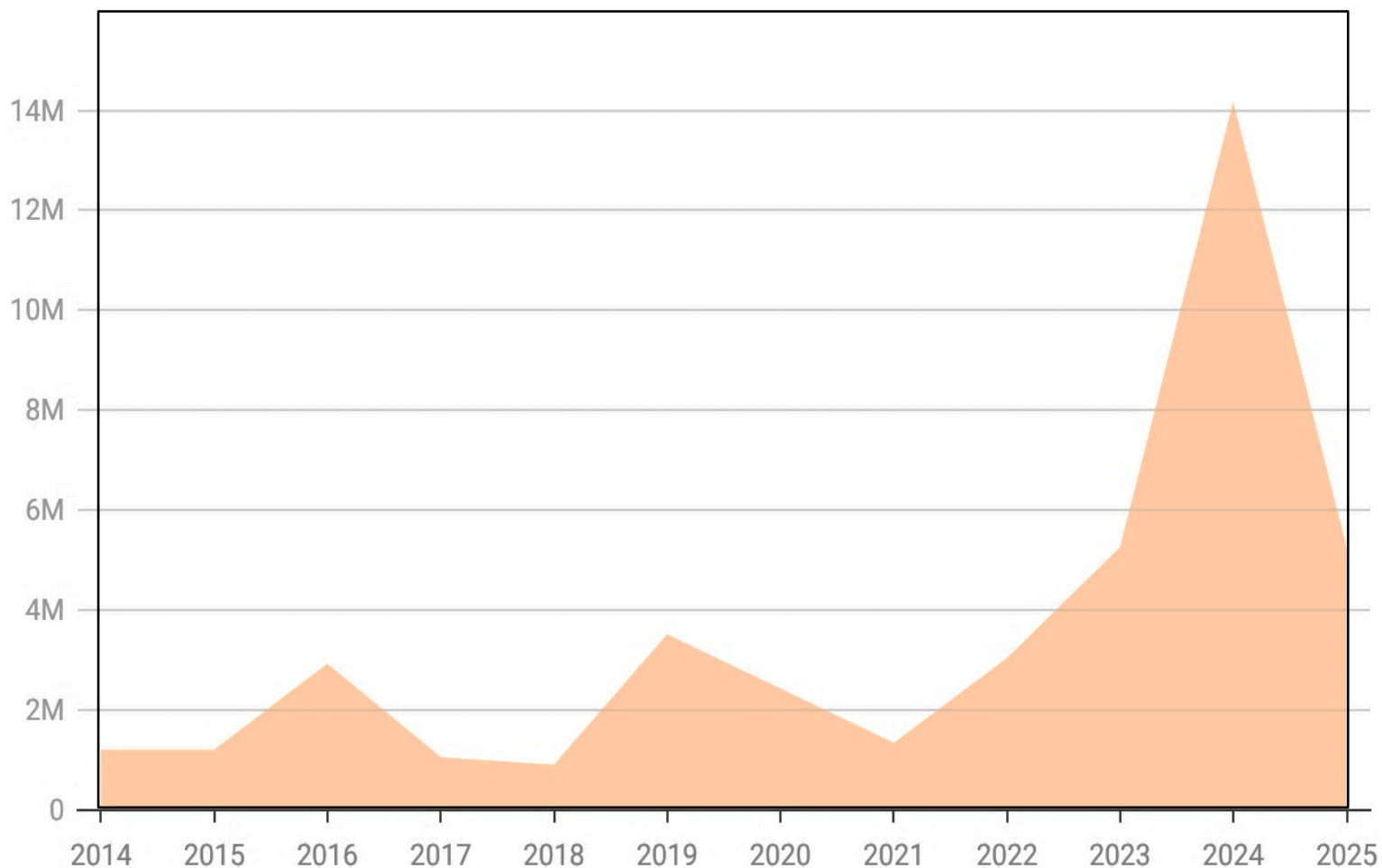
2005年東チモールにおける
デング熱流行時の重症デング熱2歳児患者
死亡率8.4% (22/336)

- 重症デング熱(SDF)はデング熱発症後3～7日後に解熱とともに急速に悪化することが多い
- SDFに移行すると、重度の皮下出血(点状出血, 斑状出血), 血便, 血尿, 重度の血漿漏出, 呼吸窮迫, 肺水腫, 肝障害, 心機能障害, 多臓器障害, 脳炎, 意識障害を呈し, ショック, 消化管からの大量出血, 脳内出血等により死に至る
- 流行地では患者の約9割は小児
- SDFはショック, 呼吸困難を伴う血漿漏出による体液貯留, 重度の出血, 1,000 IU / L以上のトランスアミナーゼの上昇, 意識障害, 肝機能障害, 心機能障害または脳炎などの重度の臓器障害によって定義
- SDFの兆候として, 解熱 (38° C未満)に伴い, 激しい腹痛, 呼吸数増加, 持続的な嘔吐, 吐物中の血液混入, 粘膜出血, 鼻出血, 血小板数の急激な減少, 肝腫大(>2 cm), 四肢寒冷, あくび, 口囲蒼白, 頻脈, 低血圧等の症状を呈す
- 患者は無気力, 不安, 興奮状態が認められるがこれらの兆候を認めずにSDFに移行する症例もある

典型的なデング熱症例の経過



2010年-2025年における世界のデング熱流行の推移



- 2024年には、14,401,524人を超えるデング熱患者（重症デング熱52,711人）と11,153人のデング熱関連死が報告された (WHO)

Data, O. W. in & Roser, M. OWID Homepage. Our World Data (2024)を改変
Dengue – Vector Suitability and Imported Activity 2024, BlueDot, 2024

2010年から2024年までのヨーロッパにおけるデング熱国内発生

年	国と地域	患者数	発生月
2010	クロアチア	10	8-10月
	フランス	2	8-9月
2013	フランス	1	9-10月
2014	フランス	4	7-9月
2015	フランス	8	7-9月
2018	フランス	8	9-10月
	スペイン	6	8-10月
2019	スペイン	1	9月
	フランス	9	7-9月
2020	フランス	13	7-10月
	イタリア	10	8月
2021	フランス	2	7月、9月
2022	フランス	65	6月- 9月
	スペイン	6	8月-10月
2023	フランス	43	7-10月
	イタリア	81	7月末-11月
	スペイン	3	8-10月
2024	フランス	83	6月中旬-10月
	イタリア	213	8-10月
	スペイン	8	8-9月

近年の東南アジアにおけるデング熱の流行状況

	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025
ベトナム	131,447 (27)	314,468 (54)	133,321 (27)	70,944 (27)	367,729 (140)	167,437 (46)	108,433 (28)	184,903 (43)
フィリピン	216,190 (1,083)	437,563 (1,689)	83,155 (324)	78,983 (216)	252,700 (894)	195,603 (657)	413,981 (1,442)	290,994 (1,162)
マレーシア	81,360 (147)	130,101 (147)	88,845 (142)	26,365 (20)	64078 (50)	123,133 (100)	122,423 (117)	51,406 (43)
シンガポール	3283 (6)	15,999 (3)	35,315 (0)	5,248 (0)	32,130 (0)	9,949 (0)	13,655 (0)	3,998 (0)
ラオス	6,446 (19)	39,091 (76)	7618	1,356	29,210 (28)	32,109 (20)	19,486 (0)	12,245 (1)
カンボジア	24,684 (23)	68,657 (48)	11,977 (16)	1,903 (8)	12,985 (21)	35,390 (90)	18,983 (46)	63,016 (79)
中国	5,141 (0)	22,688 (0)	799 (0)	53 (0)	902 (0)	19,627 (1)	24,330 (0)	9,856 (0)
合計	468,551 (1305)	1,028,567 (2017)	360,740 (509)	185,070 (271)	759,734 (1,133)	580,704 (905)	721,291 (1,633)	616,418 (1,328)

WHO Dengue Situation in the Western Pacific Region、およびフィリピン政府発表データを参照

献血血から検出された主なアルボウイルスRNA

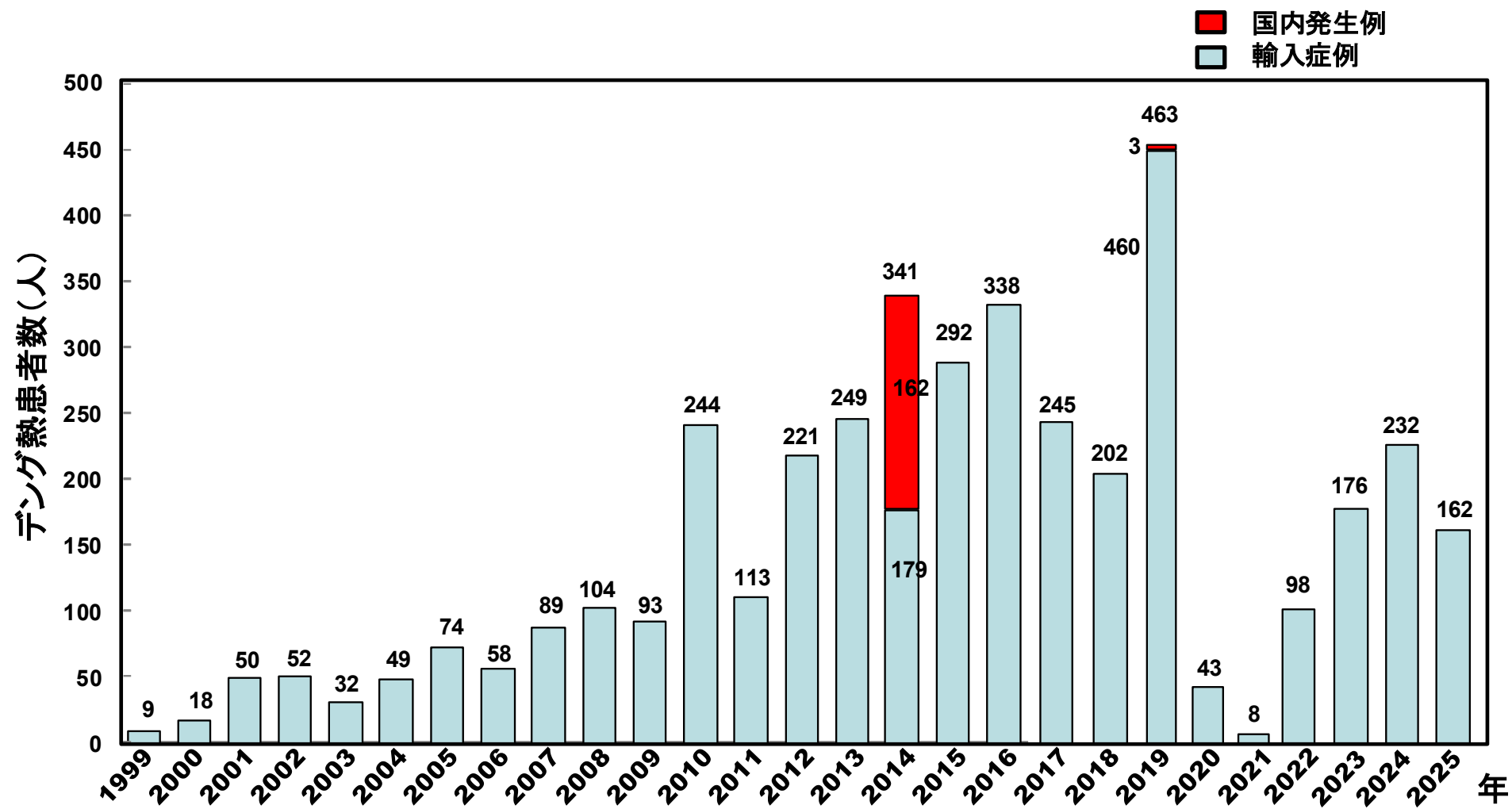
- 2003年 ブラジル 献血血よりデングウイルスRNAの検出(4,858検体中3検体陽性)
- 2004年 ホンジュラス 献血血よりデングウイルスRNAの検出(2,994検体中9検体陽性)
- 2005年 レユニオン島 献血血よりチクングニアウイルスRNAの検出
- 2005年 プエルトリコ 献血血よりデングウイルスRNAの検出
- 2009年 タイ 献血血よりチクングニアウイルスRNAの検出
- 2012年 ブラジル 献血血よりデングウイルス3型RNAの検出(500検体中2検体陽性)
- 2012年 ブラジルにおいて少なくとも5例の輸血による**デングウイルス感染例**
- 2014年 ブラジルにおいて1例の血小板輸血による**デングウイルス感染例**(2例中1例で発症)
- 2014年 プエルトリコ 献血血よりチクングニアウイルスRNAの検出
- 2016年 ブラジルにおいて2例の血小板輸血による**ジカウイルス感染例**
- 2022年 台湾 献血血よりデングウイルスRNAの検出(4,976検体中21検体陽性)
- 2024年 ブラジル 9463プール(56,778検体)の献血血中95プールからアルボウイルスRNA検出, ZIK (3), CHIK (6), D1 (40), D2 (39), D3 (5), D4 (1), D1+D2 (1)

デング熱の診断

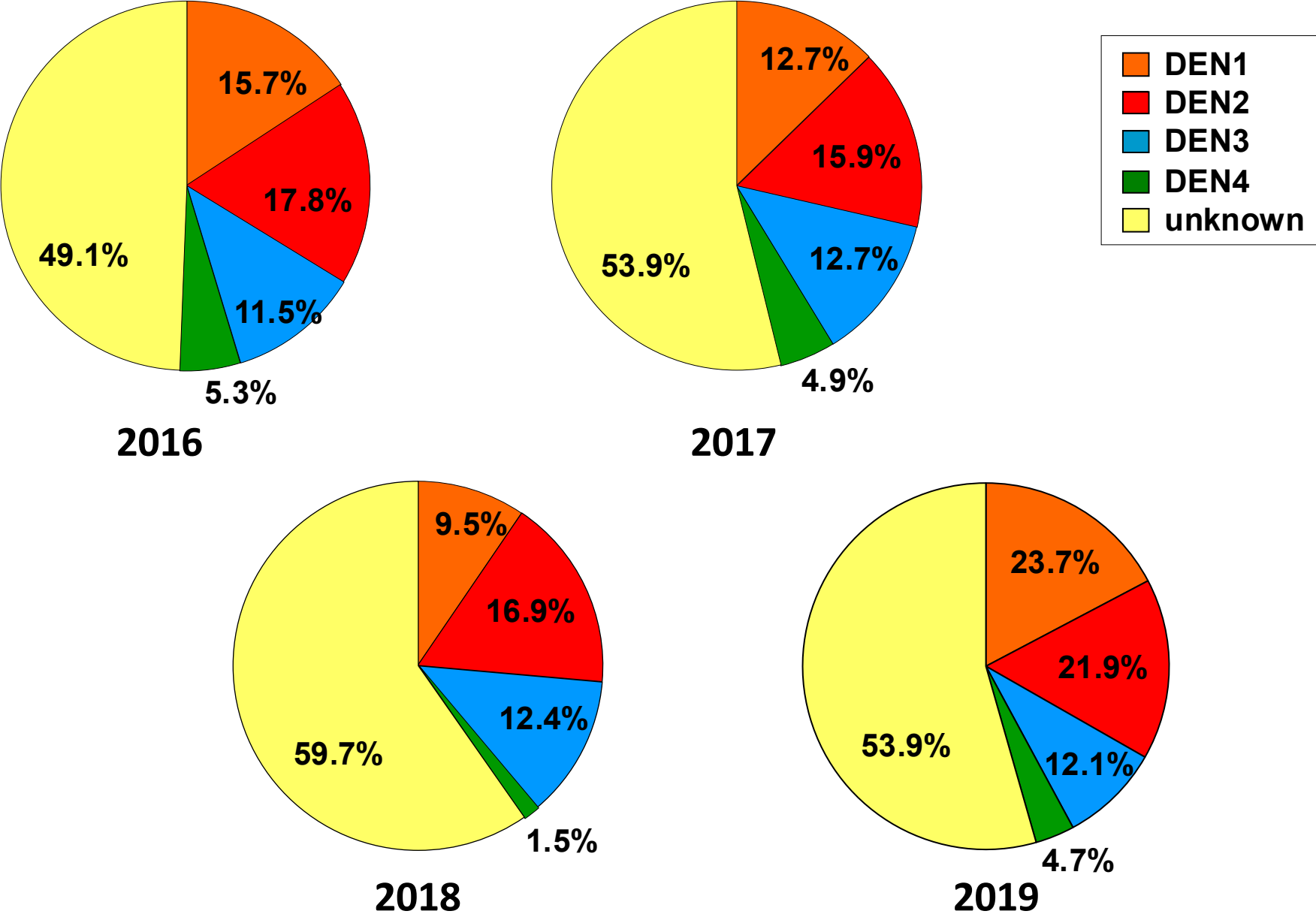
検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	血液
PCR法による病原体の遺伝子の検出	血液
非構造蛋白抗原(NS1)の検出	血液(血清又は全血)
IgM抗体の検出(ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意の上昇)	血清
中和試験又は赤血球凝集阻止法による抗体の検出(ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意の上昇)	血清

(感染症法に基づくデング熱の届出基準より抜粋)

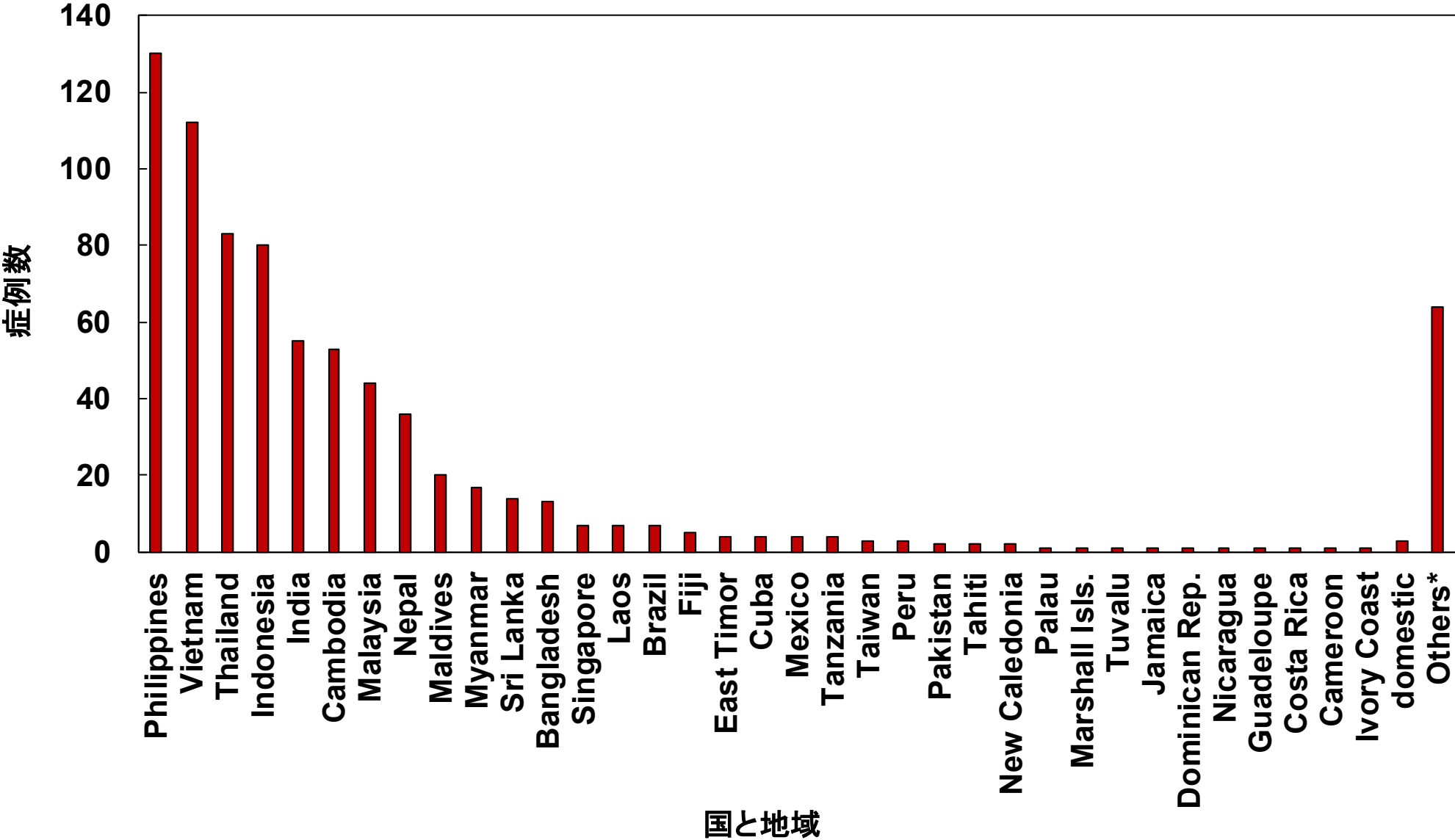
国内の1999年4月-2025年第50週におけるデング熱症例の推移



2016年～2019年におけるデング熱輸入症より同定されたデングウイルスの(血清)型



2019年～2023年における渡航先別デング熱輸入症例数



「デング熱国内感染事例発生時の 対応・対策の手引き」: 疫学調査のポイント

- 推定感染地の絞り込み
 - － 潜伏期内(発症前3～7日)の症例の屋外活動歴
 - － 症例の屋外活動の同行者や同居家族の発症の有無
 - － 探知された他の症例の行動歴との照合
- 感染拡大リスクの評価
 - － 推定感染場所(絞り込めた場合)の状況確認:
媒介蚊の密度等
 - － ウイルス血症時期(発症前1日～後5日目)の症例の行動歴・蚊の刺咬歴

まとめ

- デング熱・デング出血熱はデングウイルスによる蚊媒介性の急性熱性疾患である
- 2024年には、世界で14,401,524人を超えるデング熱患者（重症デング熱52,711人）と11,153人のデング熱関連死がWHOにより報告された
- ブラジルでのデング熱患者数は、2023年1,649,146例、2024年は6,593,268例であり、2025年は第28週までに1,510,267例が報告された
- 東南アジアにおいてもデング熱の流行は毎年発生しており、WPRO域内でも2023年580,704例（死者905例）、2024年は721,291例（死者1,633例）であり、2025年は616,418例（死者1,328例）が報告された

チクングニアウイルス

チクングニヤ熱

- チクングニヤ熱は1952年にアフリカのタンザニアで初めて確認された.
- 「チクングニヤ」とはマコンデ語で「屈む」、「ねじ曲げる」を意味し、激しい関節痛を伴うその臨床症状から名付けられた.
- チクングニヤウイルスはヒトスジシマカ, ネッタイシマカ等のシマカ属の力によって媒介される.
- 1960-80年代にかけてコートジボワール、ナイジェリア、セネガル等の西アフリカ、中央・東・南アフリカで繰り返し分離された。
- 1954年以來フィリピン、タイ、カンボジア、ベトナム、ラオス、マレーシア、インドネシア、ミャンマー、スリランカ、インド等のアジア諸国でもCHIKVの流行がたびたび報告されている.

チクングニアウイルスの感染環

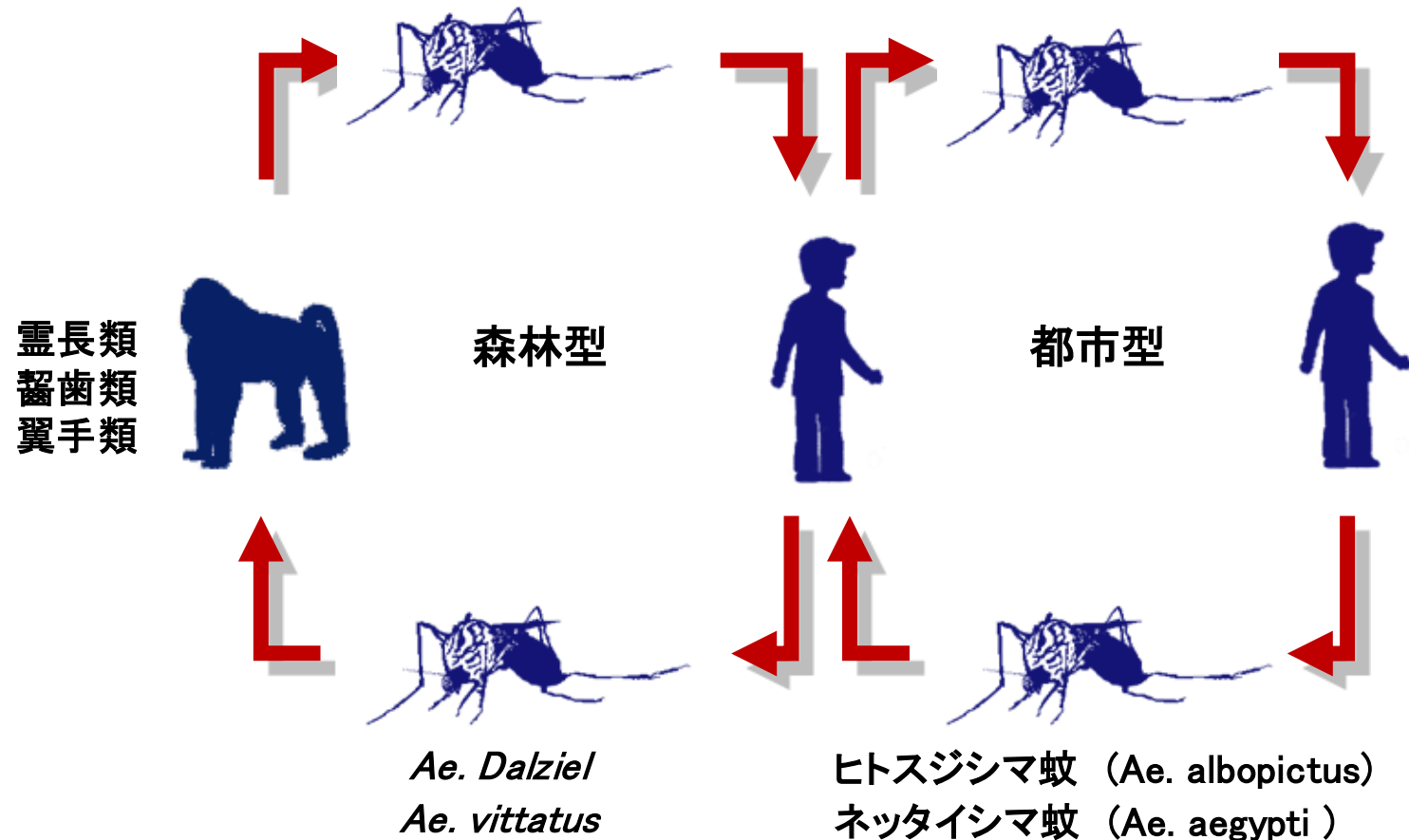
主な媒介蚊



ネッタイシマ蚊
(*Aedes aegypti*)



ヒトスジシマ蚊
(*Aedes albopictus*)



- 急性期のヒトにおけるウイルス血症は非常に高く、吸血した蚊がチクングニアウイルスに感染する可能性は極めて高い。
- したがって日本を含む温帯地域においても輸入症例からチクングニア熱が流行する可能性がある。

チクングニヤ熱の臨床症状

- ヒトにおける潜伏期間は2-12日で多くは不顕性感染
- 発熱, 全身倦怠, リンパ節腫脹, 浮腫, 頭痛, 筋肉痛, 一過性の発疹, 亜急性の関節炎を呈する.
- 出血傾向(鼻出血・歯肉出血)や悪心・嘔吐をきたすこともある.
- 関節炎は特に指関節, 手根関節, 趾関節, 足関節に多発
- 関節痛が数日から数ヶ月持続する場合, 激しい関節痛および多発性腱滑膜炎を伴う慢性末梢性リウマチ様症状を呈し日常生活に困難を伴う
- 主な血液所見はリンパ球減少および血小板減少である.
- 近年の死亡例では呼吸器不全, 心代償不全, 髄膜脳炎, 劇症肝炎, 腎不全等が報告されている
- 母子感染による死流産に加え、出生後の発育障害や発達障害も報告されており、これらは主に妊娠後期や分娩時の感染でリスクが高まるとされる



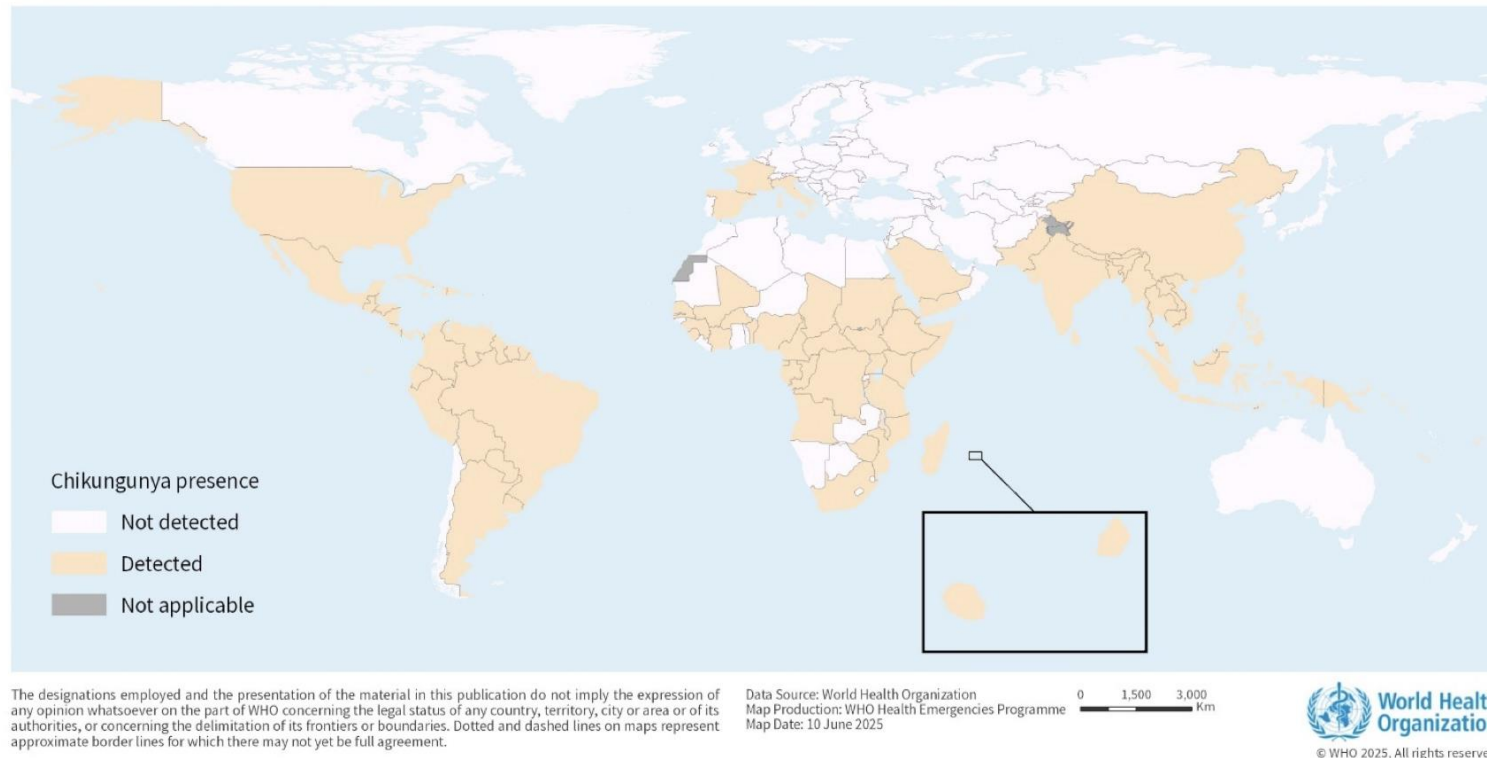
発疹像

Hochedez et al. EID 12(10), 2006.

チクングニヤ熱の診断

- 臨床診断においてCHIK熱に特徴的な症状である発熱、リウマチ様症状あるいは発疹などを認めた場合はCHIK熱を疑う.
- CHIKVの日本への侵淫は現在まで認められていないためCHIKV侵淫地域を発症前2週間以内に訪問した経歴があること、またはこの地域からの訪問者であること等の確認が重要.
- 急性期および慢性期の関節炎は関節リウマチとの鑑別が困難.
- 鑑別診断
 - ・ フラビウイルス: **デング熱・出血熱**
 - ・ アルファウイルス: オニョニョン熱, ロスリバー熱, 西部ウマ脳炎, 東部ウマ脳炎, ベネズエラ脳炎
 - ・ その他の熱帯地域で流行している発熱性疾患: マラリア, 腸チフス, 発疹チフス, インフルエンザ, レプトスピラ症等
- CHIK感染症の臨床症状はデングウイルス(DENV)感染症と最も鑑別が難しく、媒介蚊を共有するためアフリカ、アジアにおける分布域もほぼ一致.
- CHIK熱の確定診断には実験室診断が必須.

これまでにチクングニアウイルスの流行が報告された国と地域



- 2025年7月、WHOは急速に拡大するチクングニア熱に対応し、緊急の国際的警戒を発令した
- これまでに119の国と地域でチクングニア熱の症例が報告されている(WHO)
- WHO・PAHOによると2025年は、世界41の国・地域で、チクングニア熱の症例が計502,264件報告され、そのうち確定症例は208,335件、死亡者は186名であった。
- 中国では、2025年12月11日時点で広東省において25,337症例が報告された(広東省疾病予防管理センター)

まとめ

- 2004年にケニア東岸で再興したチクングニア熱は、2006年には世界各地で流行し、2013年には西半球ではじめて流行した
- チクングニア熱の国内への輸入症例はほぼ毎年数例報告されており、特に2019年には49例報告された
- 輸入症例患者の渡航先はインド、スリランカ、インドネシア、マレーシア、タイ、ミャンマー等のCHIK流行地域であることから、流行地域への渡航者の注意喚起がいっそう重要である
- 2025年7月、WHOは急速に拡大するチクングニア熱に対応し、緊急の国際的警戒を発令した
- WHO・PAHOによると2025年は、世界41の国・地域で、チクングニア熱の症例が計502,264件報告され、そのうち確定症例は208,335件、死亡者は186名であった
- 中国では、2025年12月11日時点で広東省において25,337症例が報告された

日本脳炎

日本脳炎ってどんな病気？

- 日本脳炎ウイルスに感染することにより発症する疾患である
- 日本脳炎ウイルスを持った蚊に刺されることによって感染する
- ヒトに重篤な急性脳炎を起こす
- WHOの推計によると毎年世界で、約43,000人が発症し、このうち11,000人が死亡し、9,000人は回復しても重篤な後遺症を残す
- 日本脳炎の潜伏期は6 ～16 日間
- 感染しても日本脳炎を発病するのは100～1,000人に1人程度、感染者の多くが不顕性感染

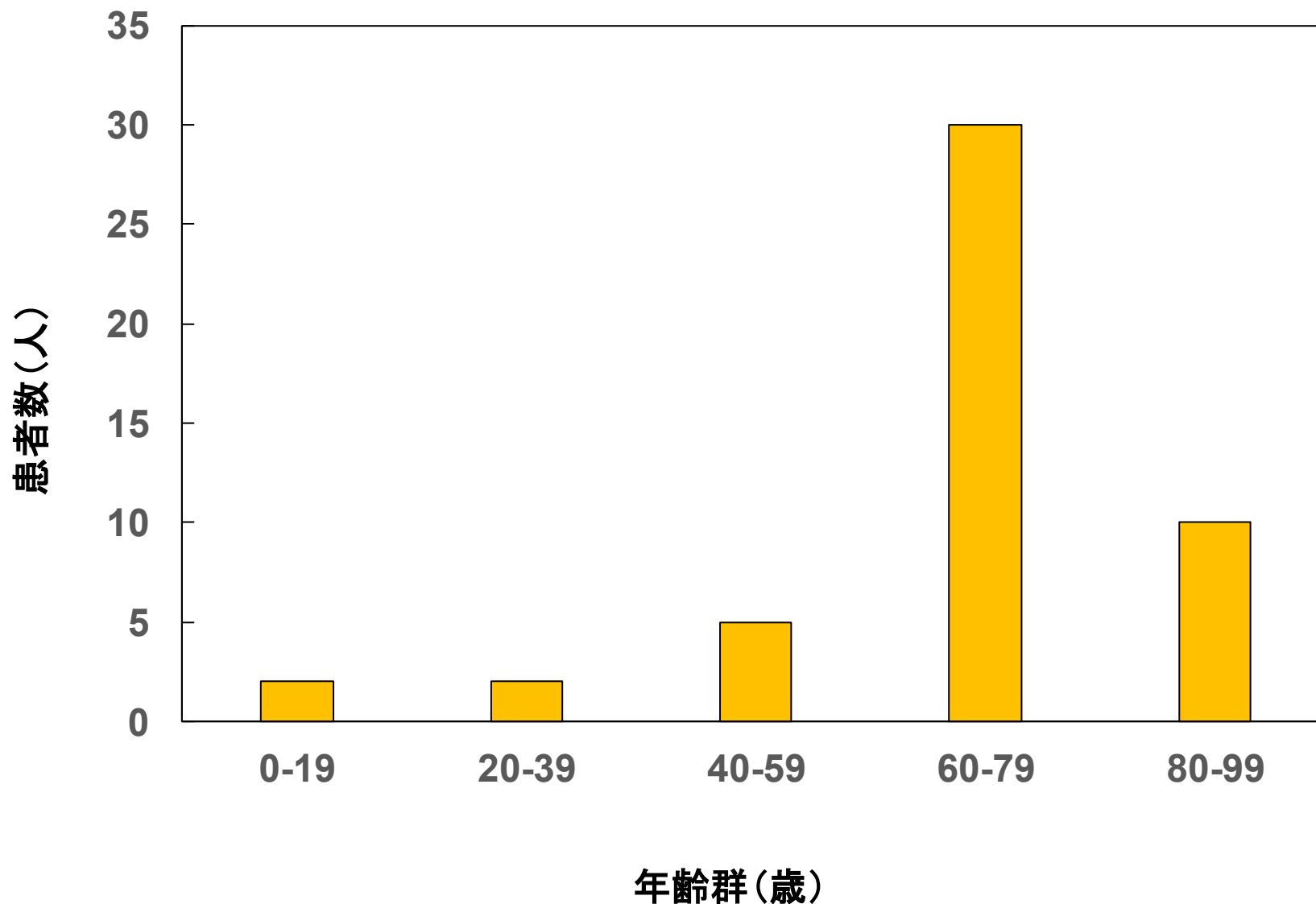


報告日本脳炎患者数, 1991-2024

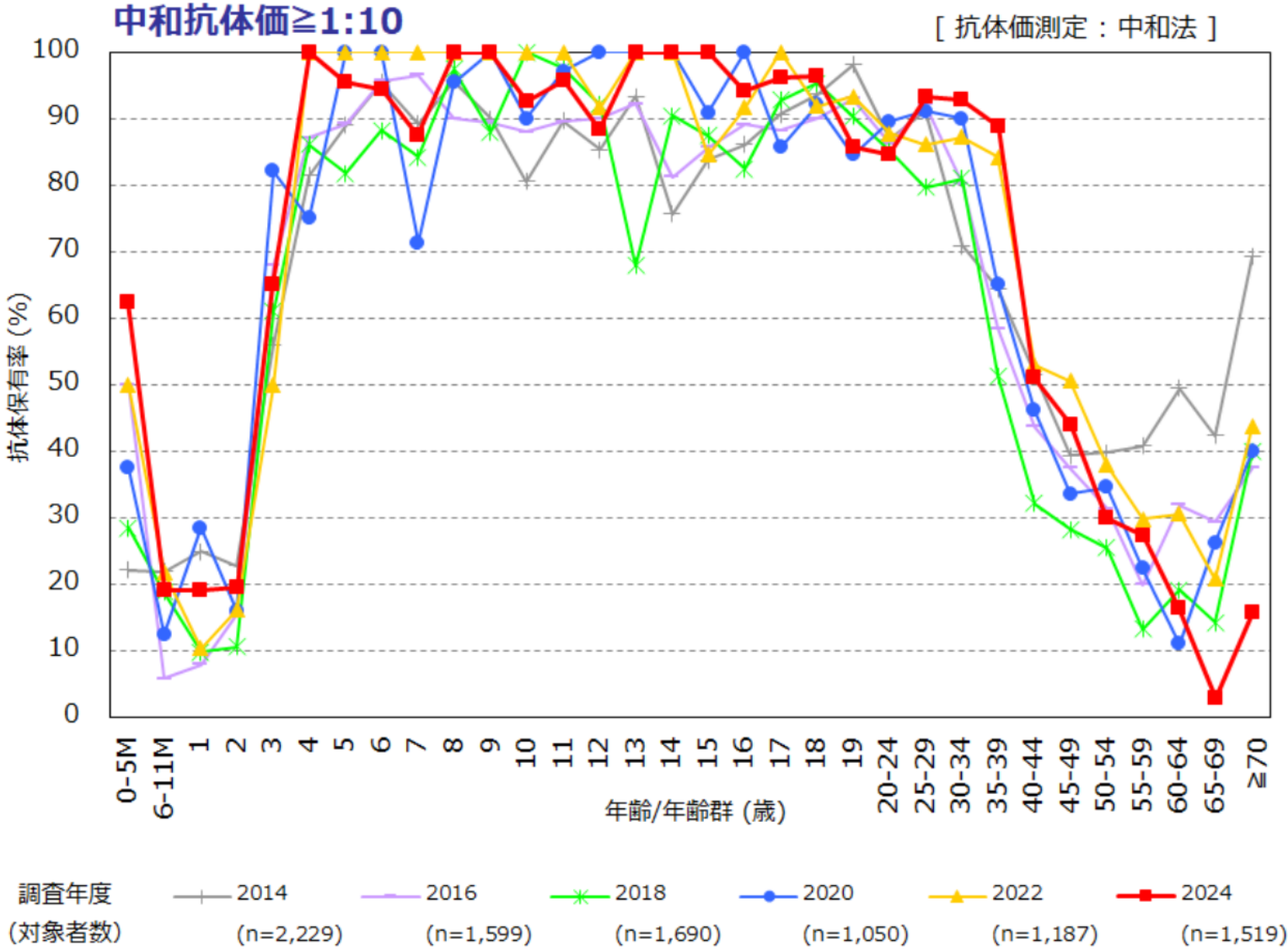
year	total	under 14	under 7
1991	14	1	0
1992	4	0	0
1993	8	0	0
1994	4	0	0
1995	2	1	1
1996	4	0	0
1997	4	0	0
1998	2	0	0
1999	5	0	0
2000	7	0	0
2001	5	1	0
2002	8	0	0
2003	2	1	0
2004	4	0	0
2005	7	0	0
2006	8	1	1
2007	9	0	0

year	total	under 14	under 7
2008	3	0	0
2009	3	2	2
2010	4	1	1
2011	9	2	1
2012	2	0	0
2013	9	0	0
2014	2	1	1
2015	2	1	1
2016	11	0	0
2017	3	0	0
2018	0	0	0
2019	10	0	0
2020	6	0	0
2021	3	0	0
2022	4	0	0
2023	8	0	0
2024	8	0	0

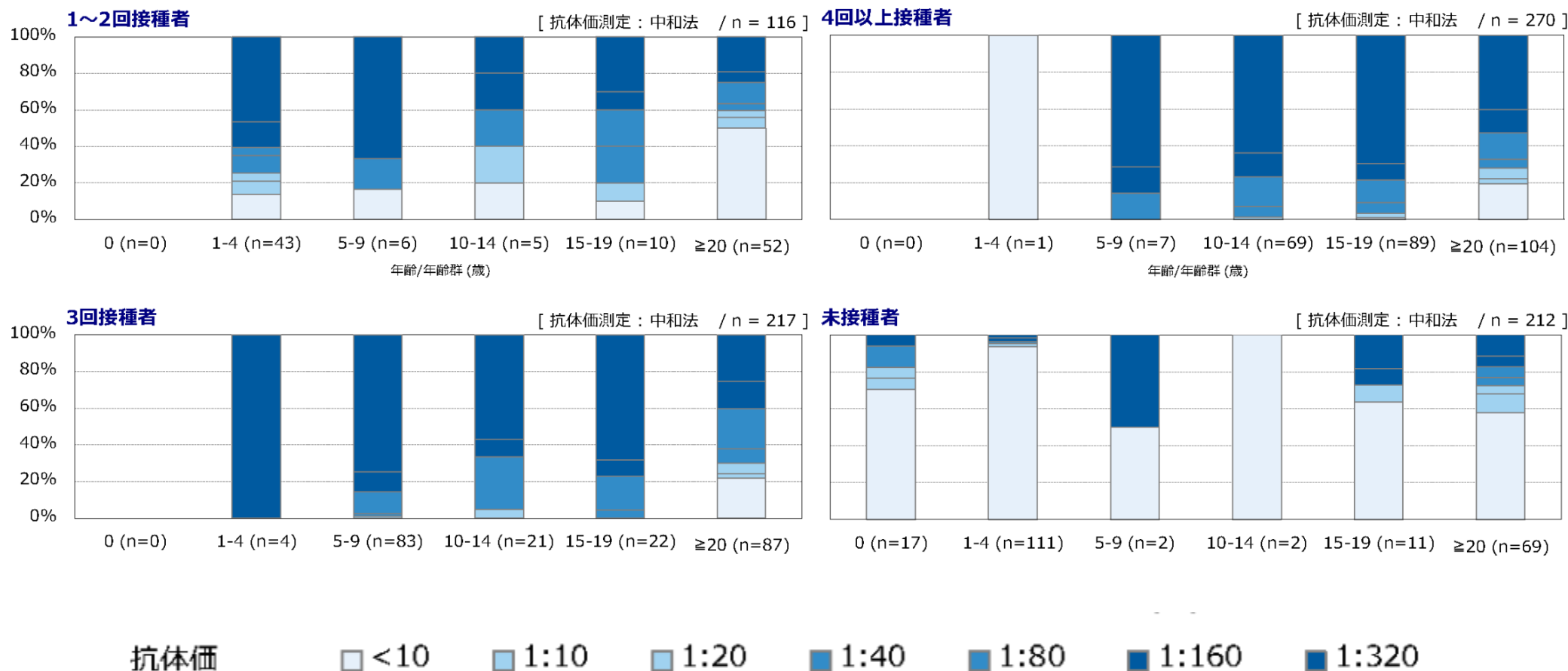
2013-2022年における日本脳炎患者の年齢分布(n=49)



年齢・年齢群別の日本脳炎抗体保有状況の年度比較(2014年～2024年)



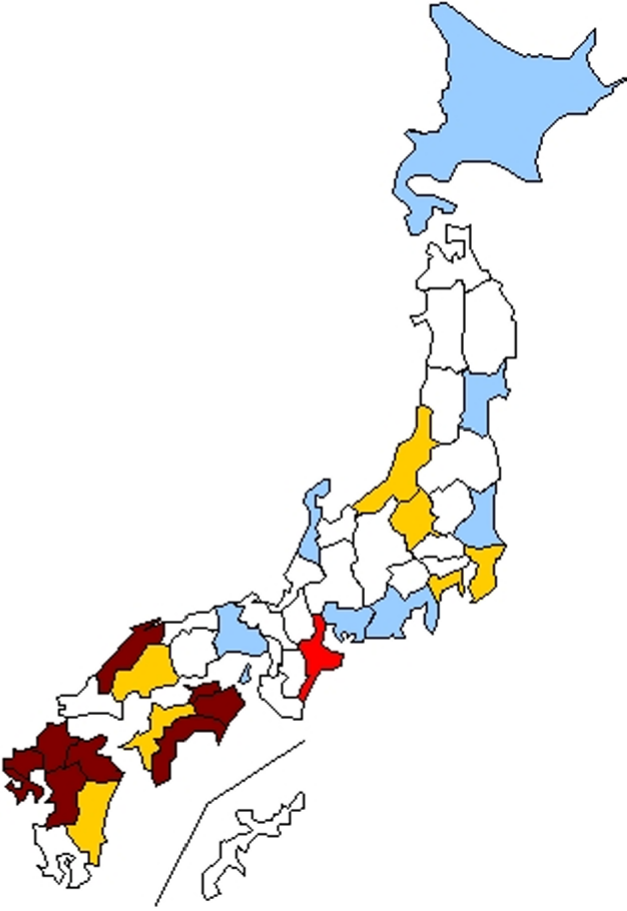
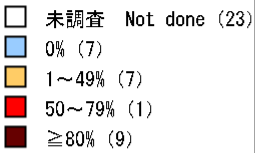
日本脳炎ワクチン接種歴別の年齢/年齢群別日本脳炎抗体保有状況、2023年



日本脳炎ウイルスのブタの感染状況と日本脳炎患者の分布の比較

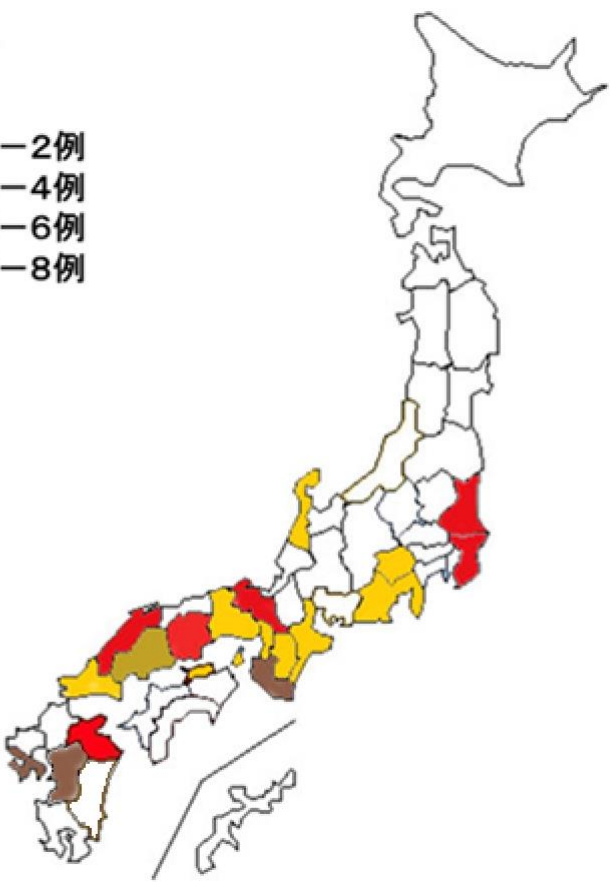
ブタの感染状況

HI抗体保有状況
HI antibody positive ratio



2025年5月～10月におけるブタの
日本脳炎ウイルス感染状況

ヒト患者の分布



2013-2023年における各都道府県の
日本脳炎患者報告数(n=56)

まとめ

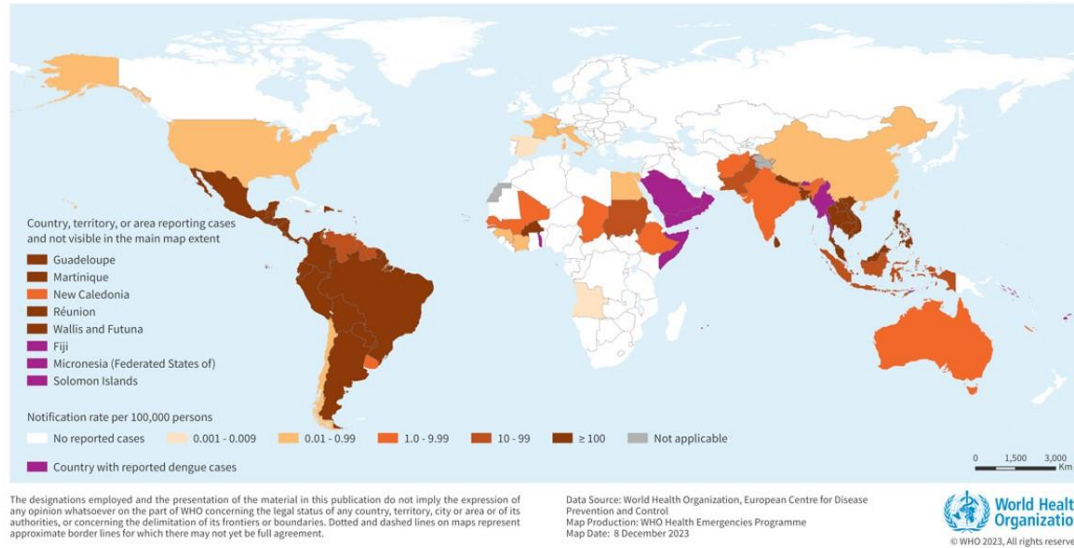
- 日本脳炎(JE)患者は1992年以降毎年10人前後で推移している
- 感染源調査によって示された日本脳炎ウイルスの分布と日本脳炎患者の報告都府県は主に関東以西に多く認められた
- 日本脳炎ワクチン接種歴別の年齢/年齢群別日本脳炎抗体保有状況調査の結果、日本脳炎ワクチン未接種群においても抗日本脳炎ウイルス中和抗体保有者が検出された
- 令和4年度から現在までに実施した不明脳炎患者20名より提供された54検体についてJE特異的IgM抗体検査(54検体)及びTBE特異的IgM抗体検査(53検体)を実施したところ、いずれも陰性であった
- 今後も日本脳炎に対する警戒が必要であり、不明脳炎に対する検査を継続する



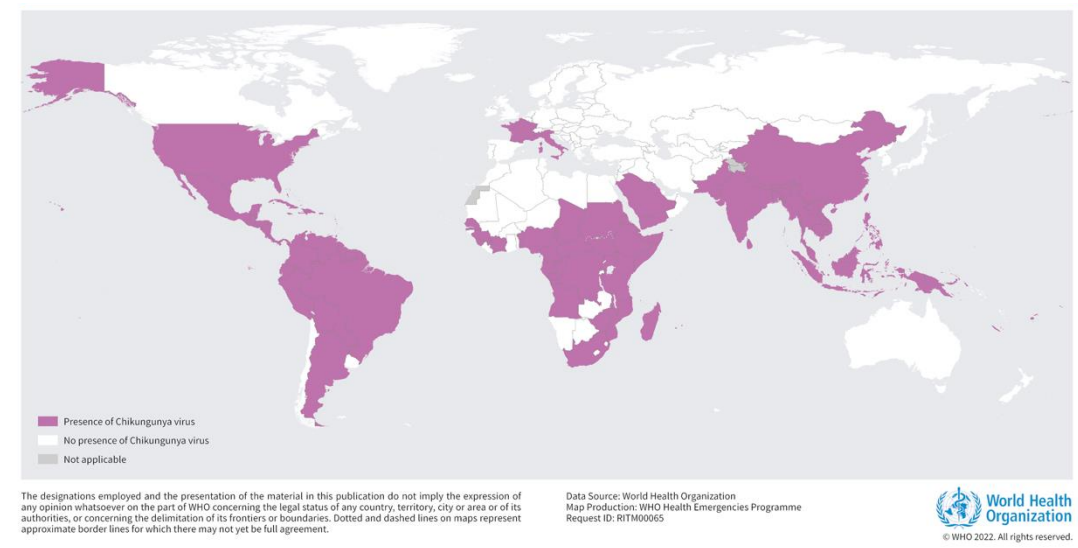
アルボウイルスのマルチプレックス 定量RT-PCR法の確立へ

2026年7月15日 レファレンスセンター等関連会議⑨
国立感染症研究所ウイルス第一部第二室
西山 祥子、木下 一美

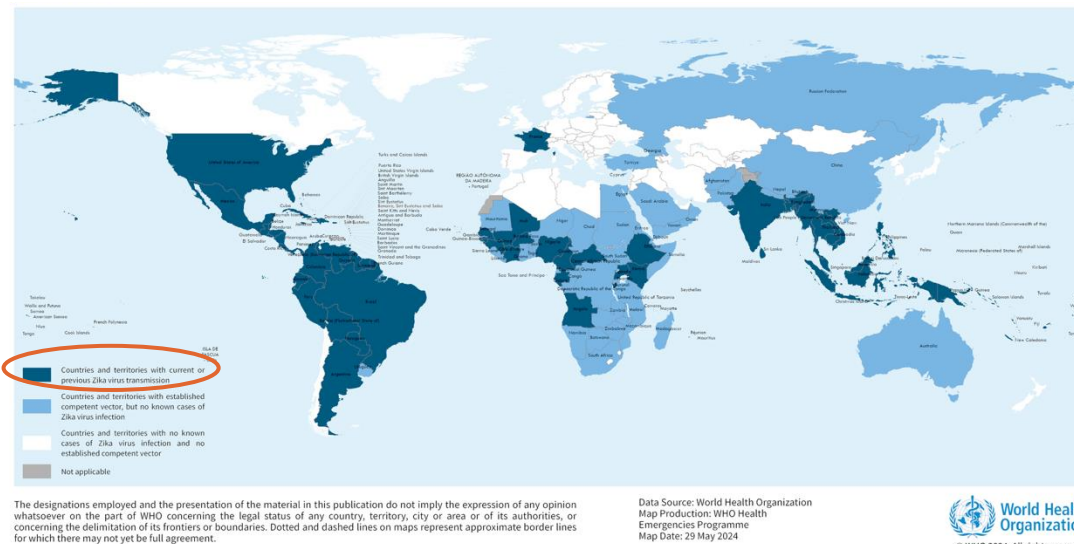
デング熱の流行地域



チクングニア熱の流行地域



ジカウイルス感染症の流行地域



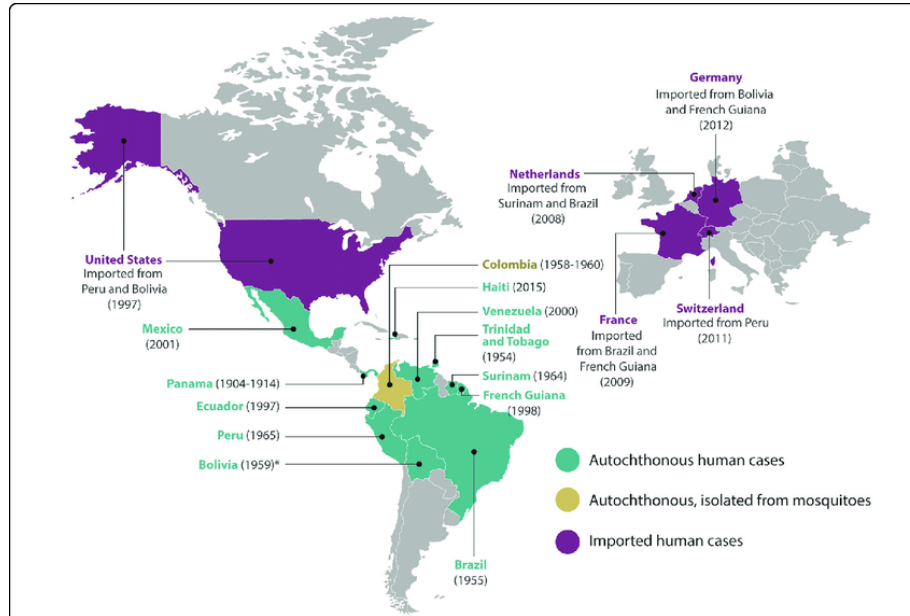
世界的に流行している アルボウイルス感染症

- デングウイルス 1 型
- デングウイルス 2 型
- デングウイルス 3 型
- デングウイルス 4 型
- チクングニアウイルス
- ジカウイルス

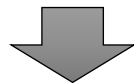
発熱を主徴とする感染症
→鑑別診断が重要

新興アルボウイルス感染症

マヤロウイルスの発生地域

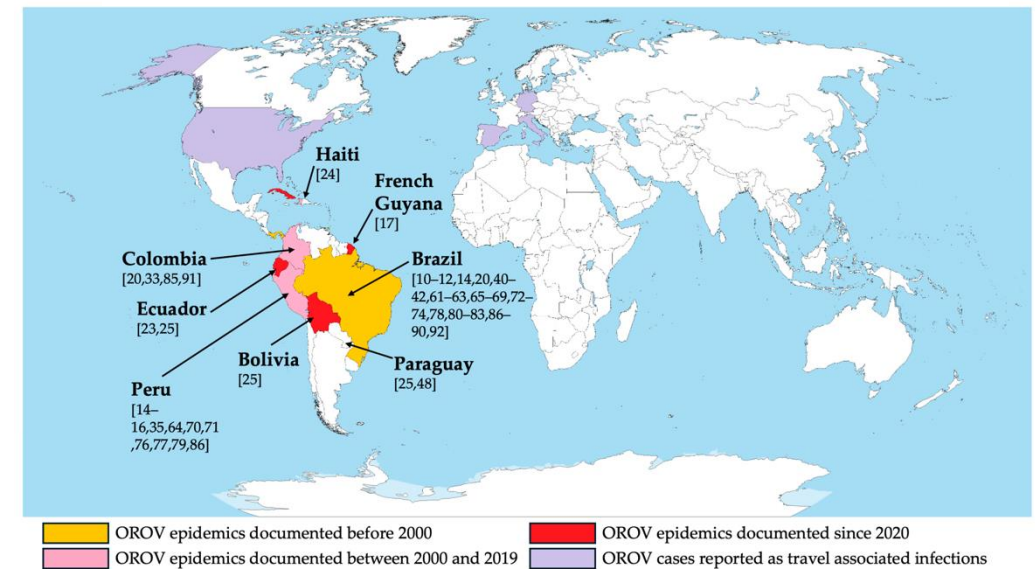


検査すべき
アルボウイルス感染症の増加



アルボウイルス検査の煩雑化

オロプーシェウイルスの発生地域



マルチプレックスqRT-PCRとは

同一反応における2種類以上の遺伝子配列を増幅し特異的に検出する方法

- ・スループットの増加
- ・サンプル使用量の減少
- ・試薬使用量の減少
- ・ピペッティングエラーを最小化



Cy5.5フィルターを搭載可能

Thermoの新たなマルチプレックスPCRシステム

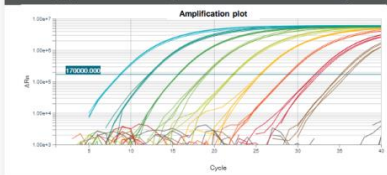
Product performance

Improve efficiency with high-order multiplexing

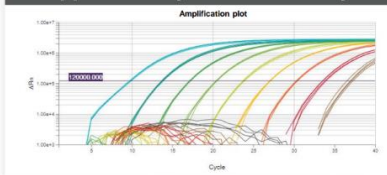


TaqPath DuraPlex master mix has a wide dynamic range and high sensitivity for targets at low copy numbers, even with assays using 5 or more targets in a single well.

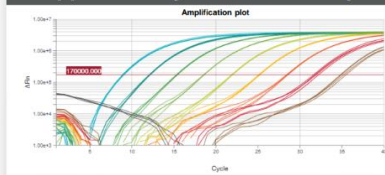
Applied Biosystems™ FAM™ dye



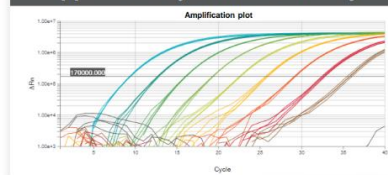
Applied Biosystems™ VIC™ dye



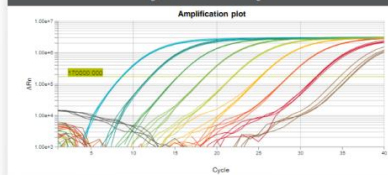
Applied Biosystems™ ABY™ dye



Applied Biosystems™ JUN™ dye

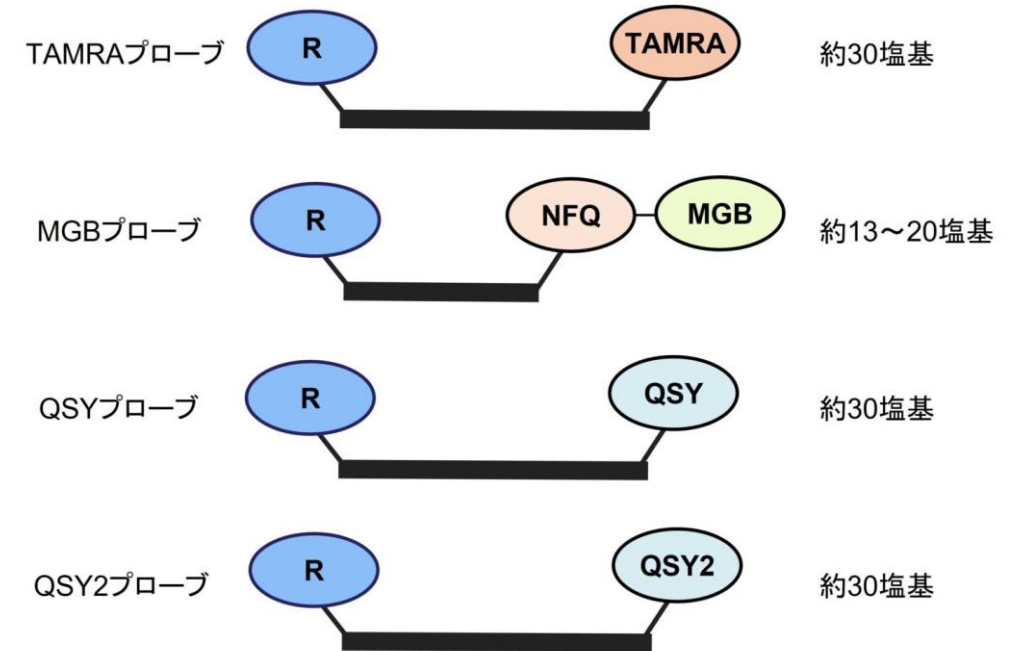


Cyanine 5 dye



+Cy5.5

ThermoFisher
SCIENTIFIC



QSY

新しい非蛍光のクエンチャー
バックが少ない

最大6色のマルチプレックスPCR

QS5



Filters

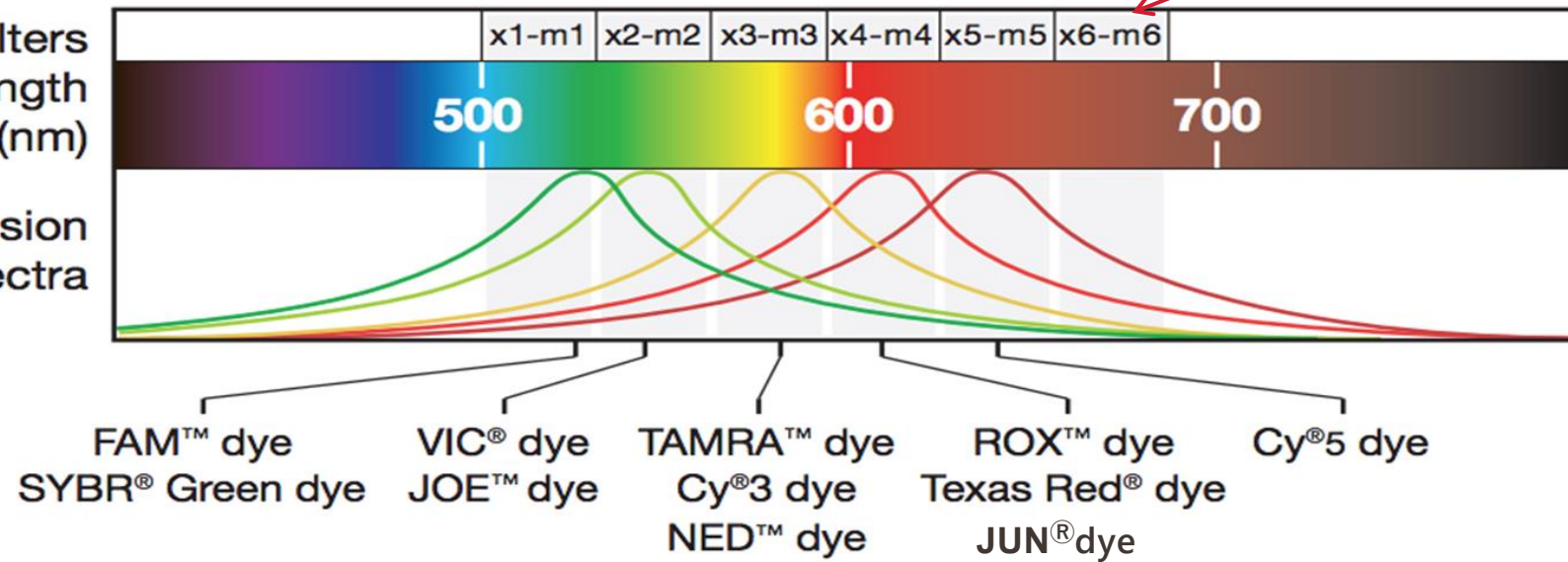
Instruments

	1	2	3	4	5	6
QuantStudio 3 Real-Time PCR System						
QuantStudio 5 (384-well) and 6 Flex, 7500, and 7500 Fast Real-Time PCR Systems						
QuantStudio 5 (96-well), 7 Flex, 12K Flex, and ViiA 7 Real-Time PCR Systems						

Cy5.5

Filters
Wavelength
(nm)

Emission
Spectra



DENV-CHIKVマルチプレックスqRT-PCR (DC 6-plex)

QS5



Set1 : DCセット

- デングウイルス 1 型
- デングウイルス 2 型
- デングウイルス 3 型
- デングウイルス 4 型
- チクングニアウイルス
- **ContAmplicon (CA)**

LC Pro



Set2 : 南米セット

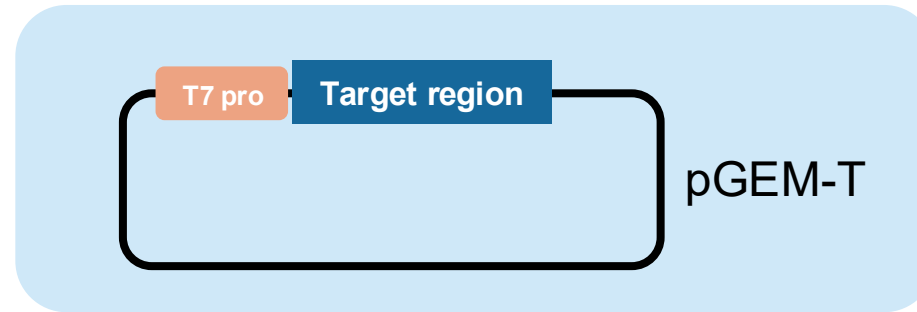
- ジカウイルス
- オロプーシェウイルス
- マヤロウイルス
- 黄熱
- **ContAmplicon (CA)**

...

- ジカウイルス

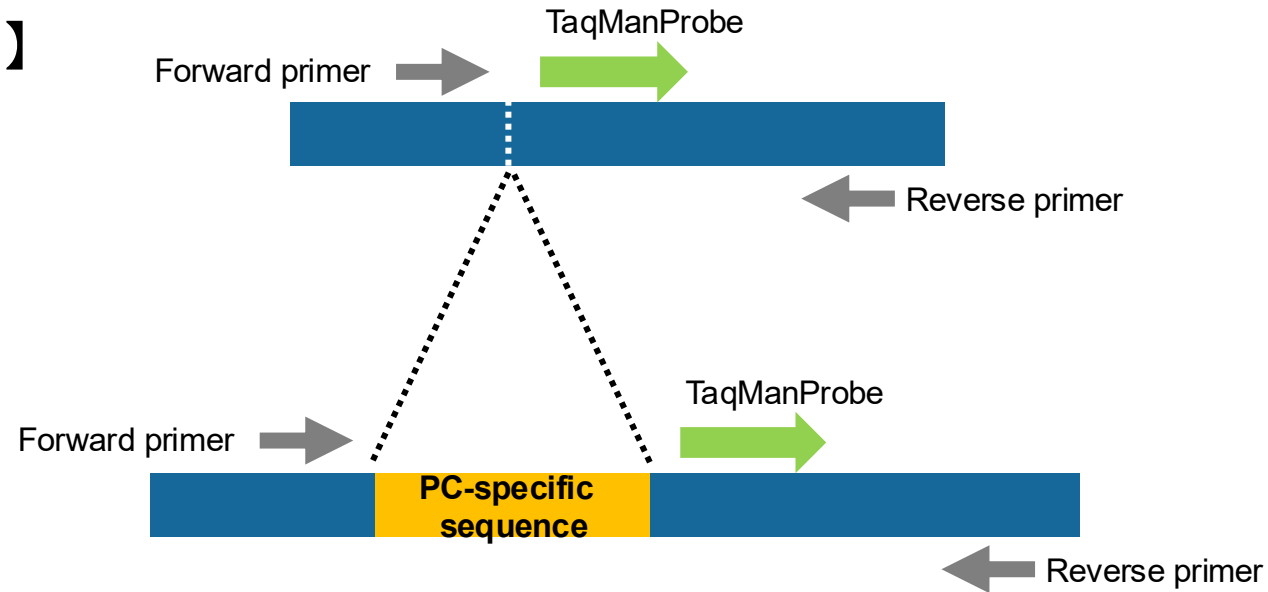
DENV-CHIKV-ZIKV (DCZ 7-plex)

陽性コントロール特異的配列の挿入



in vitro transcription法
合成、精製したRNA

【例】



汚染コントロールのための配列

ContAmplicon (CA): AGT AGC TTG CTC TTT CAT CTG TTA CG

DENV1 (old)

Forward primer

Probe

ContAmplicon

Reverse primer

GGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAAAAGGAAGCCTTATAACGTGTGCTAAG
TTCAAGTGTGTGACAAAACCTGGAAGGAAAAATAGTTCAATATGAAAACCTTGAAATATTCAGTAATAGTCACCGTCCACAC
TGGAGACCAGCACCAGGTGGGAAATGAAAGCACAGAACATGGGACAACCTGCAACTATAACACCTCAAGCTCCCTACagtag
cttgctctttcatctgtttacgGACAGAAATACAGCTGACCGACTACGGAGCTCTTACATTGGATTGTTACCTAGAACAG
GACTAGACTTTAATGAAATGGTGTGTTGTTGACAATGAAAGAAAAATCATGGCTAGTCCA

DENV2

AAGGAAAAATCGTGCAACCAGAAAACCTTGGAGTACACCATTGTGATAACACCTCACTCAGGGGAAGAGAATGCAGTCGGA
AATGACACAGGAAAACACGGCAAGGAAATTAAAGTAACACCACAGAGTTCCATCACAGAAGCAGAAGTtagtagcttgctc
tttcatctgtttacgAACAGGCTATGGCACTGTCAAGATGGAATGCTCTCCGAGAACGGCCTCGACTTCAATGAGATGGT
GTTGCTGCAGATGGAAAACAAGGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTTCTTAGACCTGCCGTTACCATGGCTGCCCCGGAG
CAGAC

DENV3

TGGCGTTAGCTCCTCATGTCGGCATGGGACTGGACACACGCACCCAAACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTGGAGACAA
GTCGAGAAGGTAGAGACATGGGCCCTTAGGCACCCAGGGTTCACCATACTAGCTCTATTTCTTGCCCATTACATAGGCAC
TTCCTTGACCCAGAAAGTGGTTATTTTTATACTACTAATACTGGTCACTCCATCCATGGCAATGAGATGCGTGGGAGTAG
GAAACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCtagtagcttgctctttcatctgtttacgGGGAGCTACGTGGGTGACGTGGTGC
TCGAAC

DENV4

CTTCAATGAGATGATCCTGATGAAAATGAAAAAGAAAACATGGCTCGTGCATAAGCAATGGTTTTTGGATCTGCCTCTTC
CATGGACAGCAGGAGCAGACACATCAGAGGTTCACTGGAATTACAAAGAGAGAATGGTGACATTTAAGGTTCTCATagt
agcttgctctttcatctgtttacgGCCAAGAGACAGGATGTGACAGTGTGGGATCTCAGGAAGGAGCCATGCATTCTGCC
CTCGCTGGAGCCACAGAAGTGGACTCCGGTGATGGAAATCACATGTTTGCAGGACATCTCAAGTGCAAAGTCCGTATGGA
GAAATT

CHIKV

AACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATCGACATAACCGGAAGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCCTCTTT
AACGGACATGTCGTGtagtagcttgctctttcatctgtttacgCGAGGTACCAGCCTGCACCCATTCTCAGACTTTGGGGG
CGTCGCCATTATTAAATATGCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTTCGATGACTAACGCCGTCACTATTCCGGG
AAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCGACGGCCTTAGCCAGCGCCGAATTCCGCGTA
CAAGTC

プライマー量の調整

	Forward プライマー	Reverse プライマー
デングウイルス 1 型	各500nM	
デングウイルス 2 型	各500nM	
デングウイルス 3 型	各750nM	
デングウイルス 4 型	各625nM	
チクングニアウイルス	各250nM	
ContAmplicon	各250nM	

プローブ量：250nMで固定

リアルタイムPCRマスターミックス

TaqPath™ DuraPlex™
1-Step RT-qPCR Master Mix, no ROX

最大6つのターゲットを単一ウェルでマルチプレックス解析できるよう最適化された
4倍濃度のマスターミックス
#A58669 0.5mL ￥56,700



Run protocol (TaqPath™ DuraPlex™)

2. Set up the thermal protocol.

Step	Temperature	Time	Cycles
Reverse transcription ^[1]	53°C	10 minutes	1
Polymerase activation ^[2]	95°C	2 minutes	1
Denature	95°C	3 seconds	40
Anneal / extend ^[3]	60°C	30 seconds	

^[1] RT enzyme will function best in the range of 48–55°C.

^[2] Required for RT inactivation and initial denaturation, and to activate the DNA polymerase.

^[3] Ensure that the annealing temperature is consistent with the melting temperature (T_m) of your primer designs.



2. Set up the thermal protocol.

Step	Temperature	Time	Cycles
Reverse transcription ^[1]	53°C	20 minutes	1
Polymerase activation ^[2]	95°C	2 minutes	1
Denature	95°C	15 seconds	50
Anneal / extend ^[3]	60°C	60 seconds	

RTの強化

伸長強化

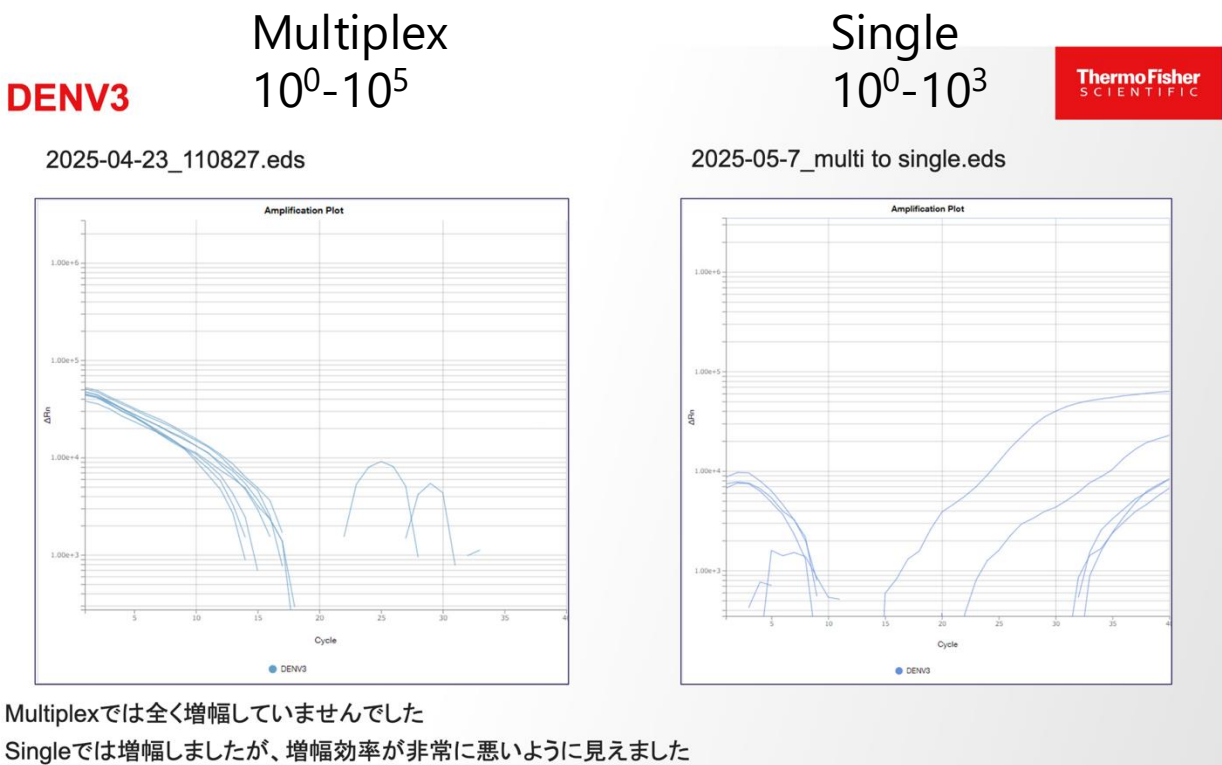
^[1] RT enzyme will function best in the range of 48–55°C.

^[2] Required for RT inactivation and initial denaturation, and to activate the DNA polymerase.

^[3] Ensure that the annealing temperature is consistent with the melting temperature (T_m) of your primer designs.

昨年の報告のおさらい①

DENV3の感度の問題→プライマーを改良



デングウイルス 3 のプライマーデザイン

DENV3

Forward primer

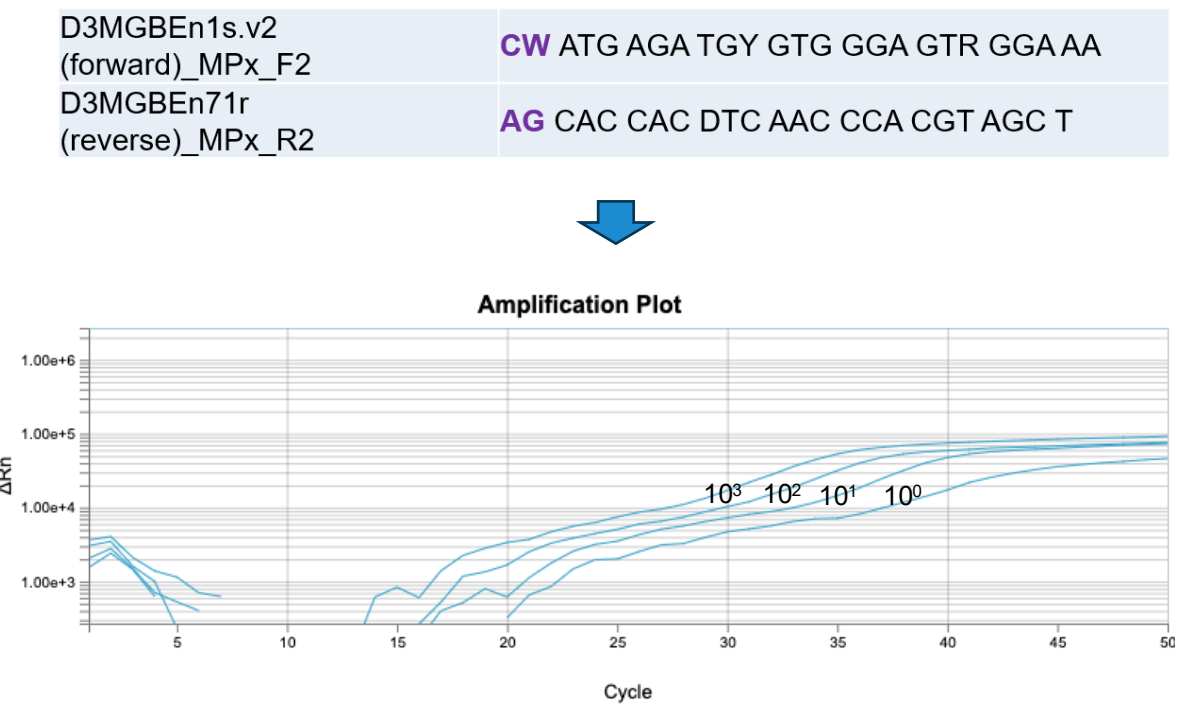
Probe

ContAmplicon

Reverse primer

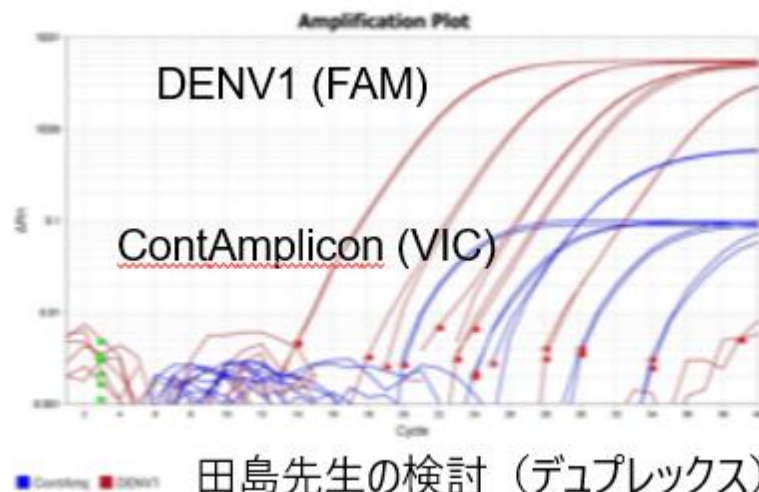
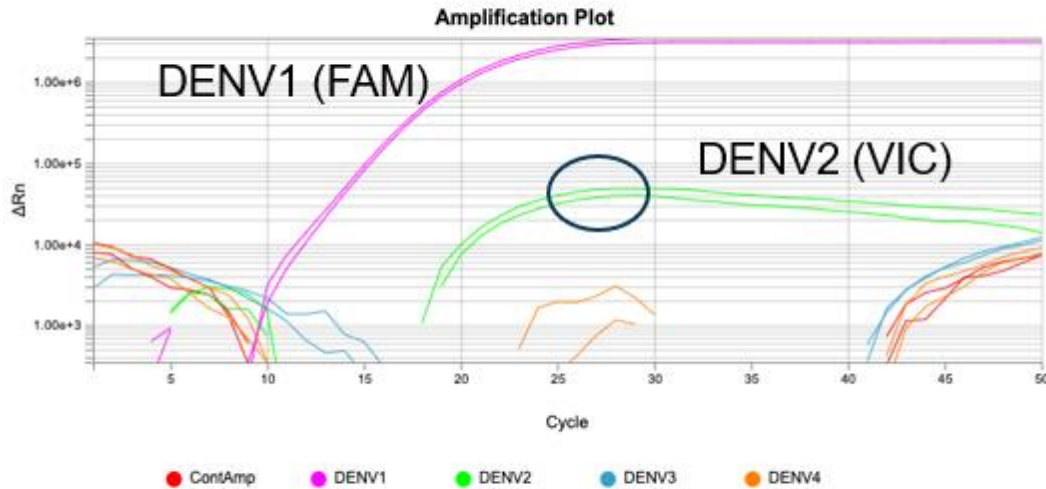
TGGCGTTAGCTCCTCATGTGCGGCATGGGACTGGACACACGCCACCCAAACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTGGAGACAAGT
 CGAGAAGGTAGAGACATGGGCCCTTAGGCACCCAGGGTTCACCATACTAGCTCTATTTCTGCCCATTACATAGGCACTTCC
 TTGACCCAGAAAGTGGTTATTTTTATACTACTAATACTGGTCACTCCATCCATGGCAATGAGATGCGTGGGAGTAGGAAACA
 GAGATTTTGTGGAAGGTCTATCagtagcttgctctttcatctgttacgGGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTCTCGAAC

5 末に 2 塩基追加

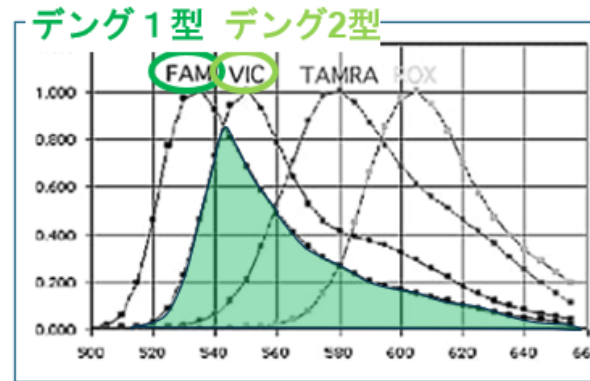


昨年の報告のおさらい②

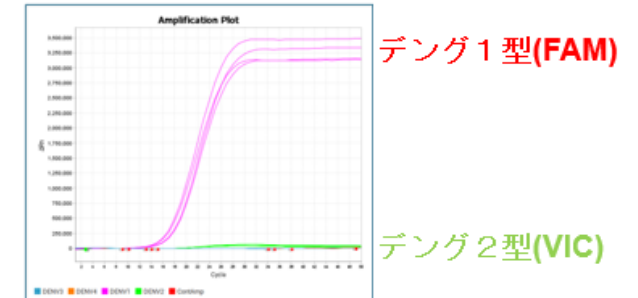
デングウイルス 1 型陽性検体の非特異反応



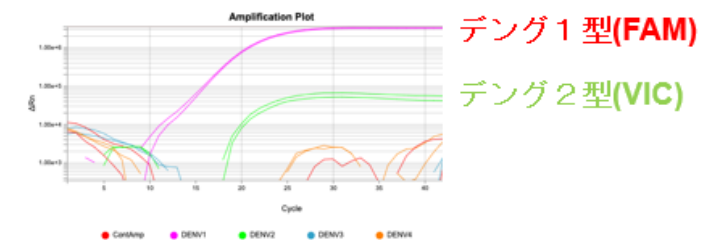
HEXとVICの非特異シグナルの原因は？



FAMの長波長側の蛍光がVICと重複
→通常ソフトウェアが修正



LinerだとVICの蛍光は低い



LogだとVICの蛍光が強調

- プローブ配列に依存
- DENV1のプライマー・プローブ配列を検討

デングウイルス1型のプライマー・プローブの変更→陽性コントロール **NEW!**

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2005, p. 4977–4983
0095-1137/05/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005

Vol. 43, No. 10

Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay

Barbara W. Johnson,* Brandy J. Russell, and Robert S. Lanciotti

*Diagnostic and Reference Laboratory, Arbovirus Diseases Branch, Division
of Vector-Borne Infectious Diseases, Centers for Disease Control
and Prevention, Fort Collins, Colorado*

4978 JOHNSON ET AL.

TCTCTC→TCYCTR

J. CLIN. MICROBIOL.

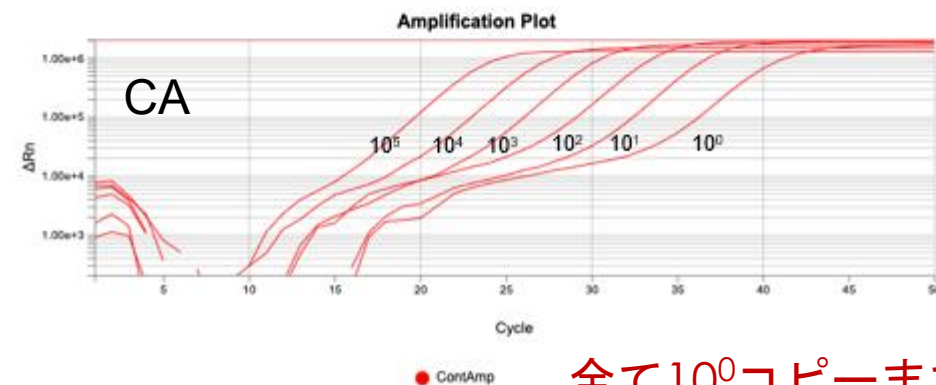
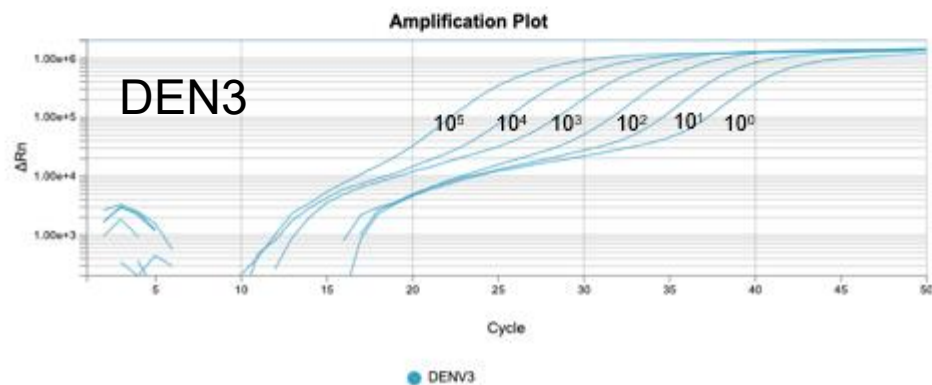
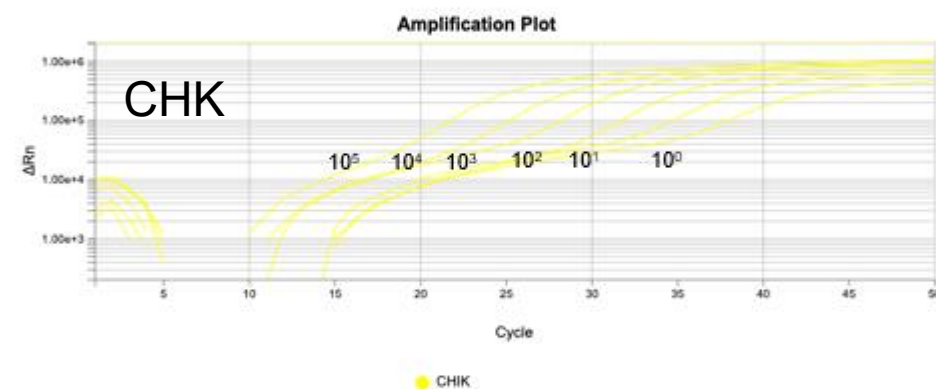
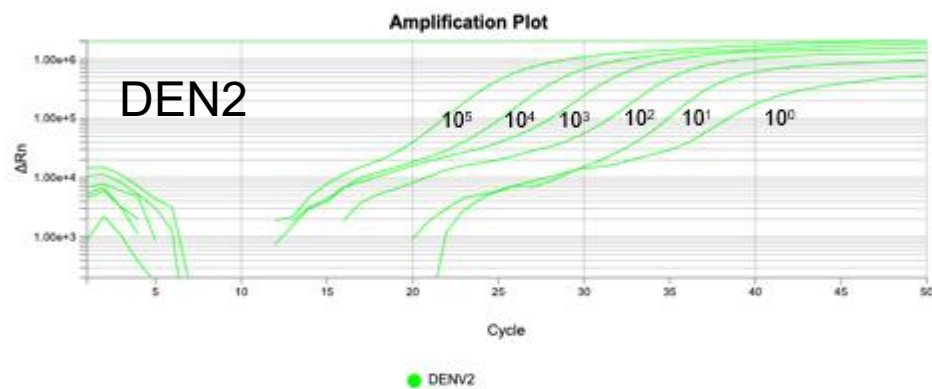
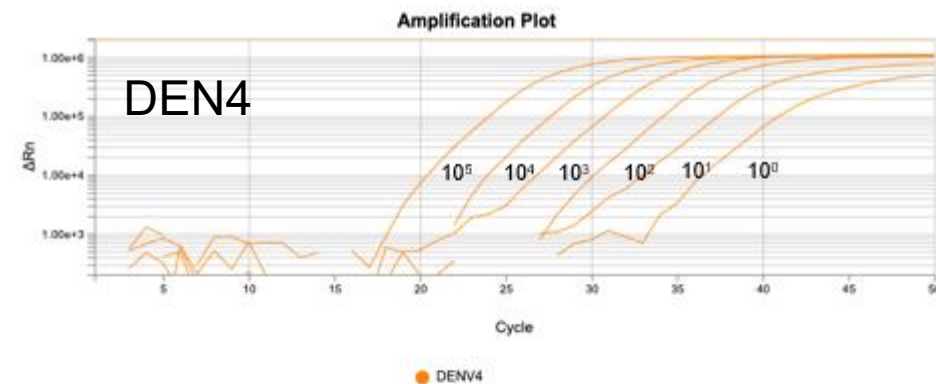
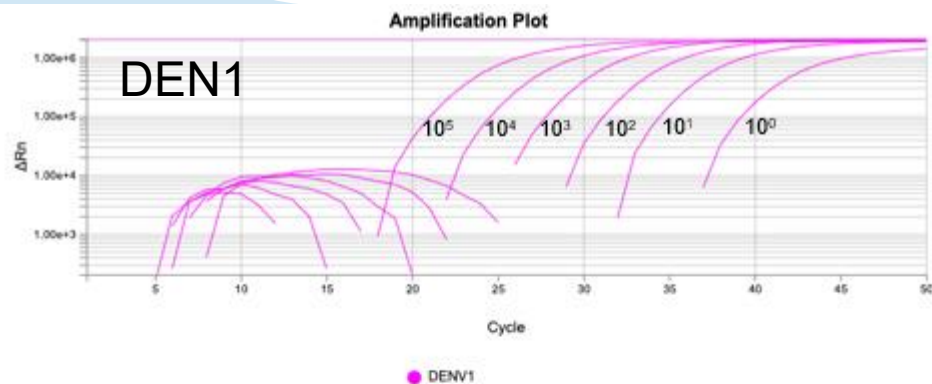
TABLE 1. Oligonucleotide primers and fluorogenic probes used in the serotype-specific DEN virus real-time RT-PCR assay

Virus serotype detected	Nucleotide sequence	Genome position	Fluorophore
DEN-1 F	CAAAAGGAAGTCGTCGAATA	8973	VIC/MGB
DEN-1 C	CTGAGTGAATCTCTCTACTGAACC	9084	
DEN-1 probe	CATGTGGTTGGGAGCACGC	8998	

デング・チクングニア プローブ (改良)

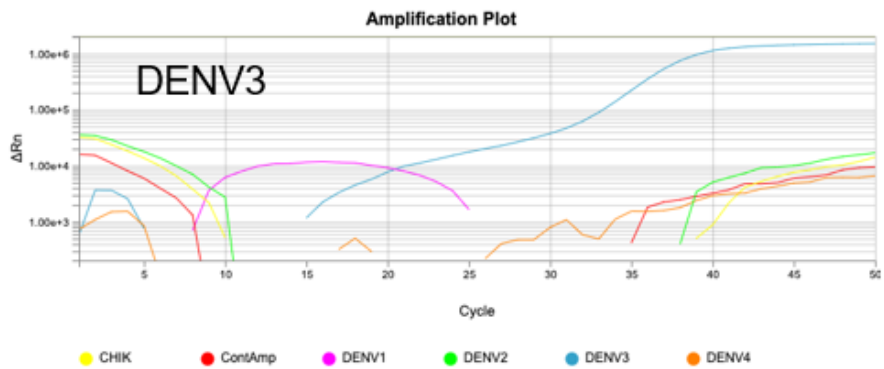
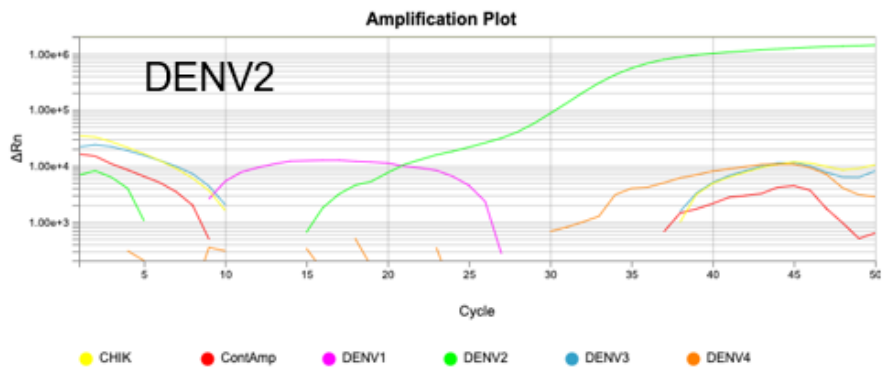
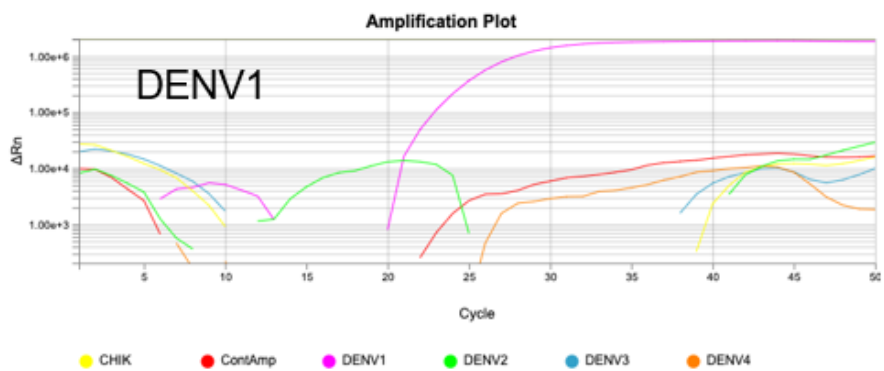
- デングウイルス 1 型 : VIC-CATGTGGTTGGGAGCACGC-MGB *For/Rev primer、PCも変更
-
- デングウイルス 2 型 : FAM-CGA TGG ART GCT CTC-MGB
- デングウイルス 3 型 : JUN- AGA TTT TGT GGA AGG YCT-MGB **For/Rev primerも2bp追加
- デングウイルス 4 型 : Cy5-CCA AGA GAC AGG ATG TGA CAG TGC TRG GAT C-QSY2
- チクングニアウイルス : NED-TAC CAG CCT GCA CYC-MGB
- ContAmplicon : Cy5.5-AGT AGC TTG CTC TTT CAT CTG TTA CG-QSY2

デング・チクングニア プローブ (改良)

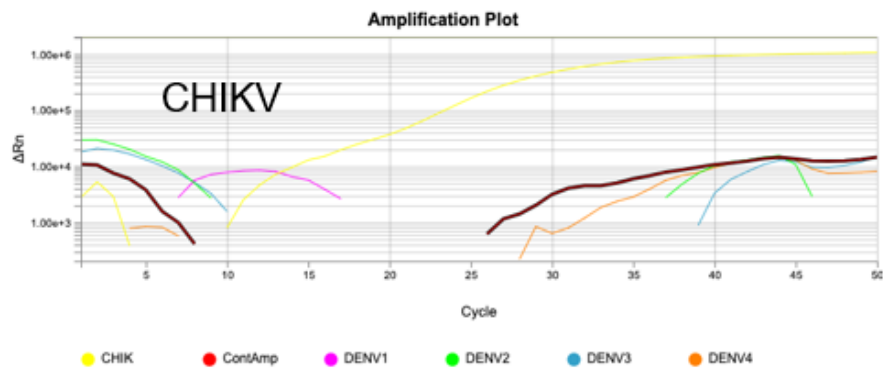
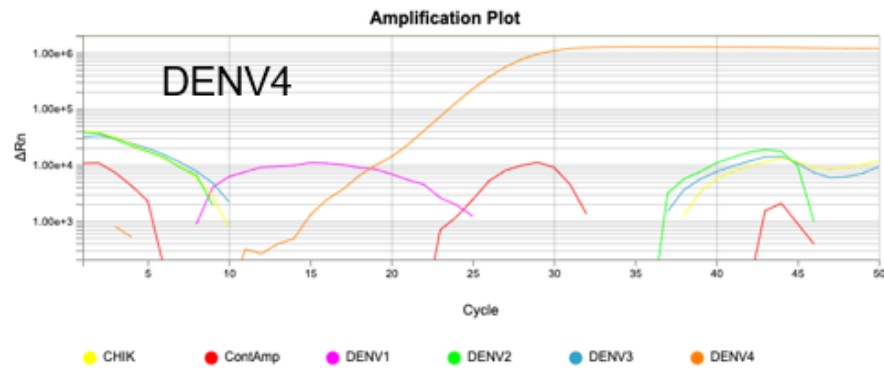


全て10⁰コピーまで検出可能

デング・チクングニア プローブ (改良)



検体での性能と非特異反応



検体 Ct値	Multi (6-plex)	Duplex (2-plex)
DENV1	22.6	27.5
DENV2	29.2	28.3
DENV3	33.6	32.9
DENV4	21.6	24.0
CHIKV	22.5	21.8

非特異なく検体も検出可能

LightCycler® PRO システムでの検証



- Roche diagnostics社製
LightCycler 480の後継機
- 7色マルチプレックスPCR

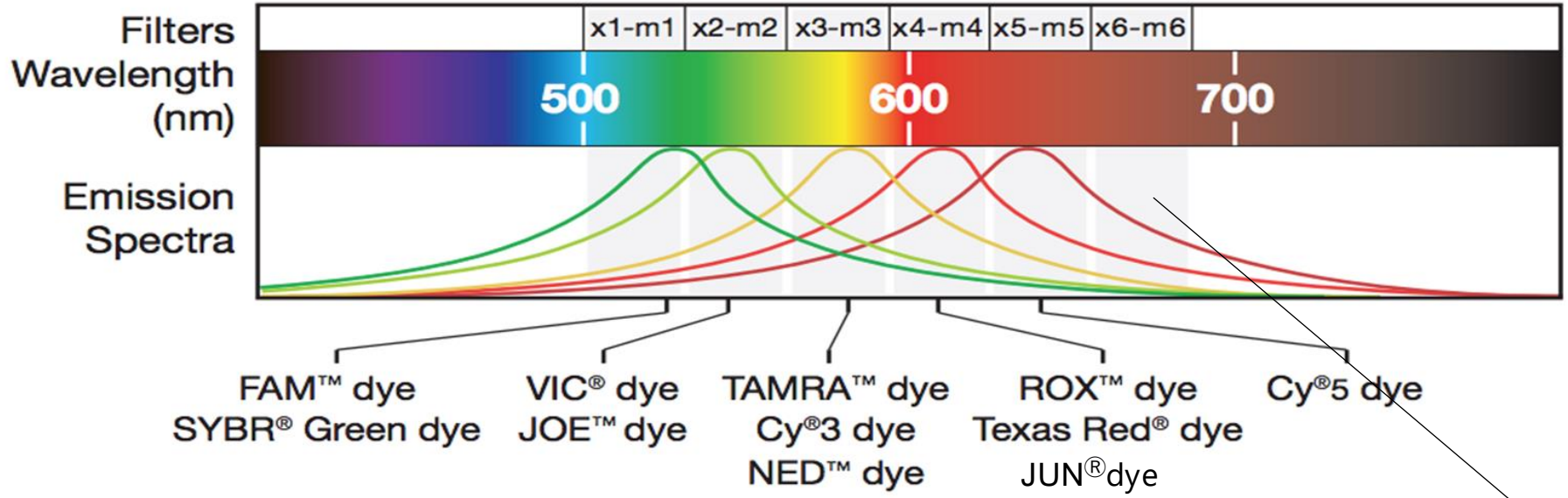
均一性：ウェル間のデータのばらつきを低減

再現性：低コピー数のサンプル、非常に高い再現性

全国の検疫所
で使用



Thermo Fisherシステムも
使用可能か？



QS5



517nm	554nm	567nm	618nm	667nm	695nm
FAM -D2	VIC -D1	NED CHK	JUN -D3	Cy5 -D4	Cy5.5 CA

LCPro



500nm	517nm	554nm	615nm	640nm	673nm	695nm
Cyan500* -CHK	FAM -D2	HEX -D1	TexasRed /ROX-D3	LCRed640 -ZIK	Cy5/Atto647 -D4	Cy5.5 CA

蛍光プローブの変更

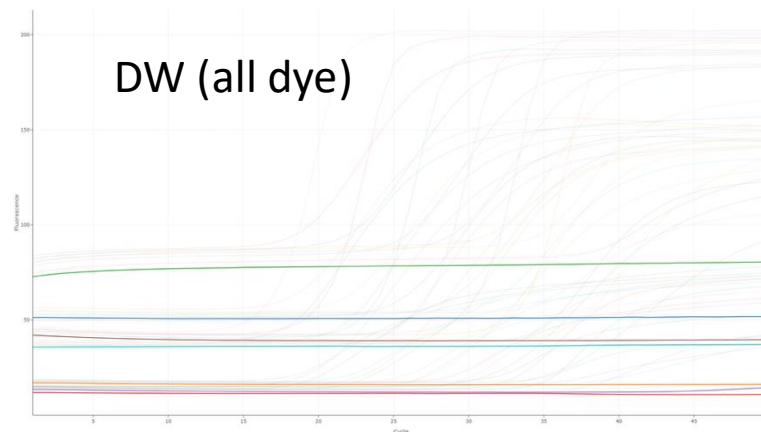
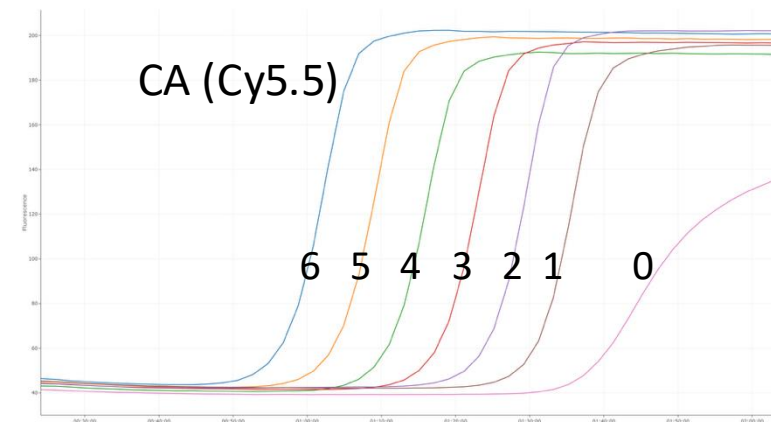
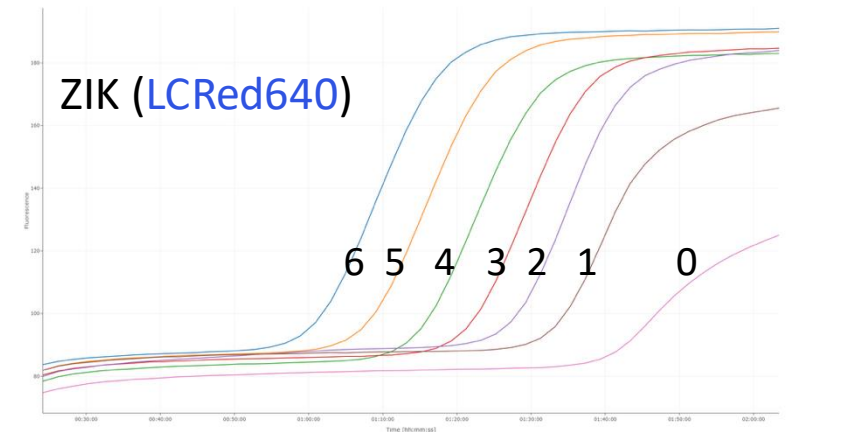
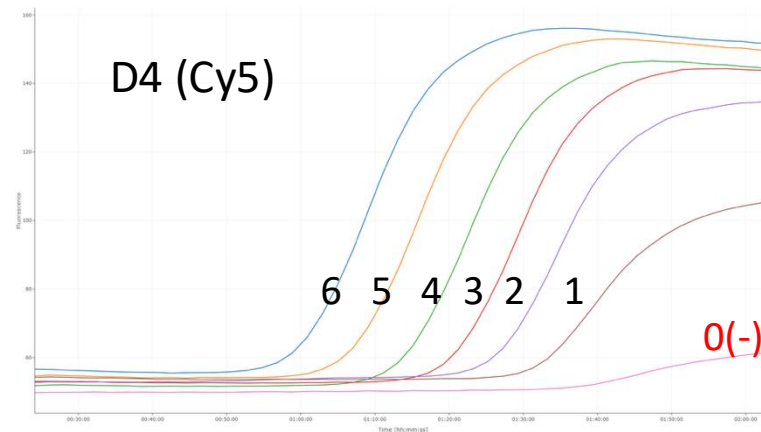
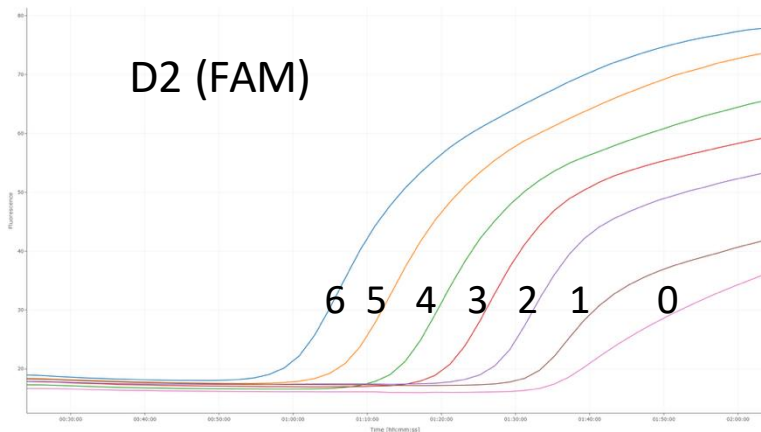
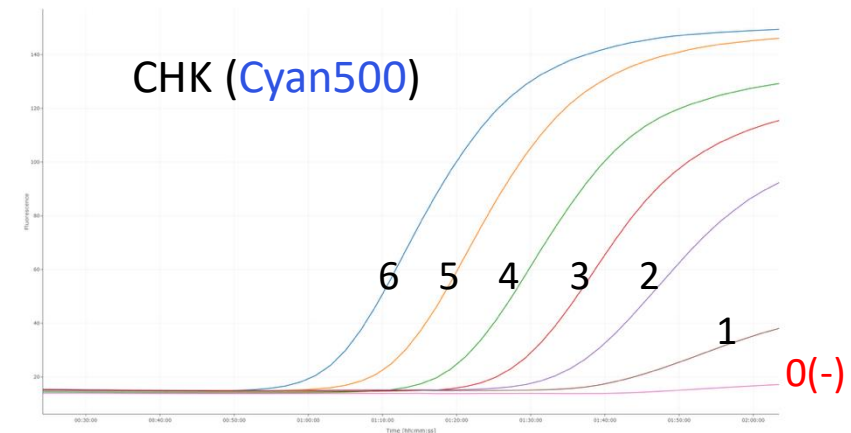
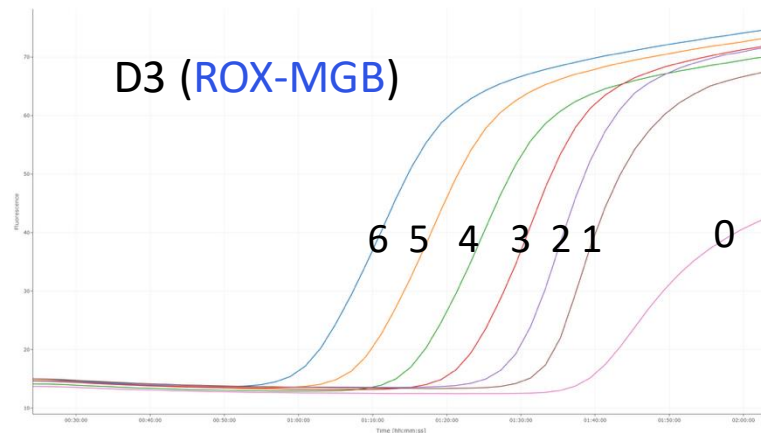
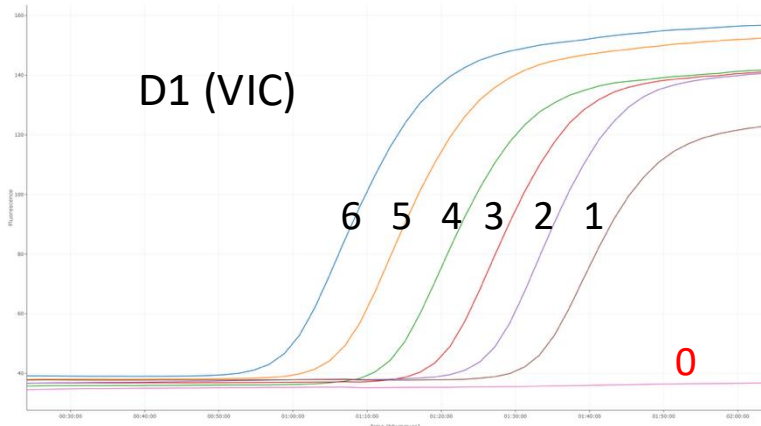
QuantStudio 5

- デングウイルス 1 型 : VIC
- デングウイルス 2 型 : FAM
- デングウイルス 3 型 : JUN
- デングウイルス 4 型 : Cy5
- チクングニア : NED
- ContAmplicon : Cy5.5



LightCycler PRO

- デングウイルス 1 型 : VIC/HEX
- デングウイルス 2 型 : FAM
- デングウイルス 3 型 : ROX
- デングウイルス 4 型 : Cy5
- チクングニア : Cyan500
- ContAmplicon : Cy5.5
- ジカウイルス : LCRed640



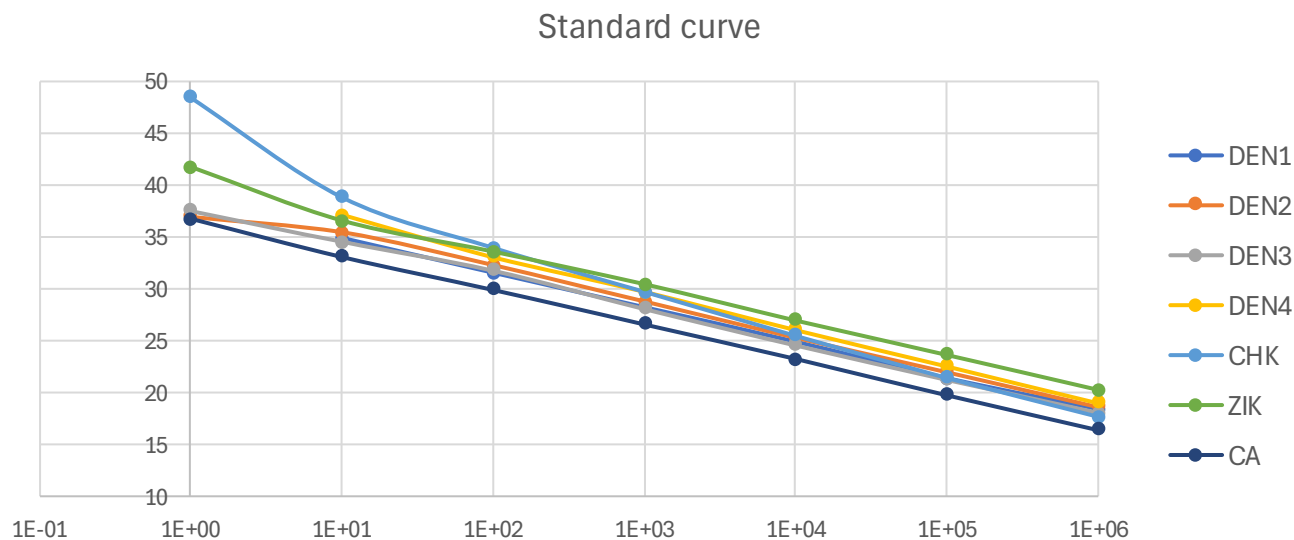
LC Pro, DCZ-Multiplex		
	53°C	20 min
	95°C	2 min
50cycles	95°C	15 sec
	60°C	1min

D+C+Z $10^6 \sim 0.1 \times 10^6$ / μ L x 5 μ L/well

copies/ μ L	DEN1 VIC	DEN2 FAM	DEN3 ROX	DEN4 Cy5	CHK* Cyan500	ZIK LCRed640	CA Cy5.5
1E+06	18.37	18.67	17.97	19.04	17.61	20.22	16.43
1E+05	21.37	21.99	21.27	22.49	21.45	23.65	19.77
1E+04	24.86	25.35	24.56	26.02	25.53	26.98	23.18
1E+03	28.23	28.73	28.07	29.66	29.65	30.40	26.62
1E+02	31.48	32.20	31.75	33.06	33.92	33.55	29.92
1E+01	34.85	35.36	34.42	37.03	38.82	36.52	33.05
1E+00		37.00	37.48		48.46	41.64	36.70

LC Pro, DCZ-Multiplex		
50cycles	53°C	20 min
	95°C	2 min
	95°C	15 sec
	60°C	1min

D+C+Z 10⁶~0コピー/ μ L x 5 μ L/well



改良案

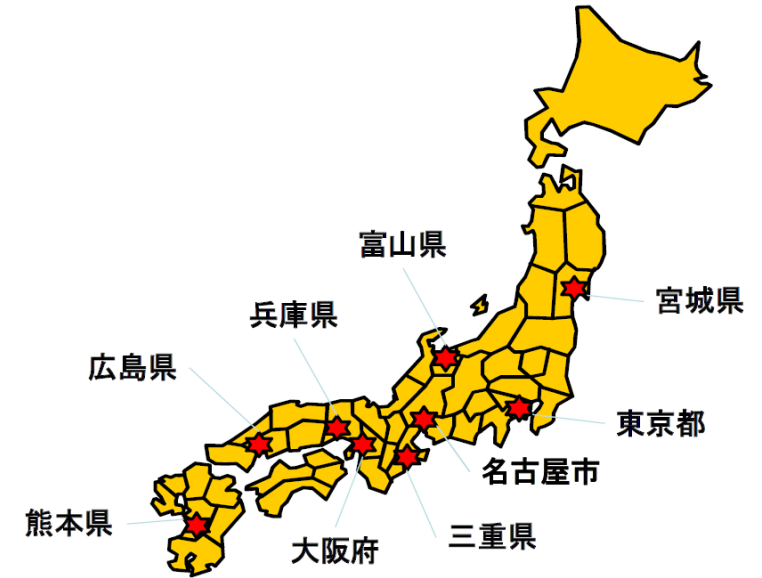
- サイクル数を減らす
50 (2hr) → 45、40 (10分, 20分短)

DENV-CHIKVマルチプレックス (DC 6-plex)

DCマルチプレックスのキットをR7年度末に配布

- ✓ プローブ・プライマーMIX (D1,D2,D3,D4,CHK,CA)
- ✓ マスター ミックス (TaqPath™ DuraPlex™)
- ✓ 陽性コントロール (DC-CA : 10^9 copies each/ μ L)

※D1のPCは新規



DW	4 μ l
TaqPath™ DuraPlex™ Master Mix	5 μ l
DENV1 PP mix (20X)	1 μ l
DENV2 PP mix (20X)	1 μ l
DENV3 PP mix (20X)	1 μ l
DENV4 PP mix (20X)	1 μ l
CHIKV PP mix (20X)	1 μ l
ContAmp Probe (20X)	1 μ l
Sample RNA/PC/NC	5 μ l
Total	20 μ l

配布予定

- ✓ Cy5.5キャリブレーションプレート

DCマルチプレックスの試行⇒
結果やご意見のフィードバック⇒改良

まとめ

- QS5で使用可能なDENV-CHIKVマルチプレックスqRT-PCR法（DC 6-plex）を確立した
- DC-マルチプレックスキットをレファレンスセンターに配布
Cy5.5のキャリブレーションプレート配布予定
各地衛研でも検証をお願いします
- LCProではDENV-CHIKV-ZIKVマルチプレックス（DCZ 7-plex）も可能であった
更に陽性検体を用いて検証予定
- 南米セットや脳炎セットも作製予定