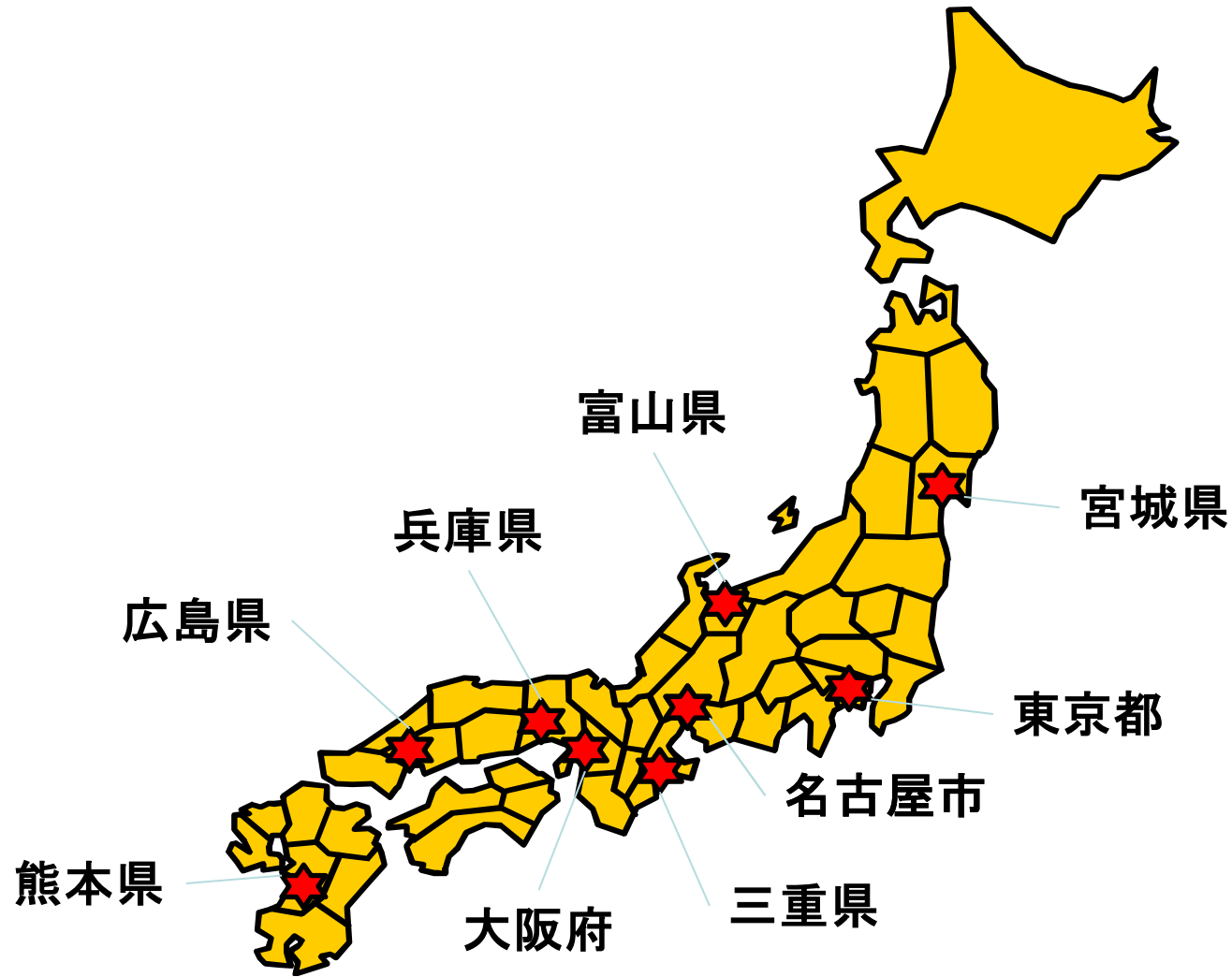


アルボウイルスレファレンスセンター等 関連会議

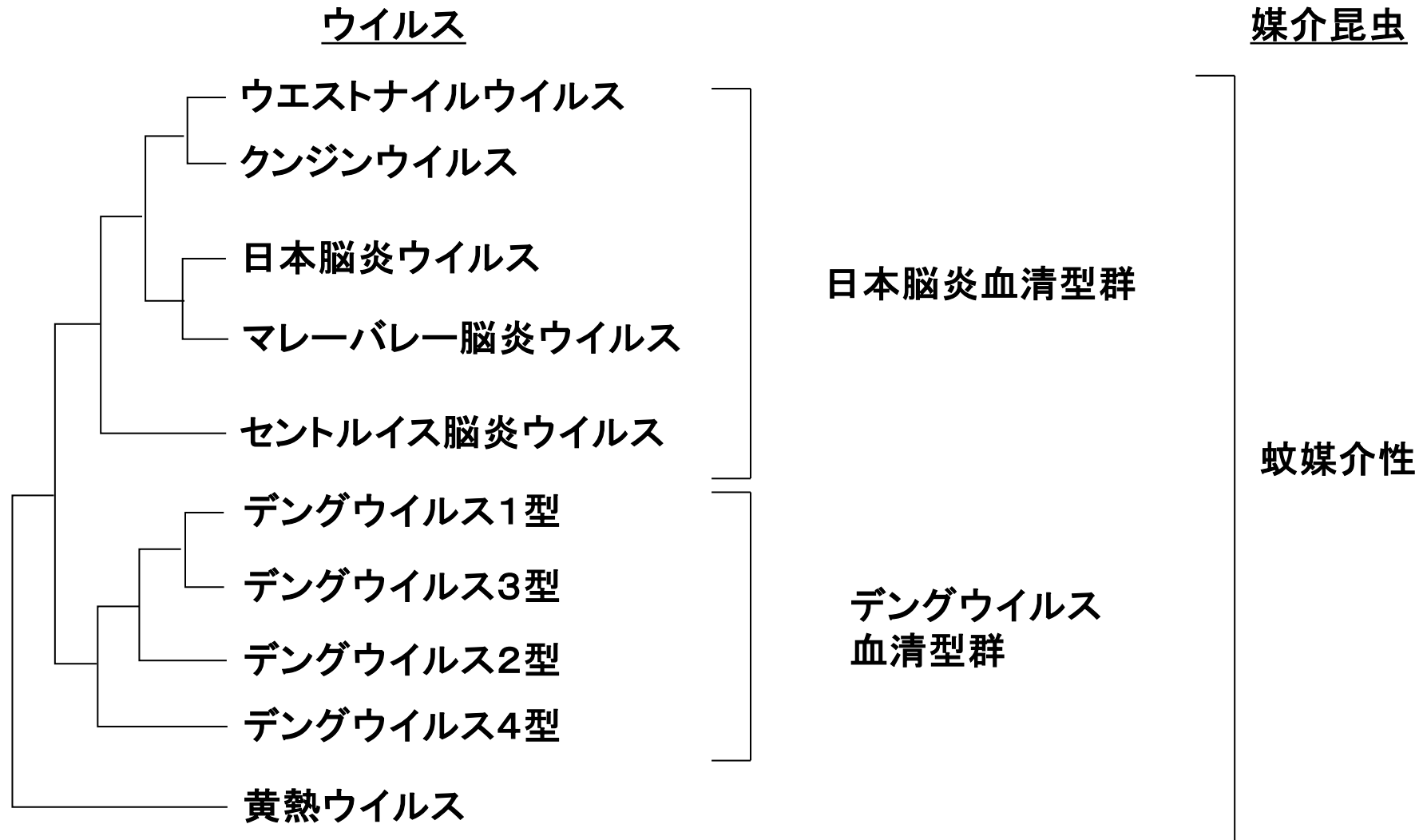
2024年7月10日(金)

国立感染症研究所ウイルス第1部第2室

アルボウイルス感染症レファレンスセンター



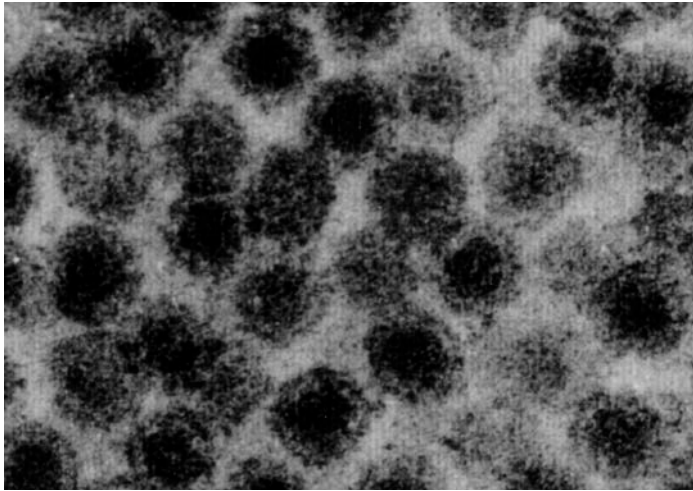
蚊媒介性フラビウイルス



(Fields Virology より改変)

デングウイルス

デングウイルス



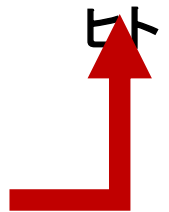
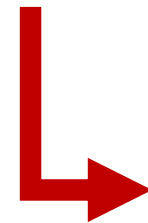
蚊細胞(C6/36細胞)で増殖した
デングウイルス

- フラビウイルス科フラビウイルス属
- エンベロープを被った直径約40-50nmの球状の一本鎖の(+)RNAウイルス
- 一本鎖RNA上には5' 非コード領域に続いてC蛋白質, prM蛋白質, E蛋白質の3種類の構造蛋白質とNS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5の7種類の非構造蛋白質および3' 非構造領域が存在
- 特にE蛋白質は宿主親和性, 細胞吸着等に関っており, DENVに対する防御免疫を誘導する主体となる蛋白質

デングウイルスの感染環



ヒト



ヒト

ヒトスジシマカ (*Ae. albopictus*)

ネッタイシマカ (*Ae. aegypti*)

デング熱の病態

- DENVには4つの異なる型のウイルスが存在するが、DENVの初感染（primary infection）により産生される抗体はDENV型間において交差反応性をもつ
- 同じ型のウイルスに対しては終生免疫が成立するため再感染しない
- 他の型のDENVに対する交差防御免疫は短期間で消失するためその後、他の型のDENVに感染・発症しうる（二次感染：secondary infection）
- 初感染時に誘導された中和能を有しないDENV型交差抗体が再感染時にDENVとの免疫複合体を形成し、単球・マクロファージ等のFcγ受容体(FcγR)を有する細胞に特異的に吸着、その感染を増強させる抗体依存性感染増強（ADE）が重症デング熱の一因として考えられている

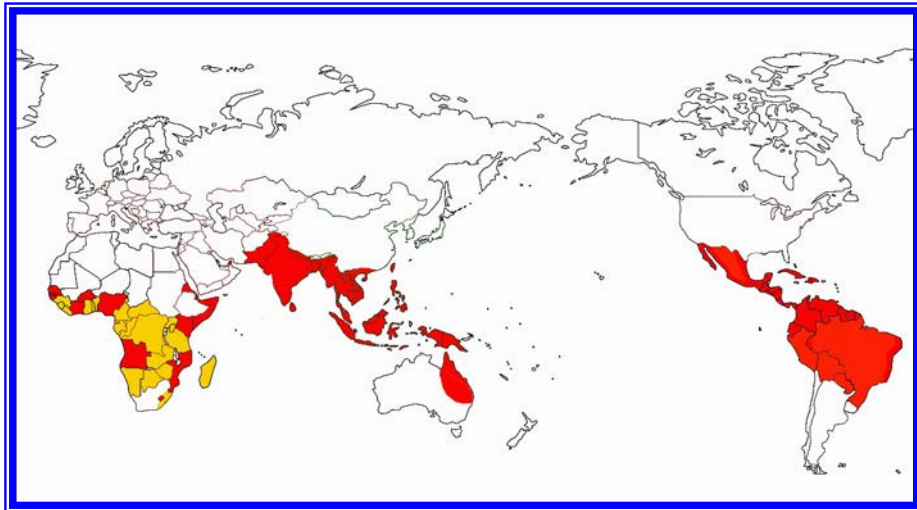
重症デング熱

- 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



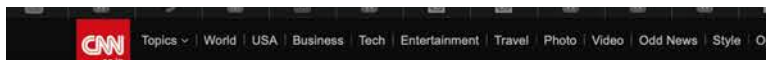
2005年東チモールにおけるデング熱流行時の重症デング熱2歳児患者
死亡率8.4% (22/336)

デング熱の流行



- デング熱(DF)は東南アジア, 南アジア, 中南米, カリブ海諸国において患者の報告が多く, 世界の熱帯・亜熱帯の100カ国以上の国と地域において流行
- 年間3億9千万人がDENVに感染し, 9千6百万人が発症, そのうち2万4千人が死亡
- DFの報告数は年々増加傾向にあり, 世界におけるDF症例数は2008年には120万例, 2010年には220万例, 2016年には334万例を超えた
- 2019年は南北アメリカ地域で313万9千例(うち重症デング熱28,169人, 死者1,538人)、フィリピンで42万人, マレーシアで12万人, ベトナムで32万人, そしてシンガポールにおいて約1万5千人の患者が報告

2023年のブラジルにおけるデング熱の流行状況



World

リオデジャネイロ、デング熱で緊急事態宣言 カーニバル控え感染者急増 ブラジル

© 2024.02.08 Thu posted at 12:00 JST

ポスト ブックマーク

PR

AMEXの法人カードで企業のキャッシュフローを可視化
旅に出たい！ CNNが海外の隠れたスポットなど紹介
CNN.co.jpメルマガ購読者募集中！



デング熱の救急医療施設で患者の治療に当たる看護師=6日、ブラジル・リオデジャネイロ/Pilar Olivares/Reuters

(CNN) リオのカーニバルに向けてお祭りムードが高まるブラジルのリオデジャネイロで蚊が媒介する感染症のデング熱が流行し、エドゥアルド・パエス市長が公衆衛生上の緊急事態を宣言した。CNN提携局のCNNブラジルが伝えた。

リオのカーニバルは数百万人が詰めかけてパレードやパーティーに熱狂する。カーニバルの連休は9日から始まり、14日まで続く。

米疾病対策センター（CDC）によると、デング熱は主にネッタイシマカを通じて感染する。世界では年間最大4億人が感染しており、蚊がウイルスを媒介する疾患の中では最も多い。

CNNブラジルによると、緊急事態宣言は5日に出された。

リオデジャネイロ市でデング熱のために入院した患者は、1月だけで362人に上り、2008年の記

ブラジル・リオデジャネイロでデング熱が流行し、エドゥアルド・パエス市長が公衆衛生上の緊急事態を宣言（2024年2月8日CNN）

2024年第5週まで
ブラジル全土のデング熱患者数
345,235名（死者31名）
リオデジャネイロのデング熱患者数
11,202名

CNNホームページより

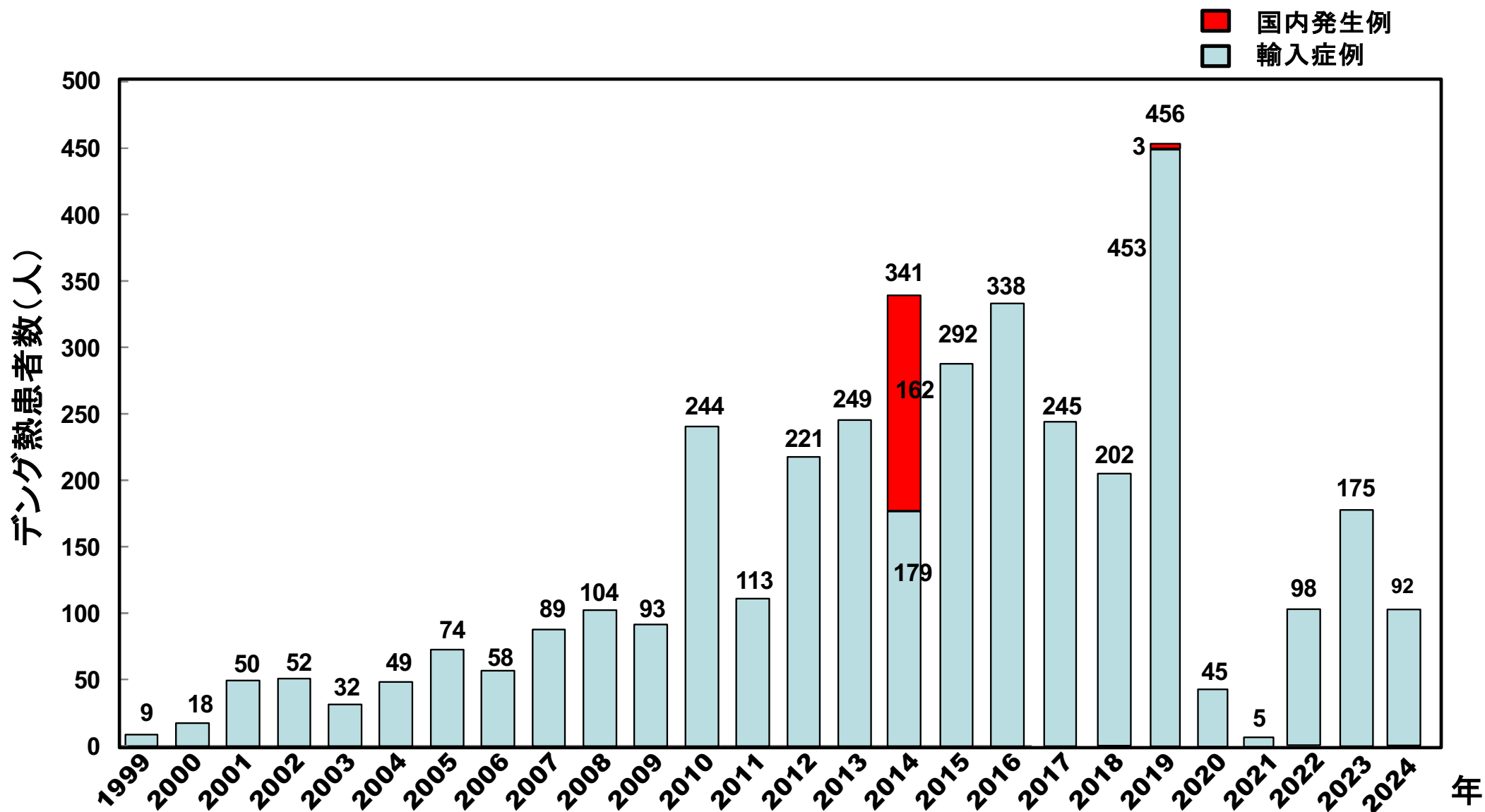
2023年の東南アジアにおけるデング熱の流行状況

- ベトナム 166,619人(死者42名)
- フィリピン 195,603人(死者657名)
- マレーシア 120,418人(死者96名)
- シンガポール 9,663人
- ラオス 31,997人(死者20名)
- カンボジア 31,567人(死者39名)
- タイ 158,705人(死者181名)

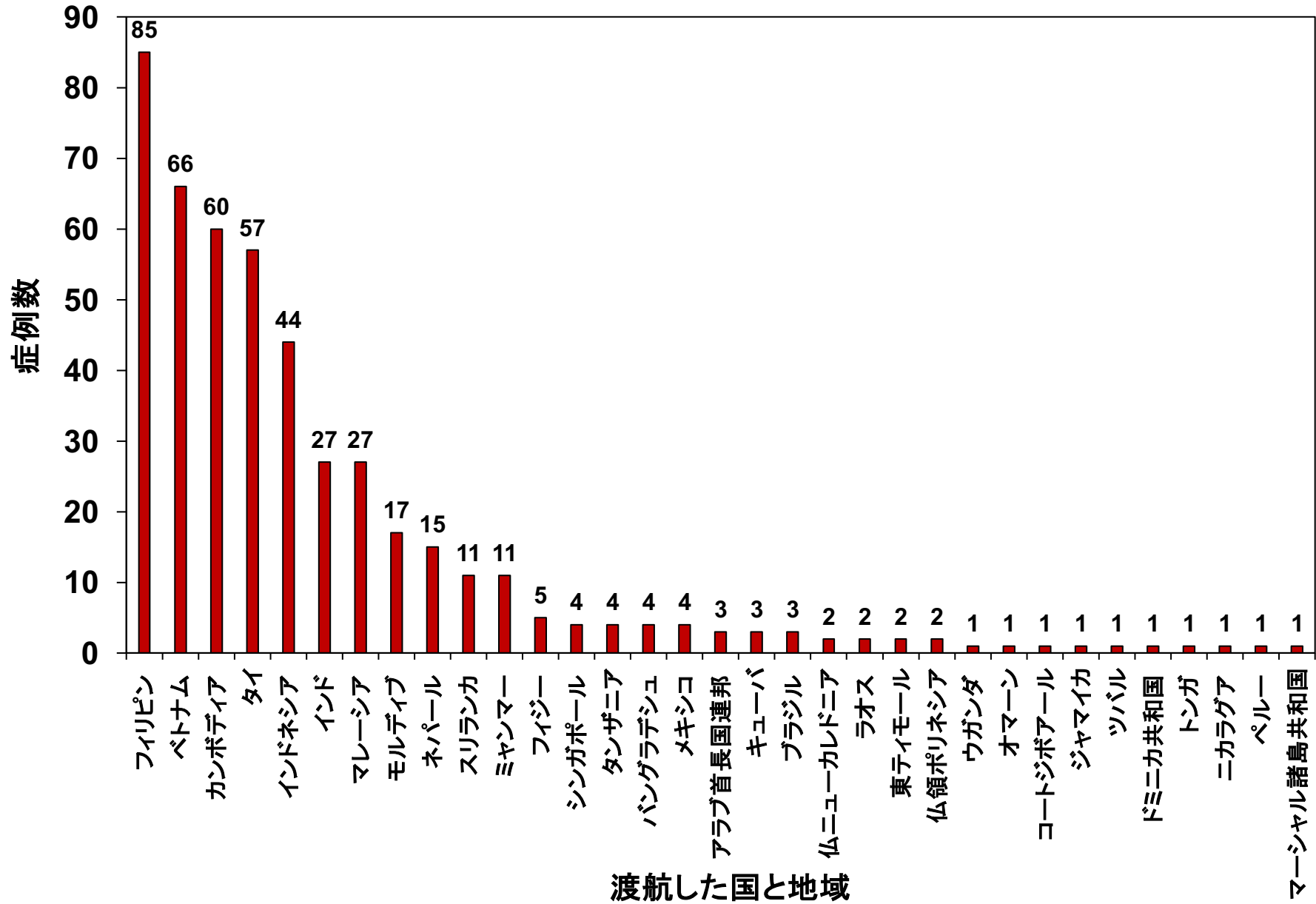
2010年から現在までのヨーロッパにおけるデング熱国内発生

年	国と地域	患者数	発生日
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

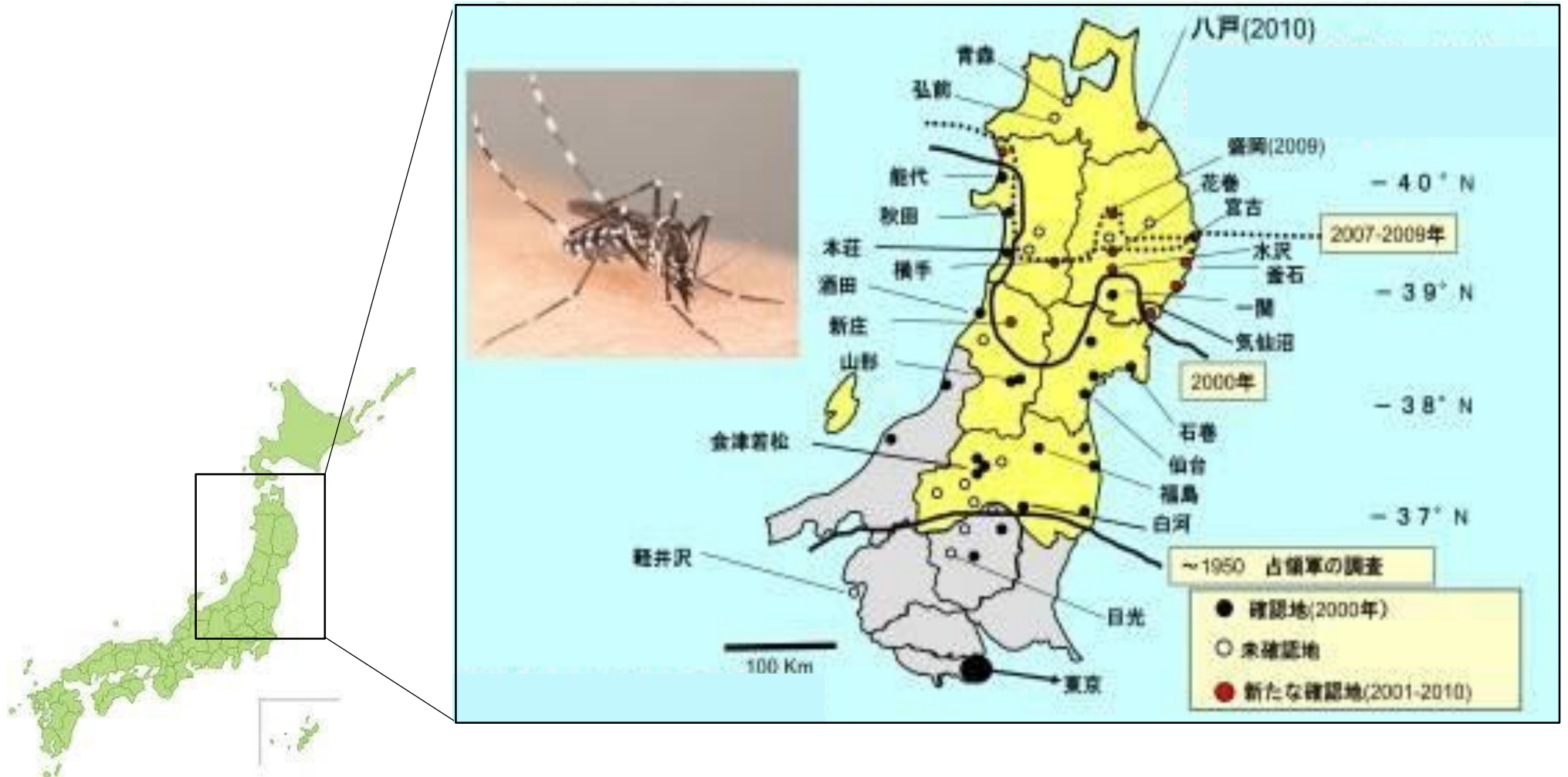
国内の1999年4月-2024年第25週におけるデング熱症例の推移



2019年における渡航先別デング熱輸入症例数



国内におけるヒトスジシマカの分布域の拡大



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
- 2023-2024年のシーズンではブラジルにおいて大きな流行が発生した
- 2023年には東南アジアにおいてもデング熱の流行が認められた
- ヨーロッパではデング熱の国内発生例が2012年以来散発している
- 海外との人的交流の再開によりデング熱の国内患者数は2019年以前の水準に増加傾向にある

日本脳炎ウイルス

日本脳炎の分布

- アジアの温帯地方、熱帯地方に広く分布している.
- 過去日本脳炎の報告がなかったパプアニューギニアにおいても、1997年に患者の報告がなされた.
- 1995年にオーストラリアのトレス海峡Badu島、1998年にBadu島・ヨーク岬半島にて日本脳炎患者の発生
- 2022年にオーストリア南部にて日本脳炎患者が報告
- WPRは2030年までに域内の15歳以下の子供の日本脳炎ワクチン接種率を95%に引き上げることを目標としている

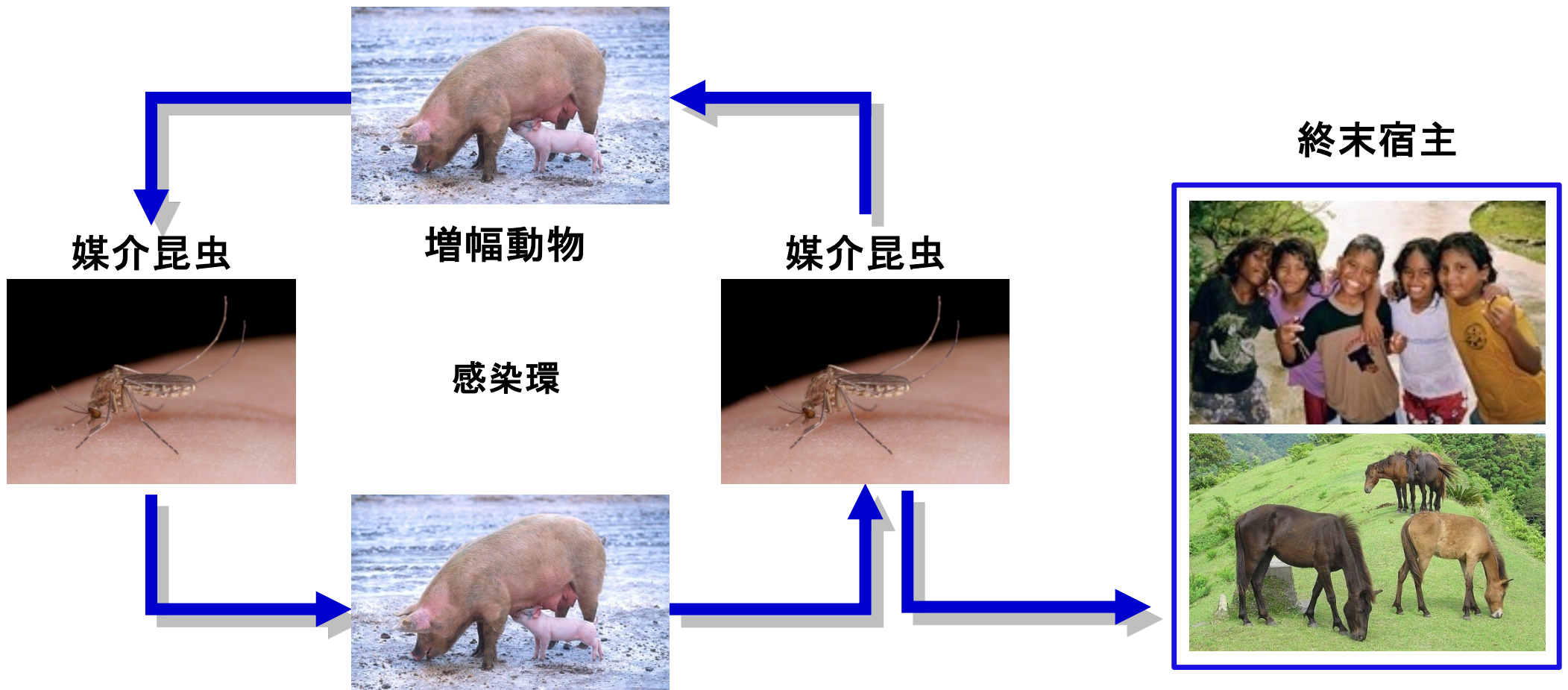


WHO西太平洋地域における日本脳炎患者数の推移

Country and Region	Surveillance program	Number of reported cases								
		2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	(year)
Australia	National	1	4	1	3	0	1	0	3	
Cambodia	sentinel (6)	55	41	60	48	10	5	11	1	
China	sentinel (27)	1763	2178	858	624	1130	1147	1800	369	
Japan	National	2	9	2	2	11	3	0	10	
Lao	sentinel (3)	23	9	4	13	19	9	11	96	
Malaysia	National	22	12	47	36	59	20	28	48	
Papua New Guinea	sentinel (1)	0	0	1	4	0	1	0	0	
The Philippines	sentinel (9)	24	25	69	115	312	361	204	143	
Korea R.	National	20	14	26	40	28	9	-	34	
Singapore	National	0	0	0	-	-	0	0	-	
Viet Num	sentinel (9)	183	224	421	368	357	200	313	196	

WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system

日本脳炎ウイルスの生態



- 日本やタイではコガタアカイエカとブタの間で日本脳炎ウイルスの感染環が形成されている
- 日本脳炎ウイルスは、おもにブタの体内で大量に増えて、その血を吸った蚊が感染し、ウイルスを排出する
- ヒトは日本脳炎ウイルスに感染したコガタアカイエカに吸血されることで感染する
- ヒトで血中に検出されるウイルスは一過性であり、量的にも極めて少なく、ヒトからヒトへの感染はない

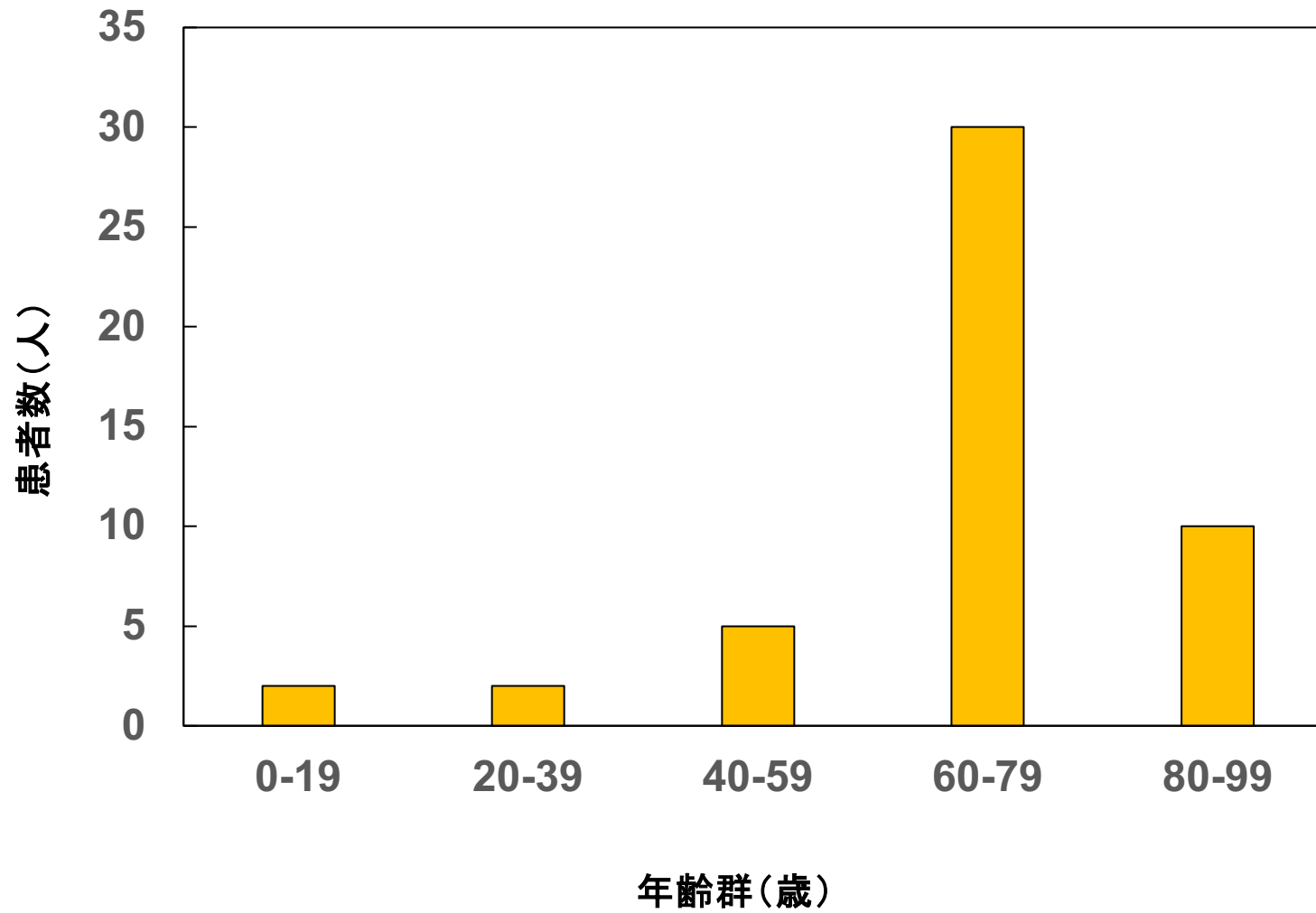
Human Japanese encephalitis cases in Japan, 1991-2022

year	total	under 14	under 7	year	total	under 14	under 7
1991	14	1	0	2007	9	0	0
1992	4	0	0	2008	3	0	0
1993	8	0	0	2009	3	2	2
1994	4	0	0	2010	4	1	1
1995	2	1	1	2011	9	2	1
1996	4	0	0	2012	2	0	0
1997	4	0	0	2013	9	0	0
1998	2	0	0	2014	2	1	1
1999	5	0	0	2015	2	1	1
2000	7	0	0	2016	11	0	0
2001	5	1	0	2017	3	0	0
2002	8	0	0	2018	0	0	0
2003	2	1	0	2019	10	0	0
2004	4	0	0	2020	5	0	0
2005	7	0	0	2021	3	0	0
2006	8	1	1	2022	4	0	0
				2023	7	0	0

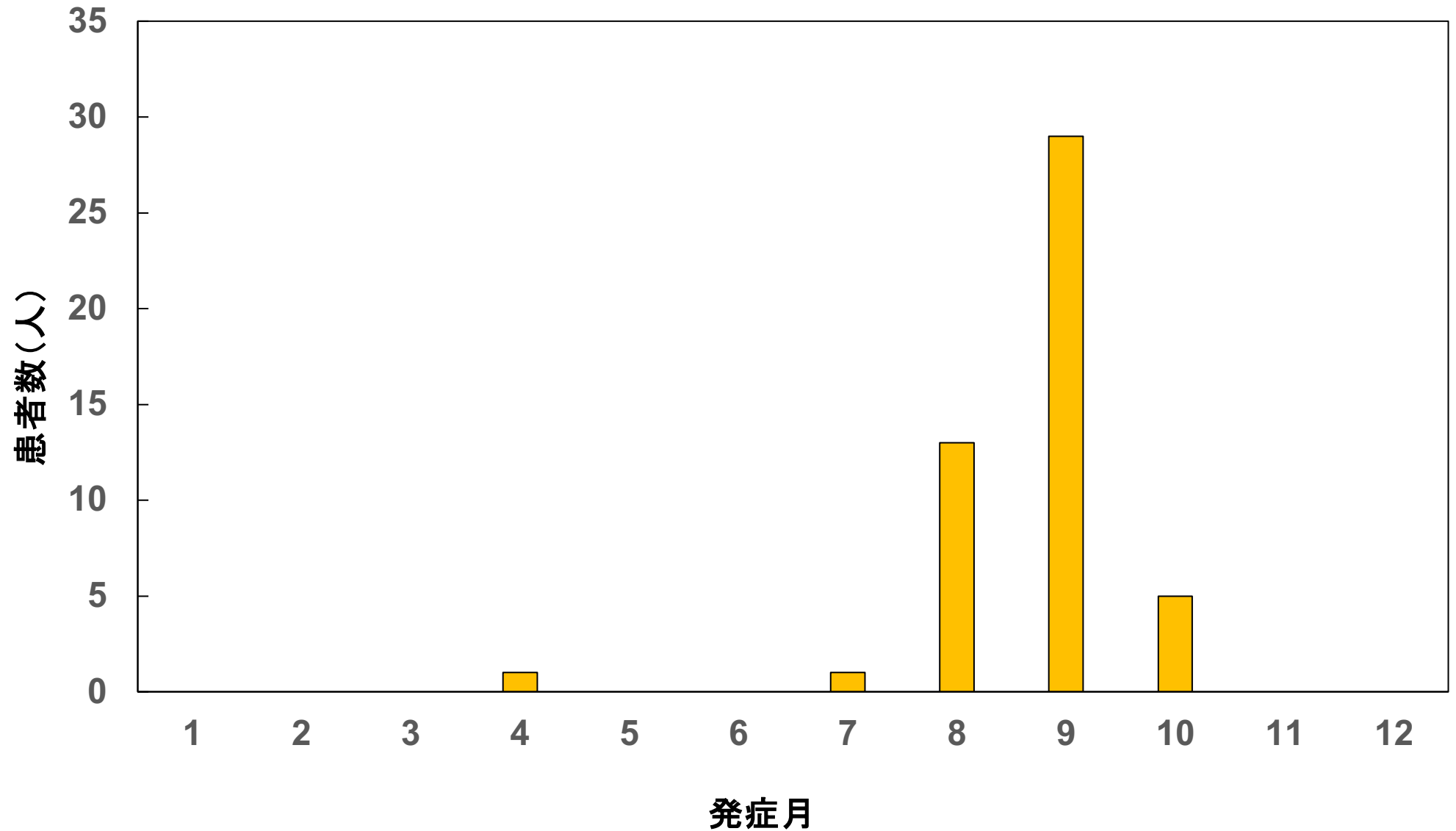
2023年日本脳炎発生状況

発生県	性別	年齢	発症年月
茨城県	男	54	2023/08/09
茨城県	男	65	2023/09/15
静岡県	男	72	2023/08/28
熊本県	男	79	2023/09/04
大阪府	男	82	2023/10/11
熊本県	男	69	2023/10/23
千葉県	男	85	2023/10/10

2013-2022年における日本脳炎患者の年齢分布

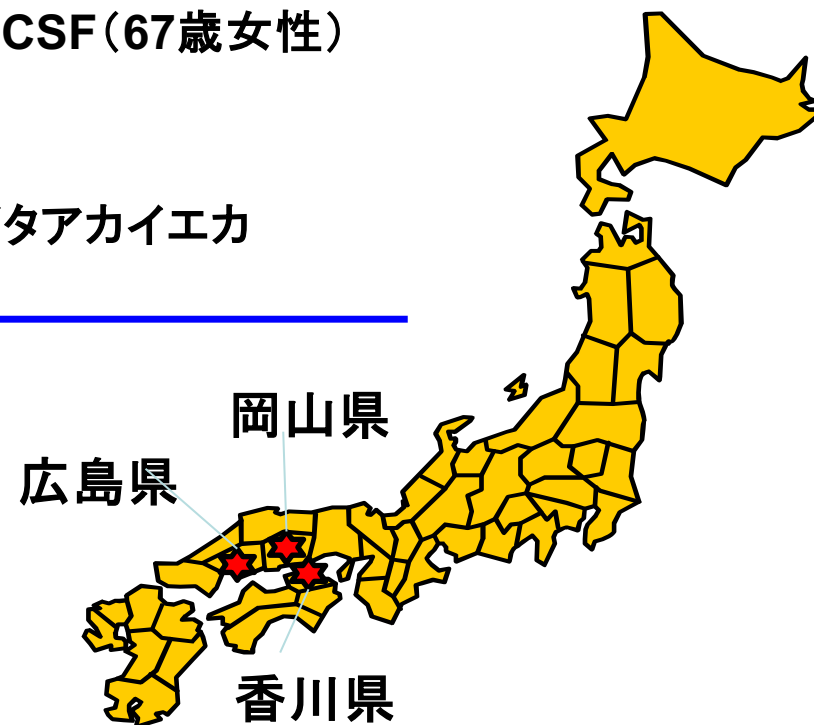


2013-2022年における日本脳炎患者の発症月



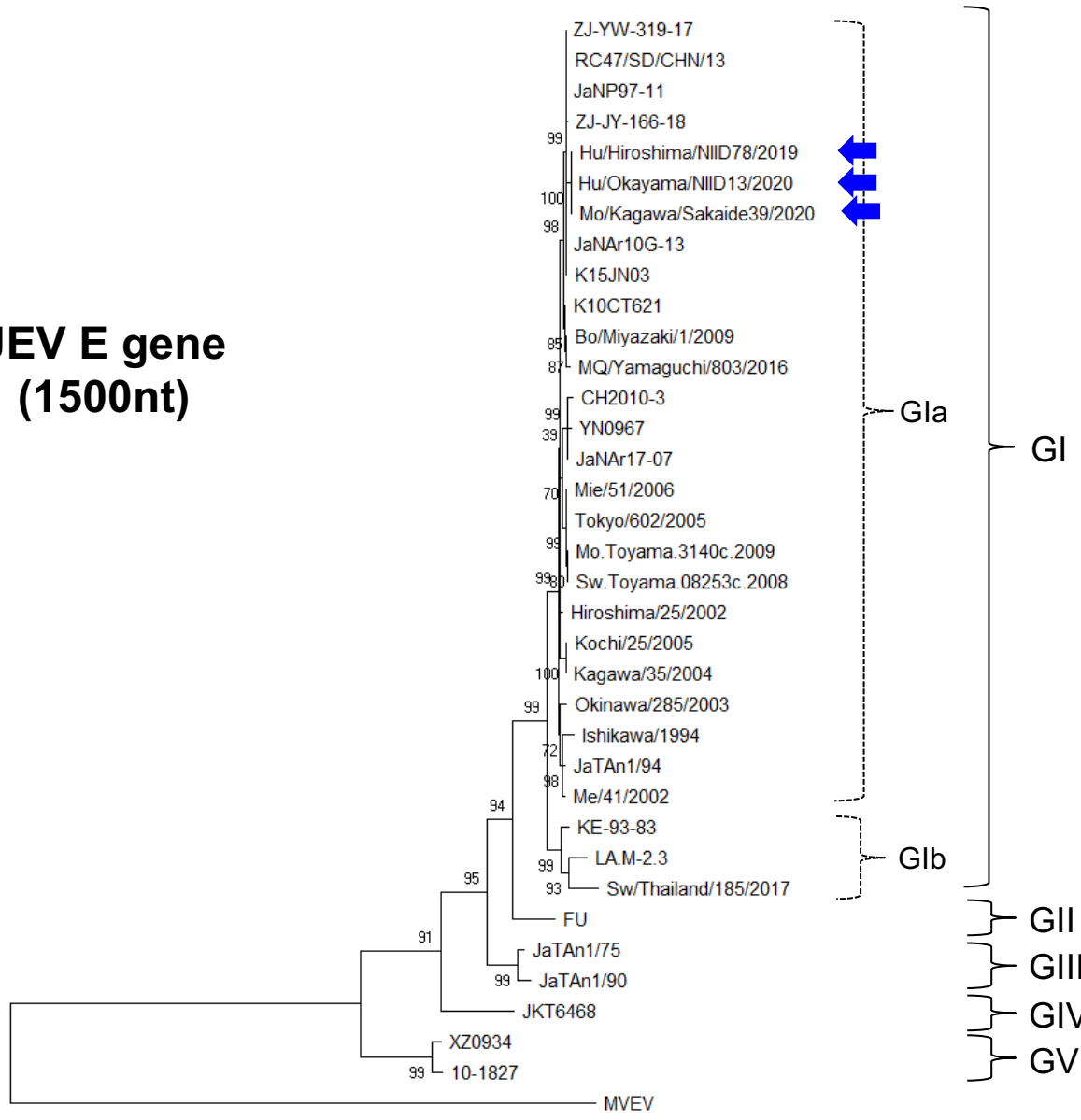
近年の日本脳炎国内流行株の遺伝子解析

株名	地域	年	検体
JEV/Hu/Hiroshima/ NIID78/2019 (NIID19-78)	広島県	2019	ヒト CSF (71歳男性)
JEV/Hu/Okayama/ NIID13/2020 (NIID20-13)	岡山県	2020	ヒト CSF (67歳女性)
Sakaide-39-2020-07 (NIID20-09)	香川県	2020	コガタアカイエカ



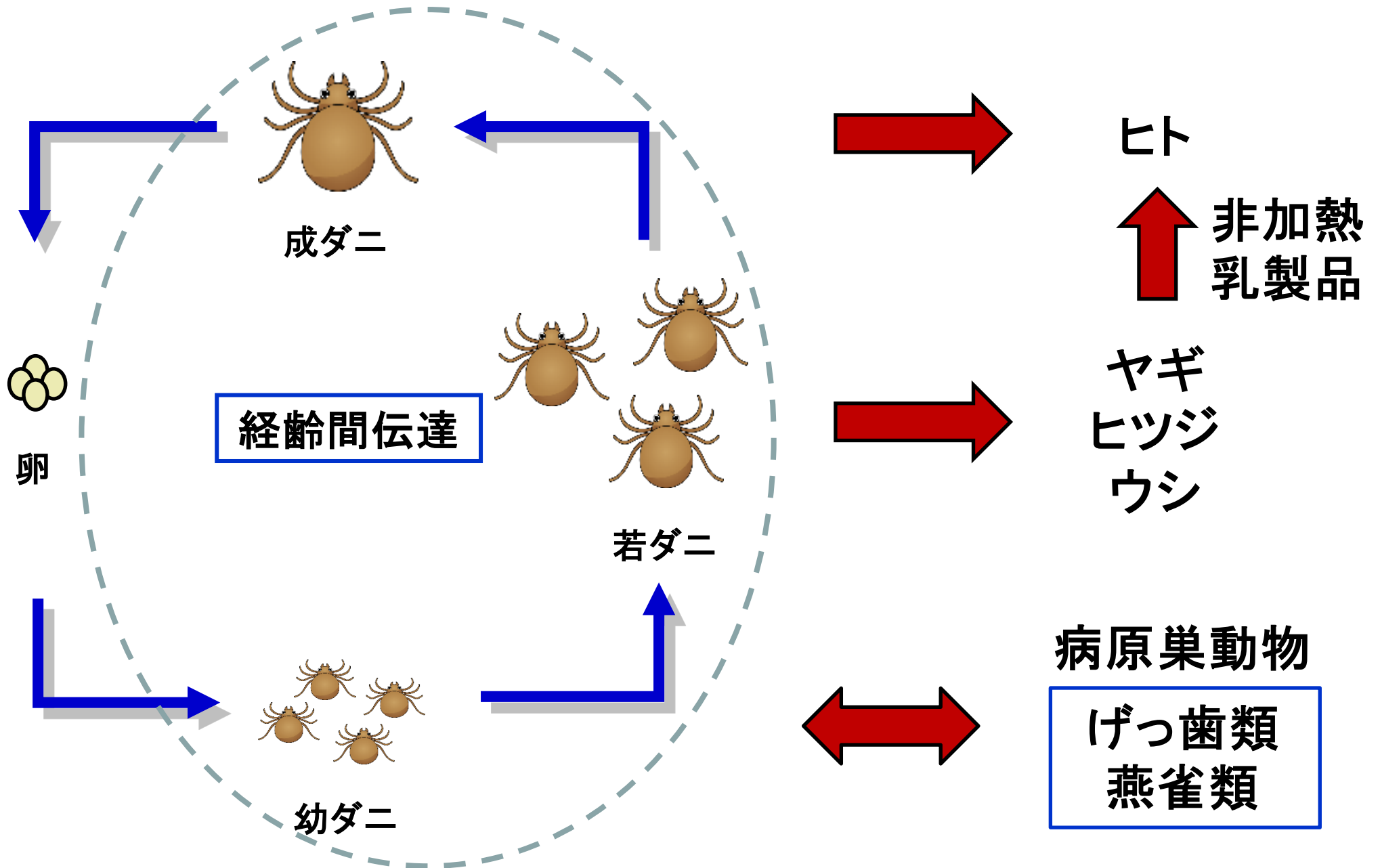
近年の日本脳炎国内流行株の遺伝子解析

JEV E gene
(1500nt)



ダニ媒介脳炎

ダニ媒介脳炎ウイルスの生態



貯 法：2～8℃で保存

有効期間：2.5年

ウイルスワクチン類

生物学的製剤基準

組織培養不活化ダニ媒介性脳炎ワクチン

生物由来製品、劇薬、処方箋医薬品^{注)}

タイコバック[®]

小児用水性懸濁筋注 0.25mL

TICOVAC[®] Junior suspension liquid for intramuscular injection 0.25mL

承認番号	30600AMX00125
販売開始	—

注) 注意-医師等の処方箋により使用すること

2. 接種不相当者（予防接種を受けることが適当でない者）

- 2.1 明らかな発熱を呈している者
- 2.2 重篤な急性疾患にかかっていることが明らかな者
- 2.3 本剤の成分に対し重度の過敏症の既往歴のある者
- 2.4 上記に掲げる者のほか、予防接種を行うことが不適当な状態にある者

3. 製法の概要及び組成・性状

3.1 製法の概要

本剤は、ダニ媒介性脳炎ウイルスをSPF発育鶏卵から採取したニワトリ胚初代培養細胞で増殖させ、得られたウイルスをホルムアルデヒドで不活化した後、精製し、安定剤及びアジュバント（水酸化アルミニウム懸濁液）を加えたものである。

なお、本剤は製造工程でブタ由来成分（トリプシン）、ニワトリの発育鶏卵及び人血液由来成分（人血清アルブミン）を使用している。

7.6 初回免疫完了前にダニ媒介性脳炎ウイルスに感染するリスクがある場合（ダニ媒介性脳炎流行時期における流行地域への渡航等）は、その前に本剤を2回接種すること。

8. 重要な基本的注意

- 8.1 本剤は「予防接種実施規則」及び「定期接種実施要領」に準拠して使用すること。
- 8.2 被接種者について、接種前に必ず問診、検温及び診察によって健康状態を調べること。[9.1参照]
- 8.3 被接種者又はその保護者に、接種当日は過激な運動は避け、接種部位を清潔に保ち、また、接種後の健康監視に留意し、局所の異常反応や体調の変化、さらに高熱、痙攣等の異常な症状を呈した場合には速やかに医師の診察を受けるよう事前に知らせること。
- 8.4 ショック、アナフィラキシーがあらわれることがあるため、接種前に過敏症の既往歴等に関する問診を十分に行うとともに、ショック アナフィラキシーに対する緊急処置ができるよう 適切な監相

ContAmplicon挿入陽性コントロール、プローブの配布について

- 4種類のデングウイルス各血清型 (D1+CA, D2+CA, D3+CA, D4+CA) の陽性コントロール (10^9 コピー /uLに調製した RNA液各 100uL) を配布した
- ContAmplicon Probe_DCZ (10uM, 10pmol/uL) 100uLも同時に配布した
- これにより汚染確認とコピー数の算出が可能である
- 陽性コントロールの希釈液 (10ug/mL yeast tRNA溶液 (Thermo #AM7119)も同時に配布した

まとめ

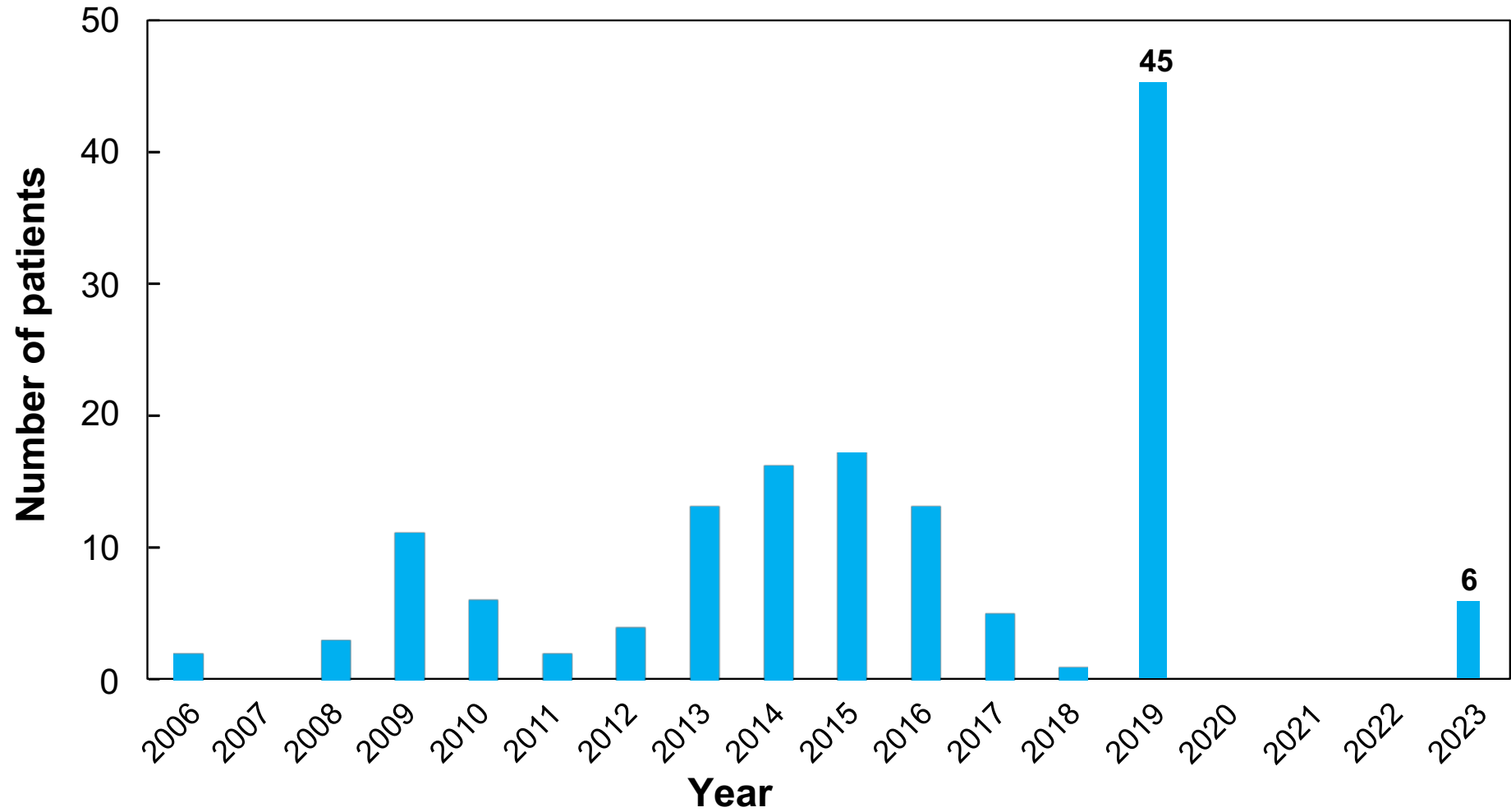
- 各地衛研の希望により、遺伝子検査用陽性対照を分与した
- 遺伝子検査用陽性対照の見直しを行い、各アルボウイルスレファレンスセンターに新たに作製したデングウイルス1型～4型のContAmplicon挿入陽性コントロールおよびプローブを配布した結果、検体中の遺伝子コピー数の測定が可能となり、また汚染対策も強化された
- 今後はアルボウイルスレファレンスセンターにおける汚染コントロール配列を挿入した陽性対照の検討を経て、各地衛研への陽性対照の配布を実施する
- また今後は他のアルボウイルスについても汚染コントロール配列を挿入した陽性対照を作製し、地衛研への配布を行う

オロプーシェ熱

- ブニヤウイルス目ペリブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属シンプ血清型群に分類される
- 中南米で蔓延している熱性疾患
- オロプーシェウイルス(Oropouche virus) に感染することにより発症
- 媒介昆虫はヌカカ (*Culicoides paraensis*)
- ネットアイエカ (*Culex quinquefasciatus*) から分離
- ナマケモノ亜目、マーモセット等の霊長目、齧歯目 の哺乳類や鳥類からオロプーシェウイルスが検出
- 1955年にトリニダード・トバゴの発熱患者から分離・同定
- 中南米全域でこれまでに50万人以上がオロプーシェウイルスに感染したと推定
- ブラジル、エクアドル、パナマ、ペルー、トリニダード・トバゴ、コロンビア、アルゼンチン、ボリビア、ベネズエラ、フランス領ギアナ、ハイチ、キューバ において農村部や森林地帯を中心に患者が報告
- 2024年にイタリアおよびスペインにおいてキューバからの輸入症例が報告された

チクングニア熱

The chikungunya fever cases in Japan, 2006-Oct. 2023



まとめ

- 現在もチクングニアの流行は拡大しており、2013年末にはその流行は西半球に及んだ。
- 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。
- チクングニア熱の輸入症例は2019年には45例報告された
- 2020年～2022年において輸入症例は認められなかったが、2023年には6例の輸入症例が報告された

キャサヌル森林病ウイルスおよびオムスク出血熱ウイルスの ゲノム検出法(ウイルス遺伝子検査法)の整備

DENV-CHIKV-ZIKV TaqMan real-time RT-PCR用
陽性コントロールについて(おさらいと変更点)

国立感染症研究所・ウイルス第一部

アルボウイルスセンター会議

2024年7月10日

キャサヌル森林病(三種):

Kyasanur forest disease virus (KFDV) が原因ウイルス (BSL3)。

南アジア(インド)を中心に蔓延。自然界ではマダニとげっ歯類の間で感染環が維持。ヒトが感染した場合、潜伏期間は3~12日。症状は発熱、頭痛、筋肉痛、消化器症状、出血。約40%に出血性肺水腫がみられ、ときに腎不全も生じる。患者の15~50%は1~3週間寛解後再度発熱を呈し、髄膜炎や脳炎発症する。致死率は3~5%であり、後遺症を残すことはない。

オムスク出血熱ウイルス(三種):

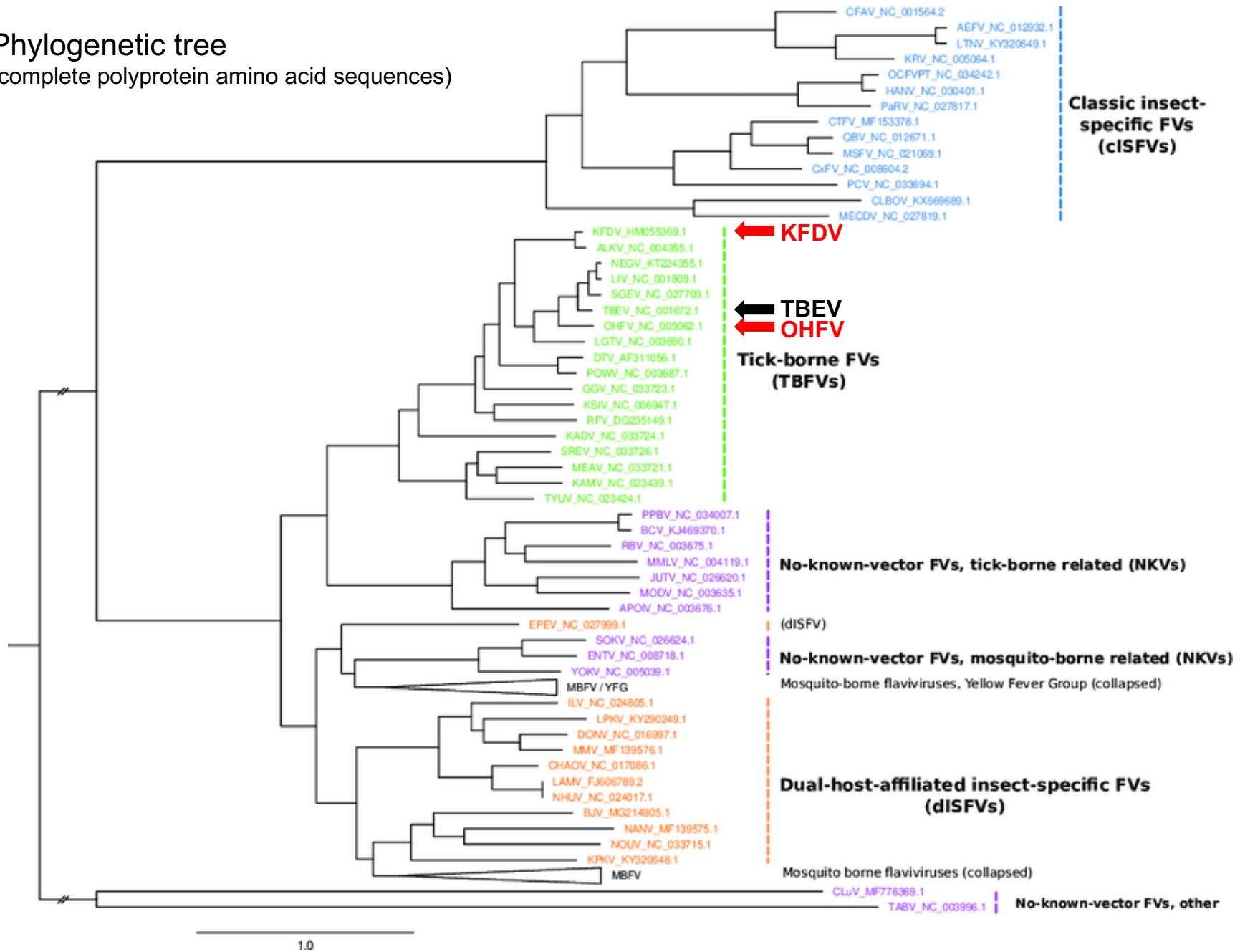
Omsk Hemorrhagic fever virus (OHFV)が原因ウイルス (BSL3)。

西シベリアを中心に蔓延。自然界ではマダニとげっ歯類の間で感染環が維持。ヒトが感染した場合、潜伏期間は3~9日。症状は発熱、頭痛、筋肉痛等、まれに出血熱となる。患者の30~50%は二相性の発熱を呈し、後期には髄膜炎や腎機能障害等がみられる。致死率は0.5~3%。神経精神障害などの後遺症を残すことがある。

(厚生労働省ホームページを改変)

ともに、**ダニ媒介性フラビウイルス**感染症である。

Phylogenetic tree
(complete polyprotein amino acid sequences)



TaqMan primers and probe

Kyasanur Forest Diseases Virus

Name	Sequence	Region in MG720077	Ref.
KFDNS 5F	TGG AAG CCT GGC TGA AAG AG	9573-9592	
KFDNS 5R	TCA TCC CCA CTG ACC AGC AT	9636-9617	Journal of Virological Methods 186 (2012) 49– 54
KFDNS 5P	FAM-ATG GAG AGG AGC GCC TGA CCC G-BHQ	9594-9615	

Omsk hemorrhagic fever virus

Name	Sequence	Region in MT354629	Ref.
OHF-d1F	GGC ACA RAC CGT TGT TCT TGA GCT	1554-1577	
OHF-d2R	GCG TTC WGC ATT GTT CCA WCC CAC CAT	1692-1666	Viruses 2022, 14, 754.
OHF-d12Probe	HEX*-AGG TGT TCT GCT GTC TTG TCG AGC-BQH1	1598-1575	

*: 論文ではJOE。今回の合成ではHEX。QS5ではVIC指定。

Positive Control RNA合成用配列(300ヌクレオチド)

Name	Sequence	Region in MG720077
KFDV synRNA用	TCGGGAGGCTGCGTCATGGACATCATAACCAGAAGAGACCAACGTGGTTCAGGCCAGGTGGT GACCTACGCTCTAAACACCCTCACGAACATCAAGGTGCAGCTTATCCGCATGATGGAGGGAGA GGGCGTGATCGGGCCATCTGACTCACAGGACCCGCGACTCCTACGTGTGGAAGCCTGGCTGA AAGAGCATGGAGAGGAGCGCCTGACCCGCATGCTGGTTCAGTGGGGATGATTGCGTTGTGAGA CCAATTGACGACCGCTTCGGGAAGGCCCTCTACTTCCTAAATGACATGGCC	9401-9700 (NS5)

Name	Sequence	Region in MT354629
OHFV synRNA用	GGCGAATACGGAGACGTGTCGCTGATGTGCAGAGTCGCTAGTGGCGTCGATCTGGCACAAC CGTTGTTCTTGAGCTCGACAAGACAGCAGAACACCTCCCCACGGCATGGCAGGTTACAGAGA TTGGTTTAACGATCTAGCTCTGCCTTGGAACATGAGGGAATGGTGGGTTGGAACAATGCTGAA CGCCTGGTTGAGTTTGGAGTTCCTCACGCCGTGAAGATGGATGTTTACAACCTTGGGGACCG ACTGGGGTGCTATTAATACTACTCGCCGGAGCCCCACTGGCGCACATC	1501-1800 (E)

* In vitro transcription により、1本鎖RNAを合成し、陽性コントロールとして使用した。

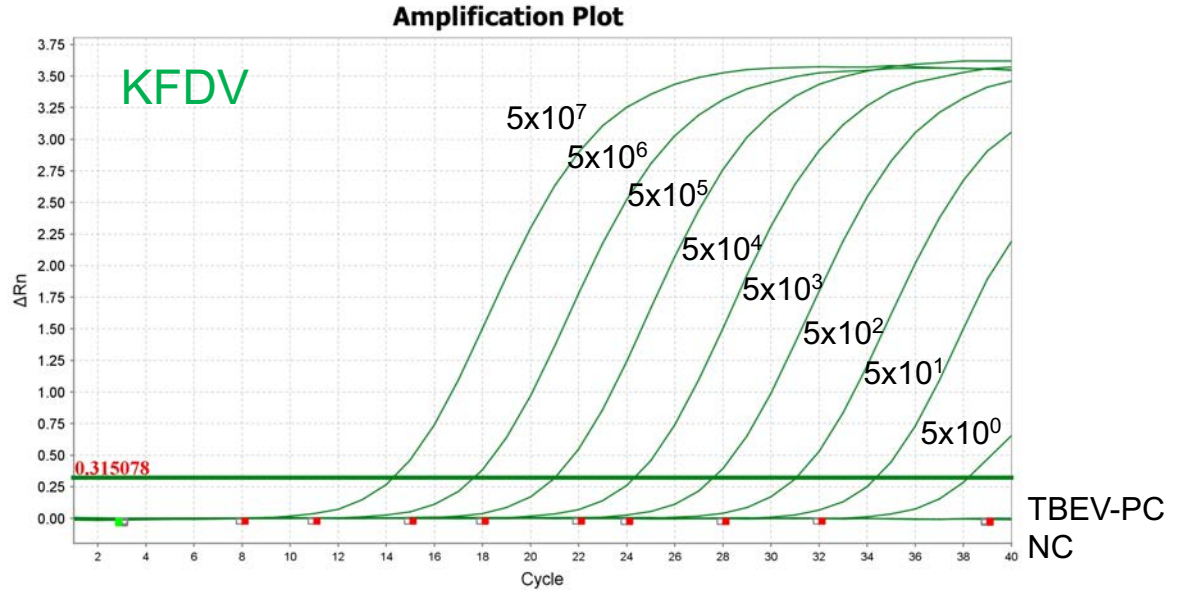
Realtime PCR

Reagent	Volume (uL)
DW	7.6
4xFast Virus M	5
Primer F (10uM)	1
Primer R (10uM)	1
Probe (10uM)	0.4
RNA soln	5

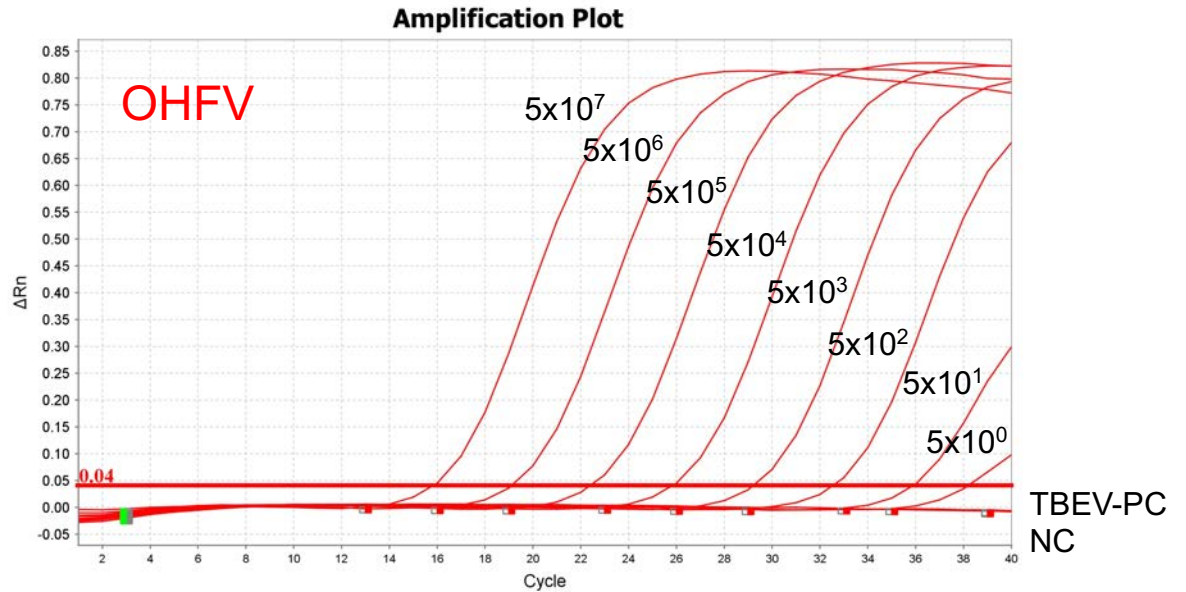


	48C	5 min
	95C	20 sec
40 cycles	95C	3 sec
	57C	30 sec

QS5, Fast, 40 min



■ KFDV



■ OHFV

キャサヌル森林病ウイルスおよびオムスク出血熱ウイルスの
ゲノム検出法(ウイルス遺伝子検査法)の整備

DENV-CHIKV-ZIKV TaqMan real-time RT-PCR用
陽性コントロールについて(おさらいと変更点)

国立感染症研究所・ウイルス第一部
田島茂

アルボウイルスセンター会議
2023年12月6日

DCZ Primer-Probe sequence (2022.7)

	Primer	Sequence	Probe	Sequence
D1	D1MGBEn469s	GAACATGGRACAAYTGCAACYAT	D1MGBEn493p	FAM-ACACCTCAAGCTCC-MGB
	D1MGBEn536r	CCGTAGTCDGTCAGCTGTATTTCA		
D2	D2MGBEn493s	ACACCACAGAGTTCCATCACAGA	D2MGBEn545p	FAM-CGATGGARTGCTCTC-MGB
	D2MGBEn568r	CATCTCATTGAAGTCNAGGCC		
D3*	D3MGBEn1s.v2	ATGAGATGYGTGGGAGTRGGAAA	D3MGBEn27p	FAM-AGATTTTGTGGAAGGYCT-MGB
	D3MGBEn71r	CACCACDTCAACCCACGTAGCT		
D4	D4TEEn711s	GGTGACRTTYAARGTHCCTCAT	D4TEEn734p	FAM-CCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTRG GATC-TAMRA
	D4TEEn786c	WGARTGCATRGCTCCYTCCTG		
CHIKV	Taq-Chik607F	GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT	Taq-Chik638P	FAM- TACCAGCCTGCACYC-MGB
	Taq-Chik672R	GCC CCC RAA GTC KGA GGA R		
ZIKV	ZIKV1086	CCGCTGCCCAACACAAG	ZIKV1107-FAM	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACAC TCAA-TAMRA
	ZIKV1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT		
CA			ContAmplicon	HEX(VIC)-AGTAGCTTGCTCTTTCATCTGTTACG- BHQ1(none)

ContAmplicon_DCZ Realtime RT-PCRの反応系

(FV1step DCZ-CA)

TaqMan mix prep.	Duplex(V-CA)		
	Volume (uL)	Mixture	
	x1	x10	
DW	7.2	72.0	
4x Master Mix (Thermo Fisher: Fast Virus 1-step kit)	5.0	50.0	
Primer FR mix [5pmol/uL each]*	2.0	20.0	
TaqMan probe Virus [10pmol/uL]	0.4	4.0	
TaqMan probe CA [10pmol/ul]	0.4	4.0	15uL
Sample RNA	5.0		
Total	20.0		

*10pmol/uLを1uLずつ加えるのと同義

	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	CHIKV
Primer F	D1MGBEn469s	D2MGBEn493s	D3MGBEn1s.v2	D4TEEn711s	Taq-Chik607F
Primer R	D1MGBEn536r	D2MGBEn568r	D3MGBEn71r	D4TEEn786c	Taq-Chik672R
Probe Virus	D1MGBEn493p	D2MGBEn545p	D3MGBEn27p	D4TEEn734p	Taq-Chik638P
Probe CA**	ContAmplicon	ContAmplicon	ContAmplicon	ContAmplicon	ContAmplicon

**CA: VIC-Noneまたは
Hex-BHQ1

Machine:
QuantStudio5

RT	48°C	5 min
Denature	95°C	20 sec
Amplify	95°C	3 sec
40cycle	57°C	30 sec

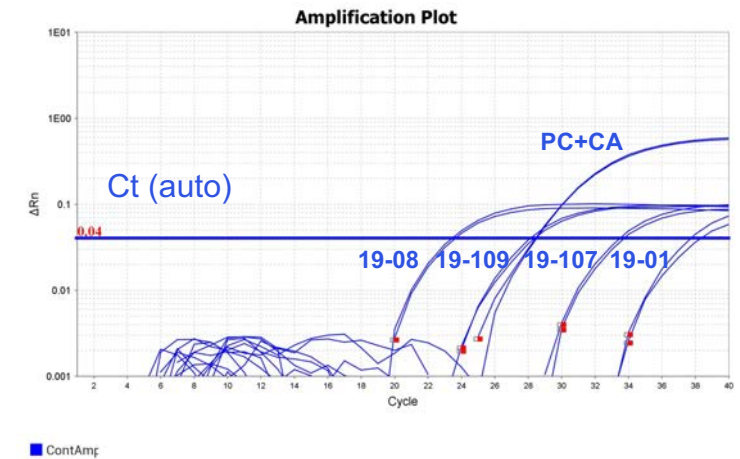
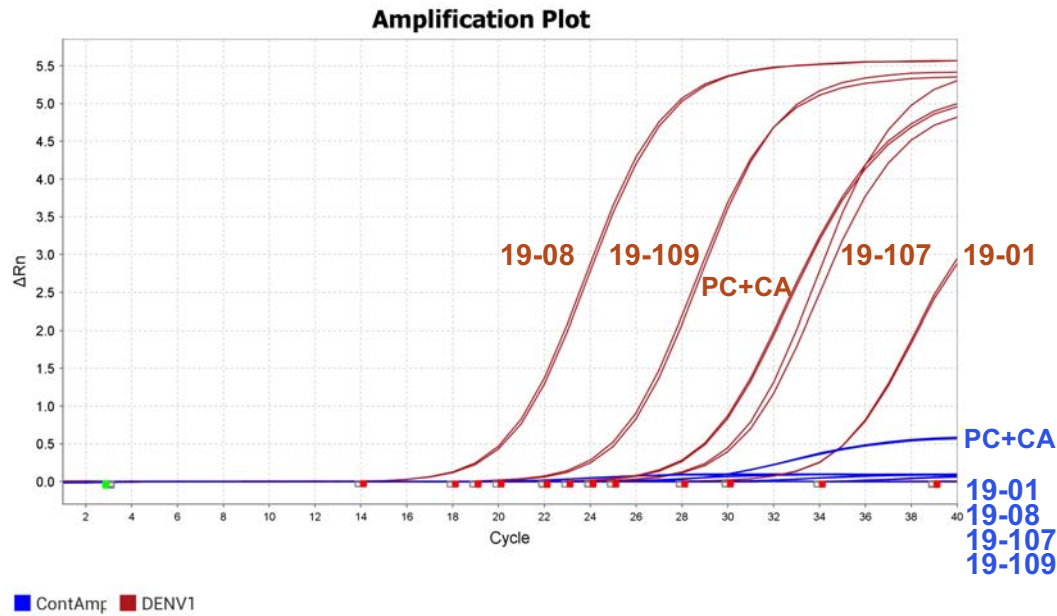
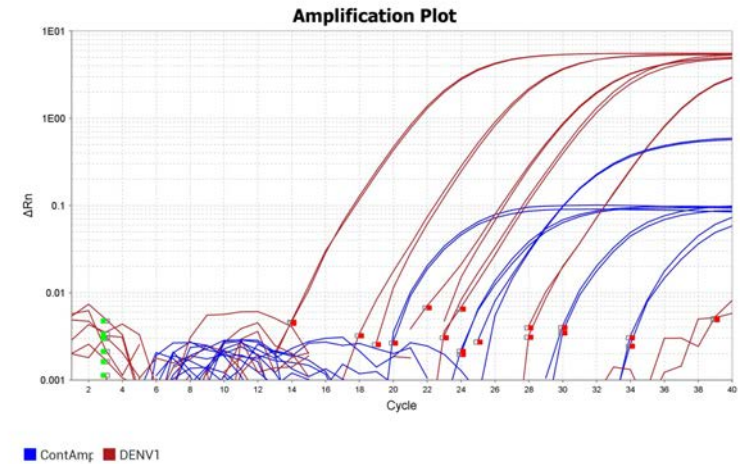
(fast)

臨床検体を使用した検討(DENV1-positive samples, duplicate)

Ct値*

Reaction mix	PC+CA	NC	19-01/1s	19-08/1s	19-107/1s	19-109/1s
D1	28.9	UD	35.0	20.1	30.2	24.9
D1-CA	28.4	UD	37.99	23.5	33.6	28.2

*auto, mean value



デングウイルス1型ゲノムと少し反応してしまうが、増幅パターンで判別可能。

ContAmplicon挿入陽性コントロール、プローブについて

- ✓ 今回は4種類のデングウイルス各血清型(D1+CA, D2+CA, D3+CA, D4+CA)の陽性コントロール(10⁹コピー/uLに調製したRNA液各100uL)を配布予定しています。
- ✓ プラスミドクローンより、in vitro transcription法により合成後、精製したRNAです。
- ✓ こちらを適当に希釈して使用してください(1点ならば、10³コピー/uLなど)。
- ✓ コピー数を算出したい場合は、適当に階段希釈して使用してください。
- ✓ 希釈には、10ug/mL yeast tRNA溶液 (Thermo #AM7119を希釈)を使用してください。
- ✓ 5uL程度を1反応に使用してください。
- ✓ 凍結融解は数回以内にしてください。希釈後(低濃度物)は特に注意してください。
- ✓ **ContAmplicon Probe DCZ(10uM, 10pmol/uL) 100uL**も一緒にお配りいたします。
- ✓ 今回配布予定のプローブはSigma-Aldrich (色素:HEX-BHQ1)で合成したのですが、ユーロフィン等(色素:VIC-none)で合成したものでも問題ありません(今回の検討ではVIC-noneを使っています)
- ✓ まずは各々使用している通常の反応系で試用してください。

(2021年度に配布済み)

JEV用リアルタイムプライマー・プローブセット(遺伝子型別)の改変

リアルタイムRT-PCR用プライマーによるJEVゲノムの増幅 (E region, TaqMan, automatic Ct)

GI, GIII common

Primers: JEen562s, JEen623c
Probe: JEen585pb (FAM-MGB)

GI specific

Primers: JE1&3en1052s-1082, JE1en1119c-1082
Probe: JE1en1082pb (FAM-MGB)

GIII specific

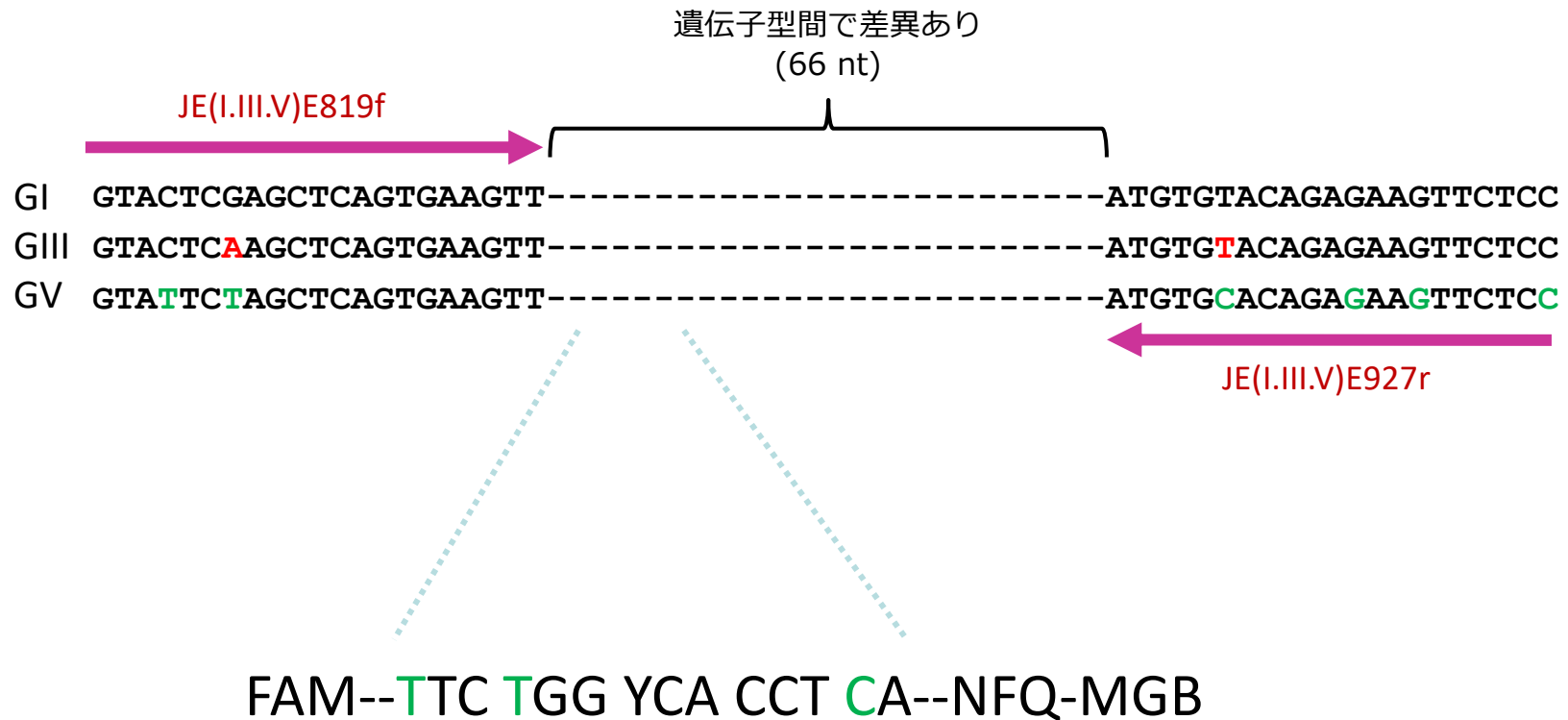
Primers: JE1&3en1052s-1082, JE3en1119c-1082
Probe: JE3en1082pb (FAM-MGB)

		Primer set		
		GI, GIII common*	GI specific	GIII specific
GI	Hiroshima/46/1998	14.5	23.2	ND
	Mie/41/2002	15.2	18.2	ND
	Mie/51/2005	17.1	28.0	ND
GIII	JaTH160	16.7	ND	18.5
	JaTAn1/75	14.2	ND	16.1
	JaTAn1/90	14.4	ND	19.0
GV (E)	Muar	ND	ND	ND
	rJEV-E ^{XZ0934} -M41	ND	ND	ND

*この増幅部位で、GVにも合わせることは配列的に困難 (6 x 10² – 4 x 10⁴ pfu/reaction)

GV JEV特異的TaqManプローブの設計

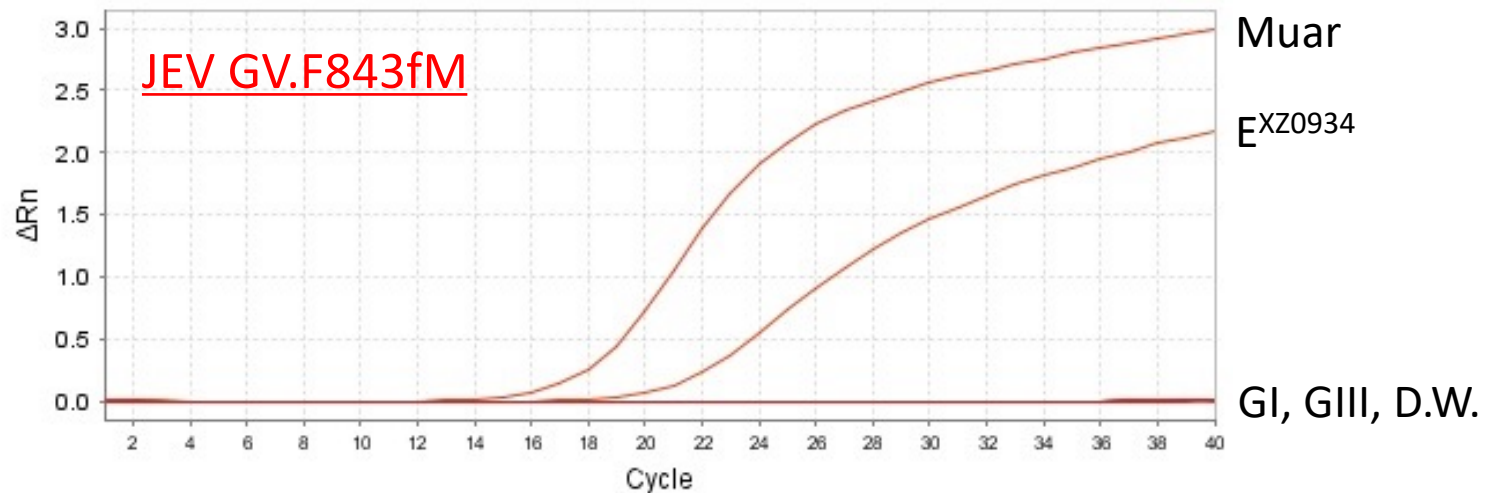
(新たな増幅部位を探索)



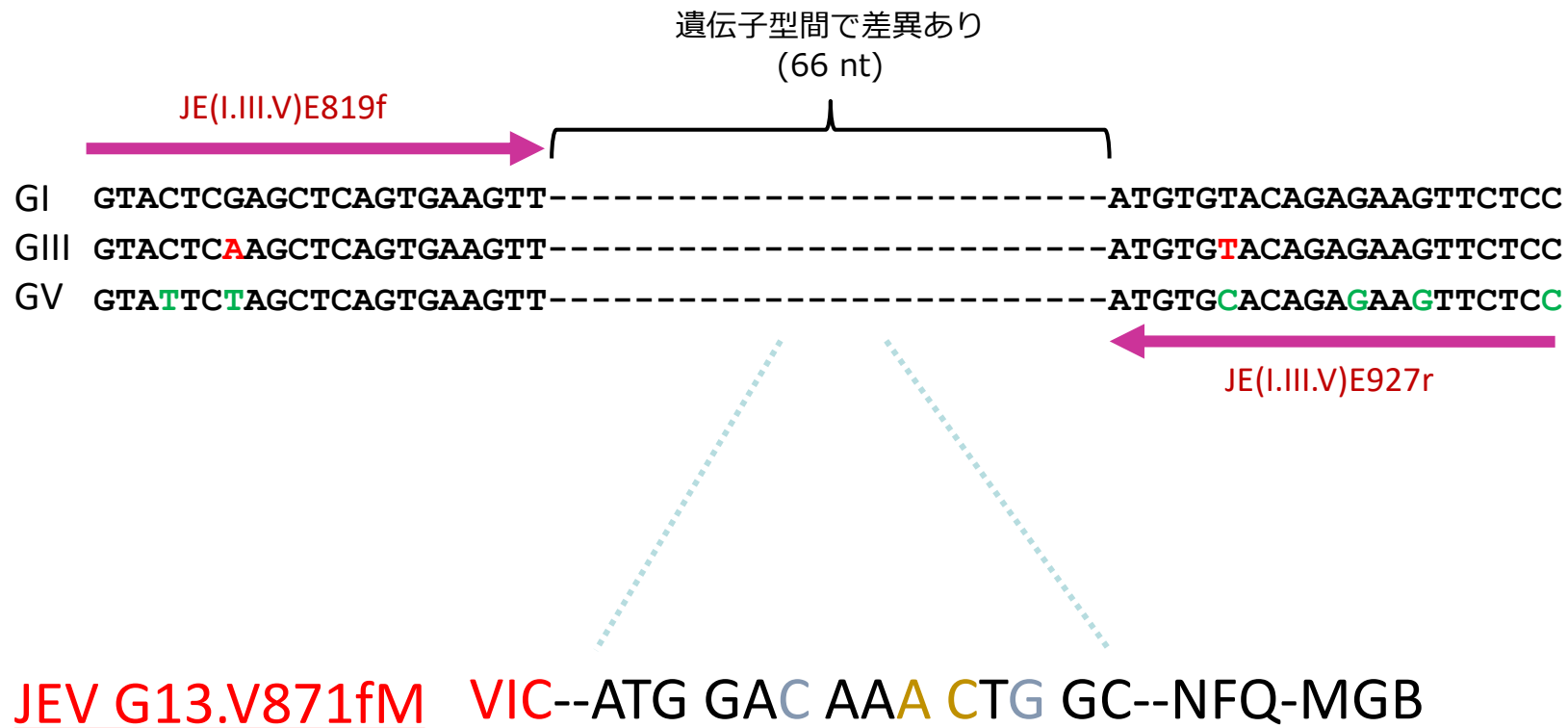
JEV GV.F843fM

GV JEV特異的TaqManプローブによるJEVゲノム検出

		Ct value
GI	Hiroshima/46/1998	ND
	Mie/41/2002	ND
	Mie/51/2005	ND
GIII	JaTH160	ND
	JaTAn1/75	ND
	JaTAn1/90	ND
GV (E)	Muar	17.8
	rJEV-EXZ0934-M41	22.0



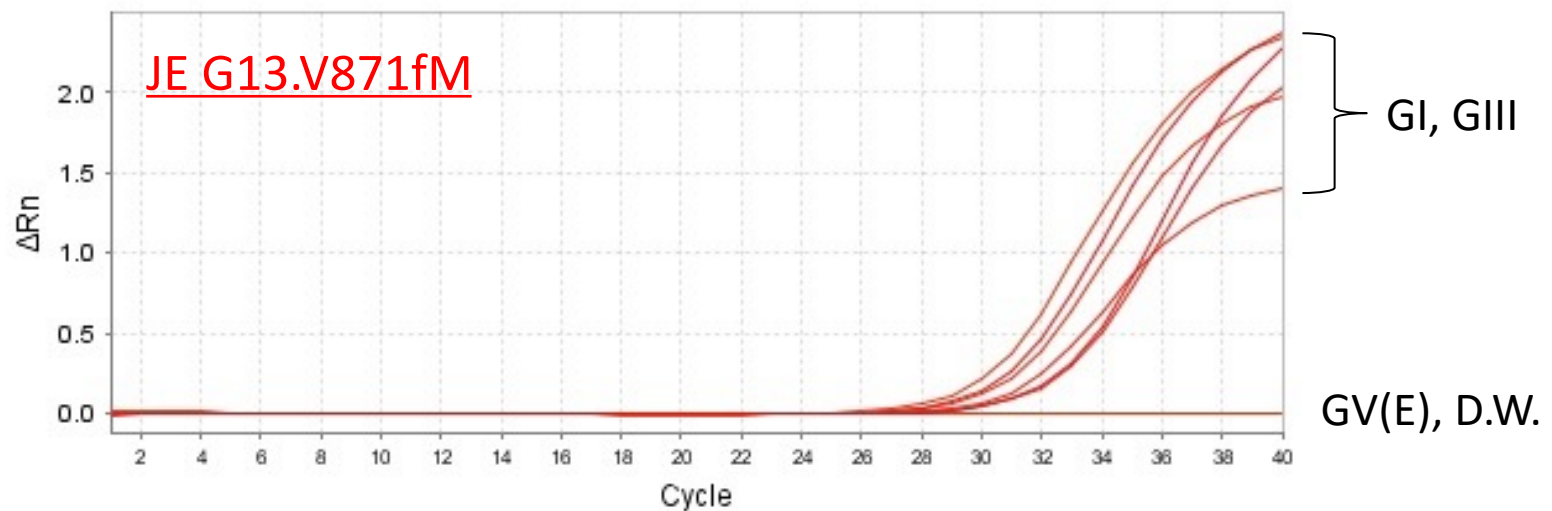
GI, GIII JEV特異的TaqManプローブの設計 (2)



GI, GIII JEV特異的TaqManプローブによるJEVゲノム検出(2)


感度低い
要改善

		Ct value
GI	Hiroshima/46/1998	32.6
	Mie/41/2002	30.8
	Mie/51/2005	32.6
GIII	JaTH160	31.9
	JaTAn1/75	31.1
	JaTAn1/90	30.2
GV (E)	Muar	ND
	rJEV-EXZ0934-M41	ND



アルボウイルス感染症レファレンスセンターネットワークの強化

- 衛衛生微生物技術協議会・第43回研究会アルボウイルスレファレンスセンター等関連会議をオンラインにて2023年12月に開催し情報共有を実施した
- ContAmplicon挿入陽性コントロール、プローブについてその配布方法について検討した



マウスにおけるウスツウウイルスの病原性解析

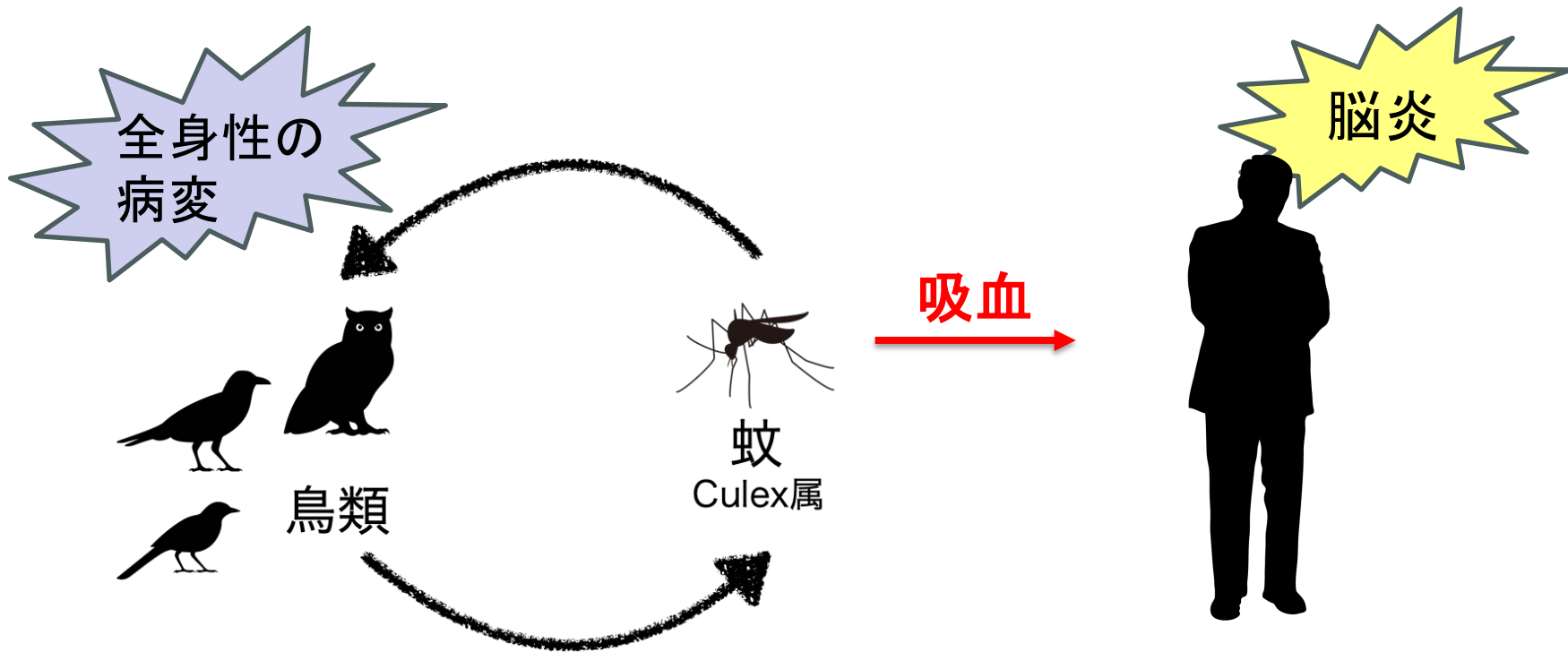
西山 祥子¹⁾、伊藤 佑夏²⁾、羽田 彩夏²⁾、松井 清彦^{1) 2)}、
田島 茂¹⁾、海老原 秀喜¹⁾、林 昌宏¹⁾

1)国立感染症研究所 ウイルス1部、 2) 麻布大学 生命・環境科学部

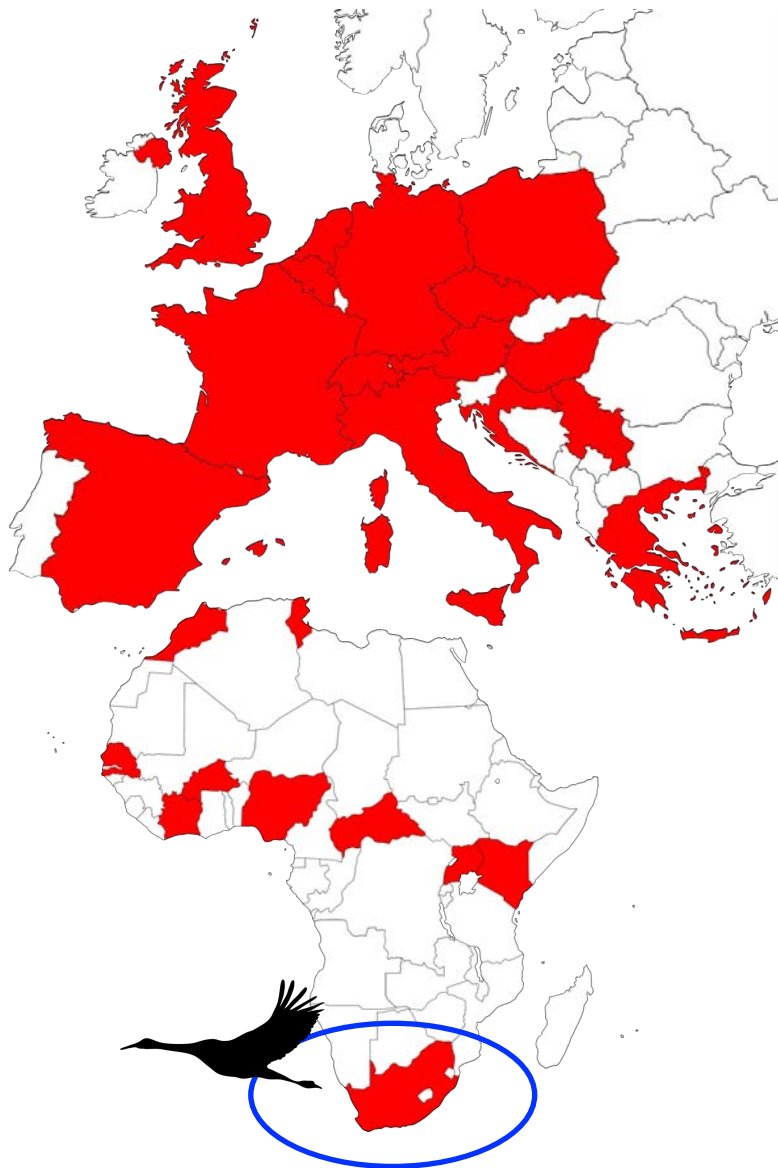
ウスツウイルスとは

フラビウイルス科フラビウイルス属

日本脳炎血清型群



ウスツウイルスの疫学



複数の遺伝子型
に分かれる。

ヨーロッパ全土へ

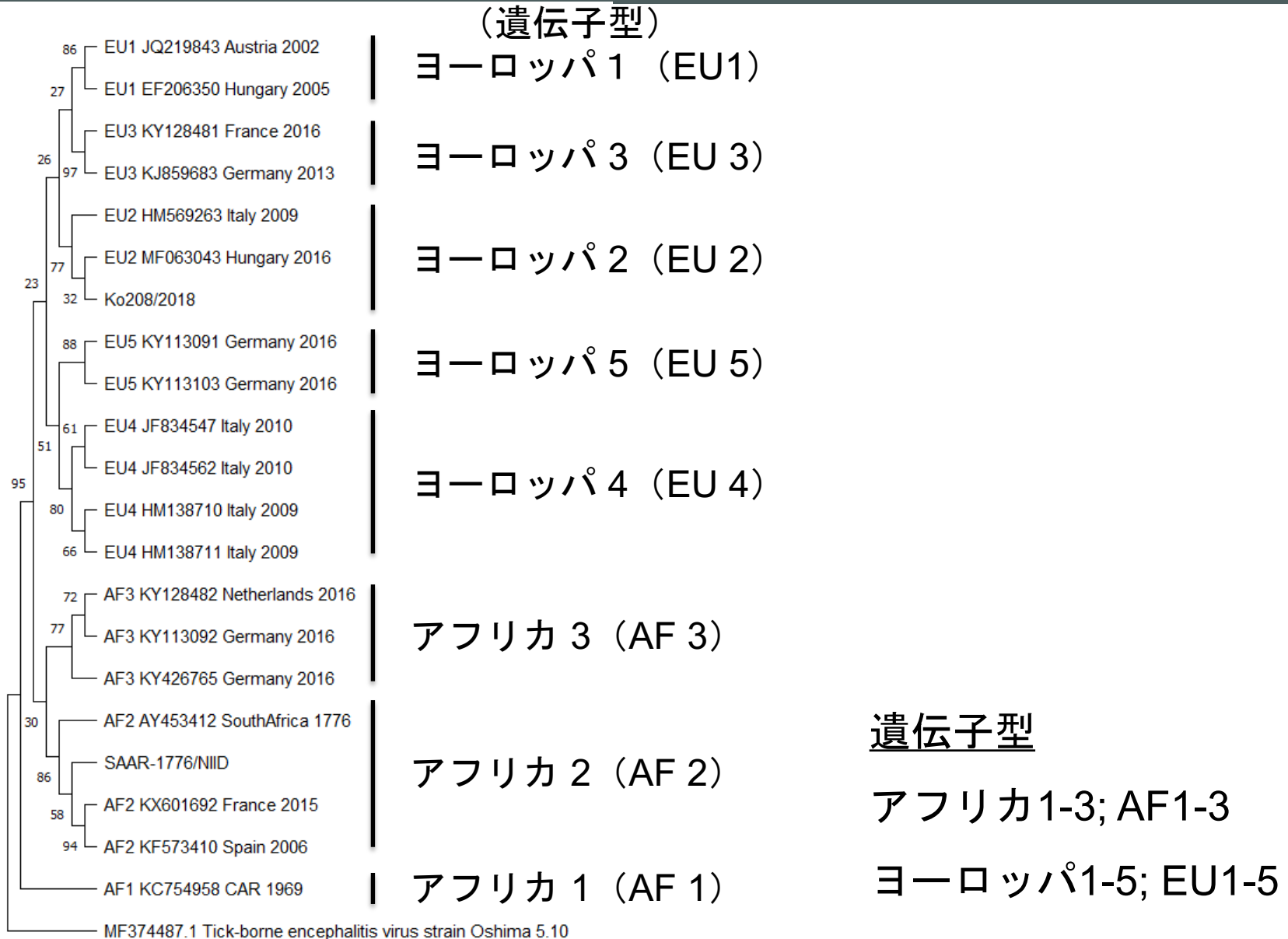


アフリカ各地へ



1959年南アフリカ

NS5の部分配列による系統樹



ヒトでの急性ウスツウイルス感染症

国名	症状	年齢	持病	Genotype
オーストリア	髄膜炎	81	高血圧、片側不全麻痺	EU2
クロアチア	髄膜脳炎	29	なし	Unknown
		62	なし	Unknown
		56	高血圧症、冠動脈疾患、糖尿病	Unknown
	神経浸潤性疾患	25	なし	EU2
		84	なし	EU2
		60	免疫不全、慢性リンパ性白血病	EU2
チェコ	髄膜脳炎	46	なし	Unknown
フランス	顔面麻痺	39	なし	AF2
イタリア	髄膜炎	40	なし	EU2
		60	免疫不全、B細胞リンパ腫	EU1
	髄膜脳炎	40	慢性の肝臓病	Unknown
		40	免疫不全、肝臓移植	Unknown
		54	多発性神経炎、高血圧	Unknown
		60	高血圧、糖尿病	Unknown
		67	大動脈弁閉鎖不全症	Unknown

EU2型のウスツウイルスは哺乳類病原性が高い？