

# アルボウイルスレファレンスセンター等 関連会議

2022年7月29日(金)

国立感染症研究所ウイルス第1部第2室



# DENV-CHIKV-ZIKV TaqMan real-time RT-PCR用 陽性コントロールの作製

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  
2022年7月29日

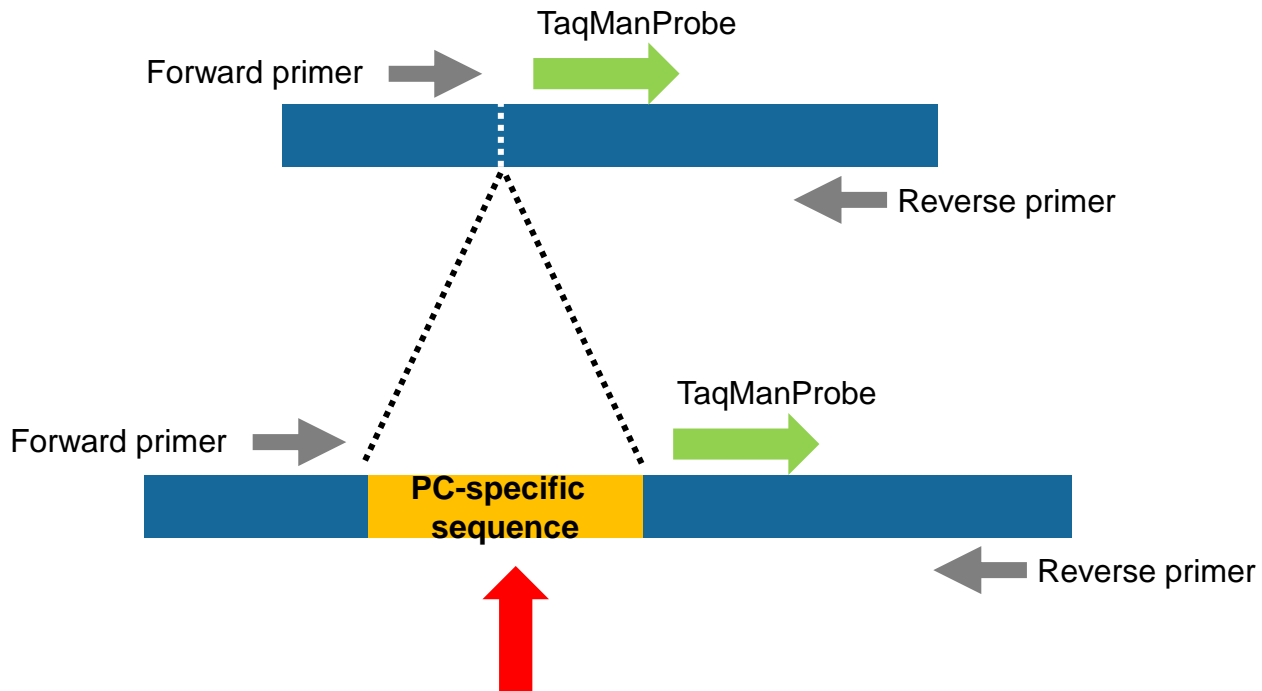
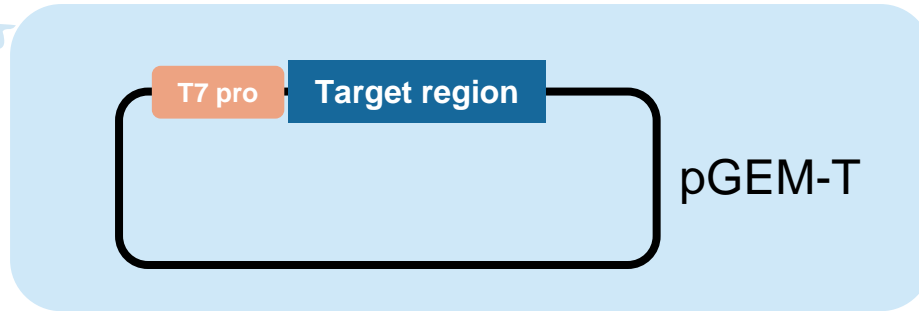
## 目的

これまで当研究室では、アルボウイルス（デングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルス）のリアルタイムPCR法によるゲノム検出用陽性コントロールとして、感染性ウイルスから抽出したウイルスゲノムRNAを提供してきた。

しかしこれらは、ウイルスゲノムの検体中のコピー数算出には使用できない。さらに、反応系や臨床検体への陽性コントロールのコンタミネーションの可能性を判断することも困難である。

そこで今回当研究室では、これらの問題点を改善するために、新たな陽性コントロールを作製した。

# 陽性コントロール特異的配列の挿入



Contamplicon (CA) probe: VIC(or HEX)-AGT AGC TTG CTC TTT CAT CTG TTA CG-none(or BHQ1)

Forward primer

Probe

ContAmplicon

Reverse primer

## DENV1

GGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAAAAGGAAGCCTTATAACGTGTGCTAAG  
TTCAAGTGTGTGACAAAACCTGGAAGGAAAAATAGTTCAATATGAAAACCTTGAAATATTCAGTAATAGTCACCGTCCACAC  
TGGAGACCAGCACCAGGTGGGAAATGAAAGCACAGAACATGGGACAACCTGCAACTATAACACCTCAAGCTCTACagtag  
cttgctctttcatctgtttacgGACAGAAATACAGCTGACCGACTACGGAGCTCTTACATTGGATTGTTACCTAGAACAG  
GACTAGACTTTAATGAAATGGTGTGTTGACAATGAAAGAAAAATCATGGCTAGTCCA

## DENV2

AAGGAAAAATCGTGCAACCAGAAAACCTTGGAGTACACCATTGTGATAACACCTCACTCAGGGGAAGAGAATGCAGTCGGA  
AATGACACAGGAAAACACGGCAAGGAAATTAAAGTAAACACAGAGTTCATCACAGAAGCAGAAGCTagtagcttgctc  
tttcatctgtttacgAACAGGCTATGGCACTGTCAAGATGGAATGCTCTCCGAGAACGGCCTCGACTTCAATGAGATGGT  
GTTGCTGCAGATGGAAAACAAGGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTCTTAGACCTGCCGTTACCATGGCTGCCCGGAG  
CAGAC

## DENV3

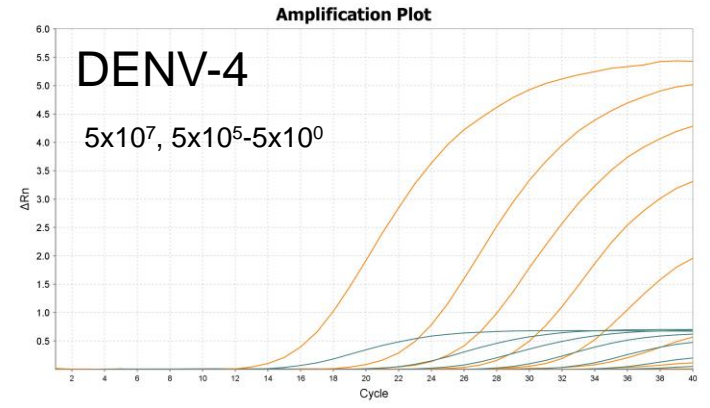
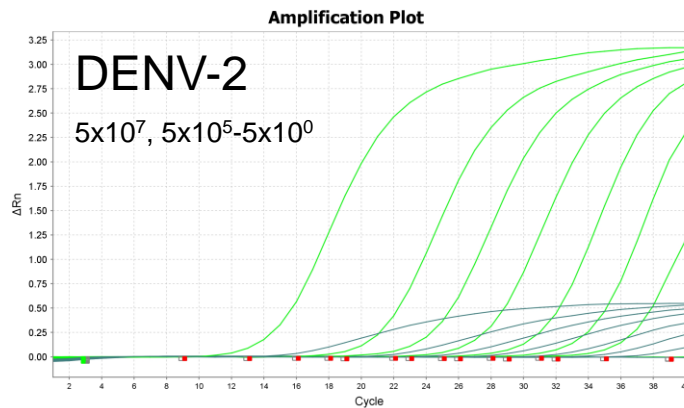
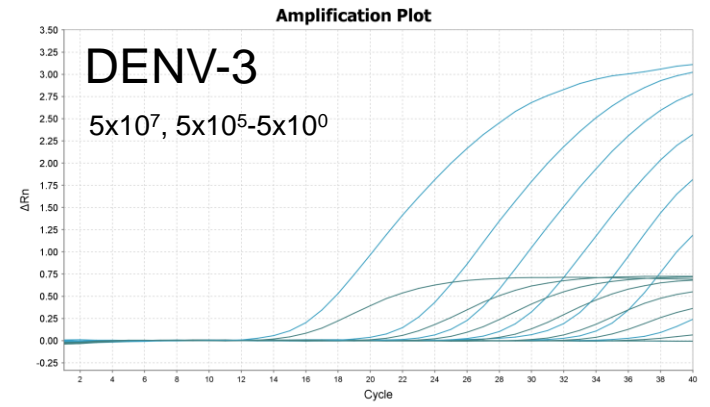
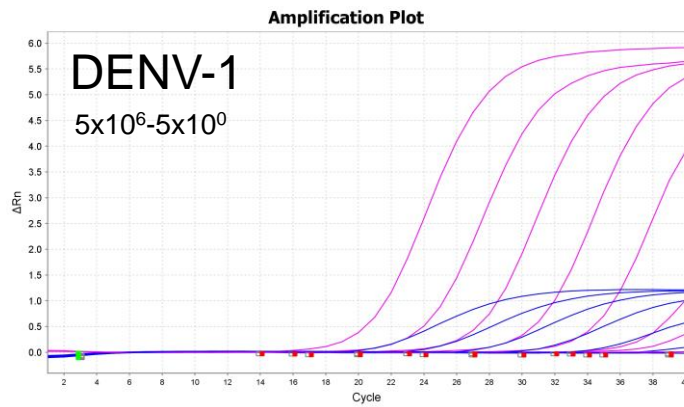
TGGCGTTAGCTCCTCATGTCGGCATGGGACTGGACACACGCACCCAAACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTGGAGACAA  
GTCGAGAAGGTAGAGACATGGGCCCTTAGGCACCCAGGGTTCACCATACTAGCTCTATTTCTTGCCATTACATAGGCAC  
TTCCTTGACCCAGAAAGTGGTTATTTTTATACTACTAATACTGGTCACTCCATCCATGGCAATGAGATGCGTGGGAGTAG  
GAAACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCagtagcttgctctttcatctgtttacgGGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTGC  
TCGAAC

## DENV4

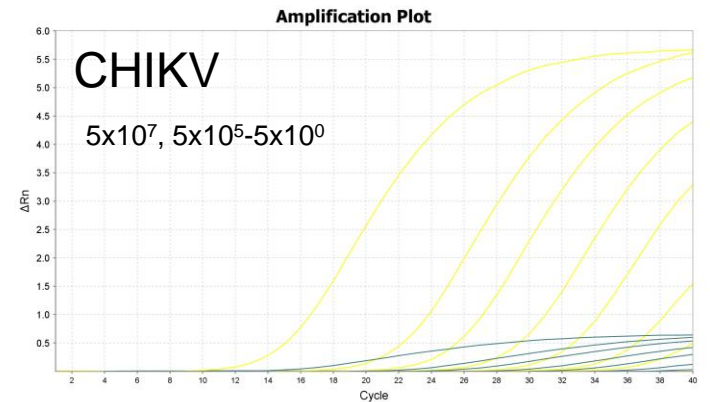
CTTCAATGAGATGATCCTGATGAAAATGAAAAAGAAAACATGGCTCGTGCATAAGCAATGGTTTTTGGATCTGCCTCTTC  
CATGGACAGCAGGAGCAGACACATCAGAGGTTCACTGGAATTACAAAGAGAGAATGGTGACATTTAAGGTTCTCATagt  
agcttgctctttcatctgtttacgGCCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTGGGATCTCAGGAAGGAGCCATGCATTCTGCC  
CTCGCTGGAGCCACAGAAGTGGACTCCGGTGATGGAAATCACATGTTTGCAGGACATCTCAAGTGCAAAGTCCGTATGGA  
GAAATT

## CHIKV

AACTGCGCCGTAGGGAACATGCCATCTCCATCGACATAACCGGAAGCGGCCTTCACTAGGGTTCGTCGACCGCCCTCTTT  
AACGGACATGTCGTGagtagcttgctctttcatctgtttacgCGAGGTACCAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGG  
CGTCGCCATTATTAATATGCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACTAACGCCGTCCTACTATTCGGG  
AAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTTTTCTCGACGGCCTTAGCCAGCGCCGAATTCCGCGTA  
CAAGTC



ZIKVはDNA組換え実験が  
 大臣確認実験であったため、  
 保留



# ContAmplicon\_DCZ Realtime RT-PCRの反応系

(FV1step DCZ-CA)

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

	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	CHIKV
Primer F	D1MGBEn469s	D2MGBEn493s	D3MGBEn1s	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 40cycle	95°C	3 sec
	57°C	30 sec

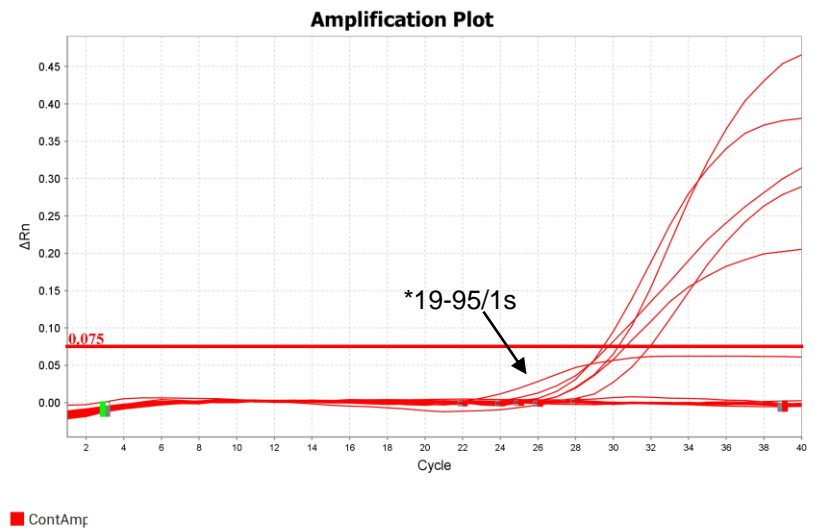
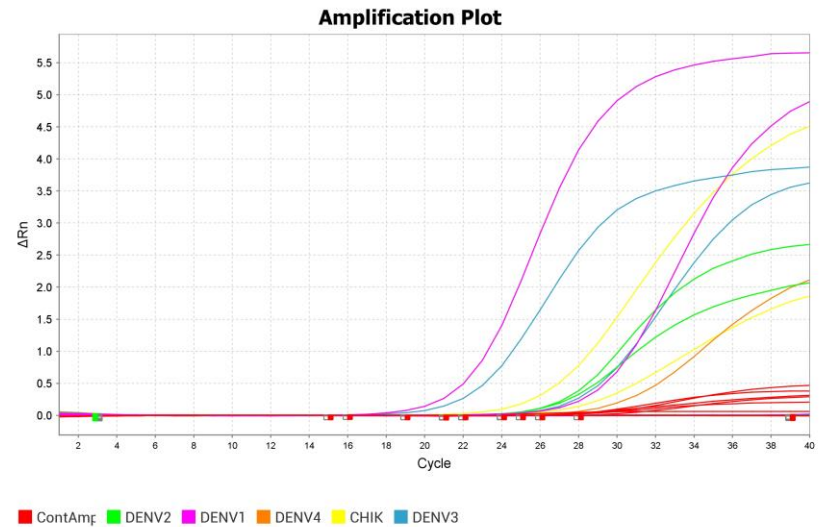
(fast)

# 臨床検体を使用した検討 (single well)

## Ct値

Reaction mix	PC+CA	NC	19-92/1s (CHIKV)	19-95/1s (D1)	19-98/1s (D3)	19-103/1s (D2)
D1	29.7	UD	UD	22.3	UD	UD
D1-CA	30.3	UD	UD	UD*	UD	UD
D2	27.1	UD	UD	UD	UD	27.3
D2-CA	30.7	UD	UD	UD	UD	UD
D3	28.9	UD	UD	UD	22.9	UD
D3-CA	29.5	UD	UD	UD	UD	UD
D4	31.0	UD	UD	UD	UD	UD
D4-CA	31.9	UD	UD	UD	UD	UD
CHIKV	25.2	UD	28.8	UD	UD	UD
CHIKV-CA	29.7	UD	UD	UD	UD	UD

- ✓ 検体RNAサンプルは原液を2倍希釈して使用
- ✓ D1-4 PC+CA:  $2.5 \times 10^3$  copies/uL
- ✓ CHIKV PC+CA:  $10^4$  copies/uL



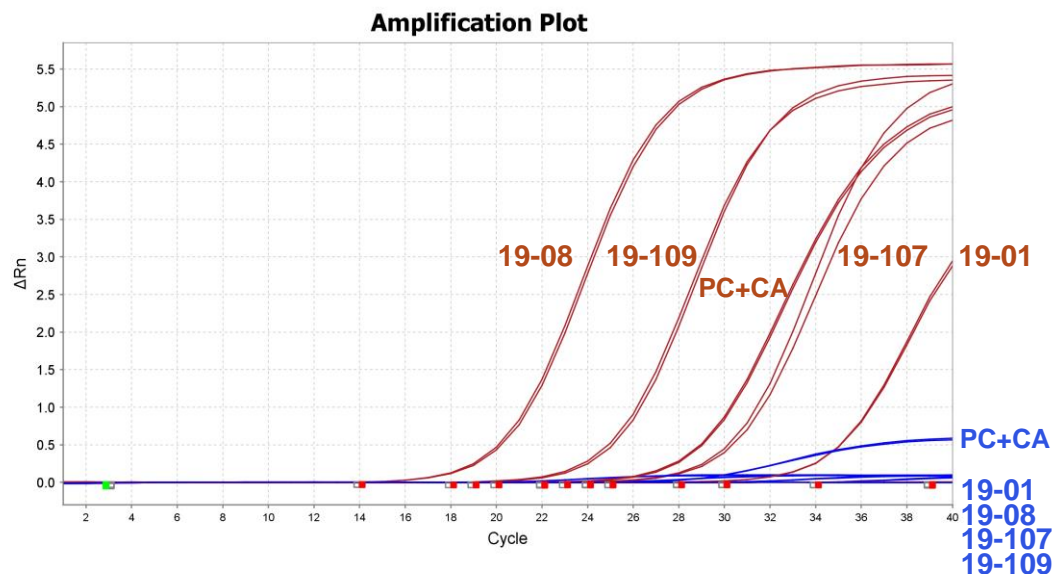
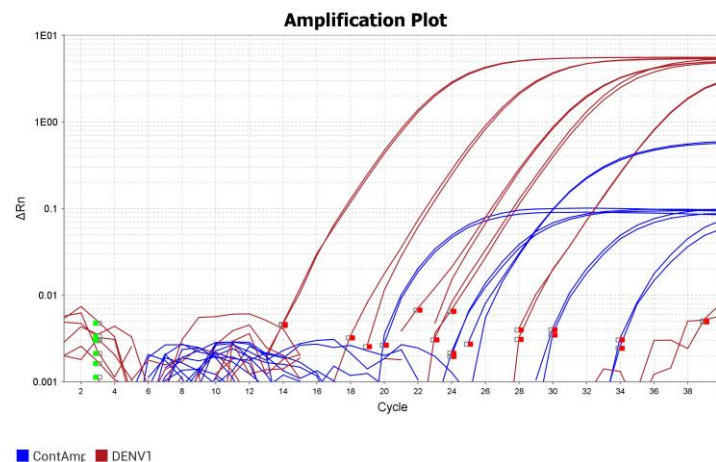


# 臨床検体を使用した検討 (DENV1-positive samples, duplicate)

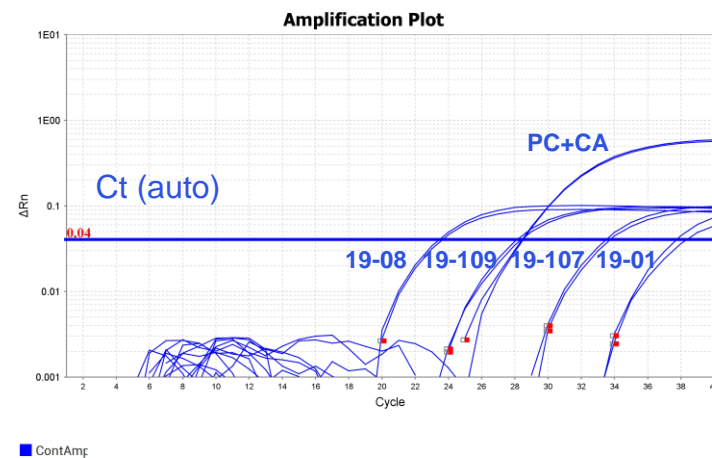
Ct値\*

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



■ ContAmp ■ DENV1



■ ContAmp

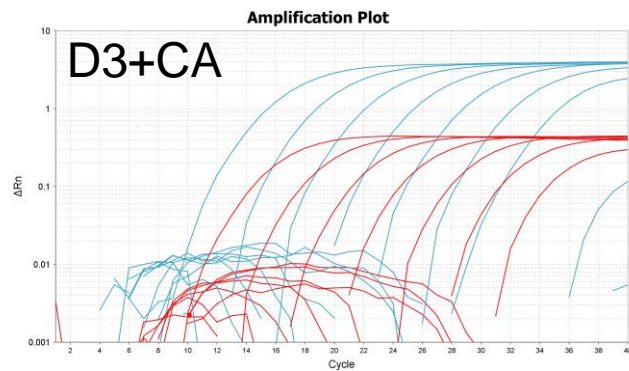
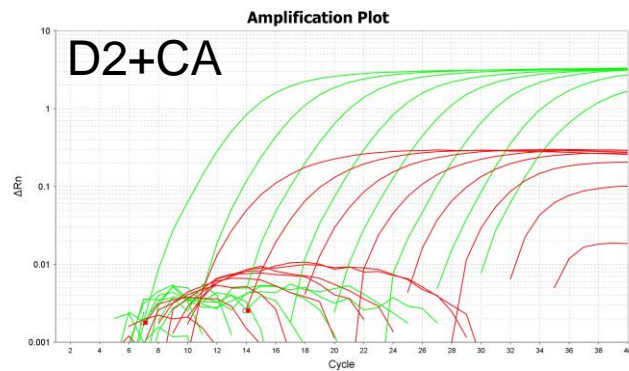
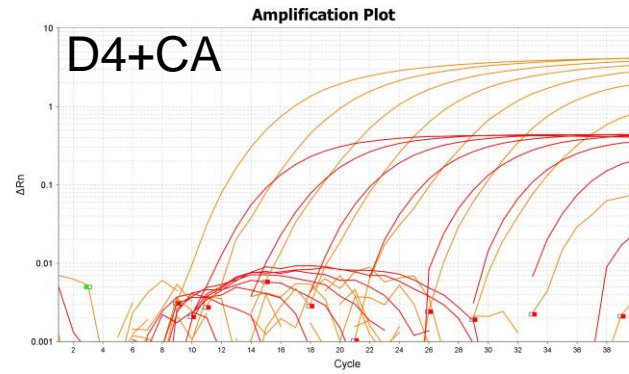
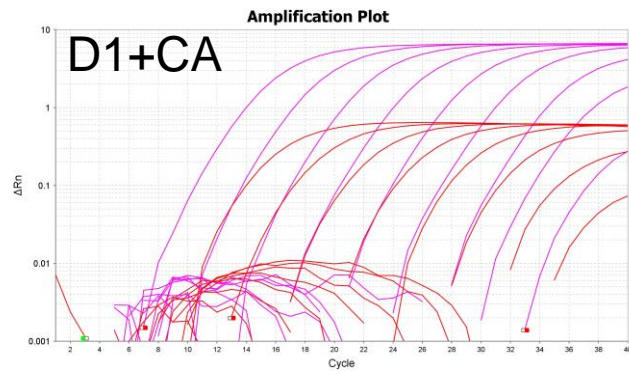
デングウイルス1型ゲノムと少し反応してしまうが、増幅パターンで判別可能。

## 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 (10<sup>9</sup>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、10<sup>3</sup>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行ってください。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。
- ✓ 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)

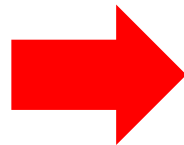
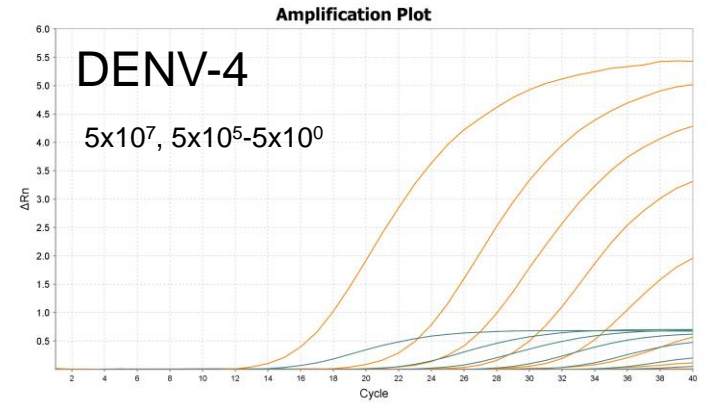
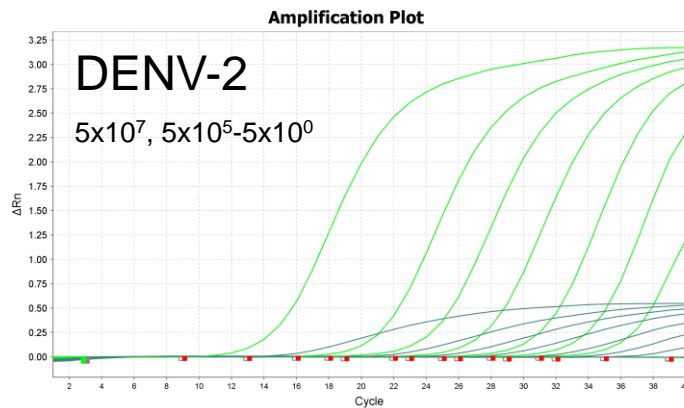
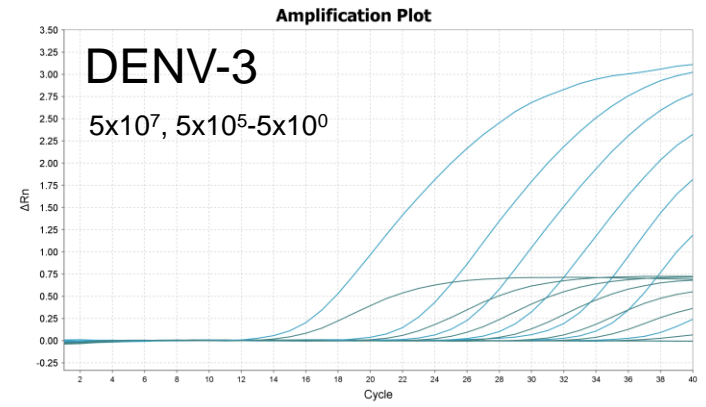
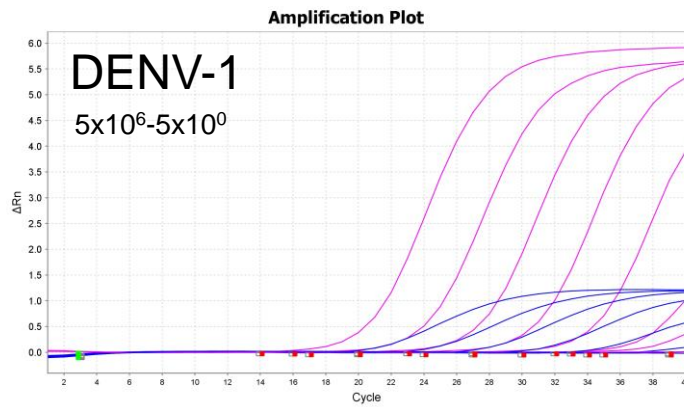
# 実際に送付する陽性コントロールおよびCAプローブのチェックデータ ( $5 \times 10^8$ - $5 \times 10^0$ copies/rxn)



Posi. Contrl*.	Ct値** ( $5 \times 10^2$ copies/ rxn)	
	Virus	CA
D1+CA	32.4	33.5
D2+CA	31.3	33.9
D3+CA	33.0	33.0
D4+CA	34.1	34.9

\*HEX-BHQ1, \*\* auto

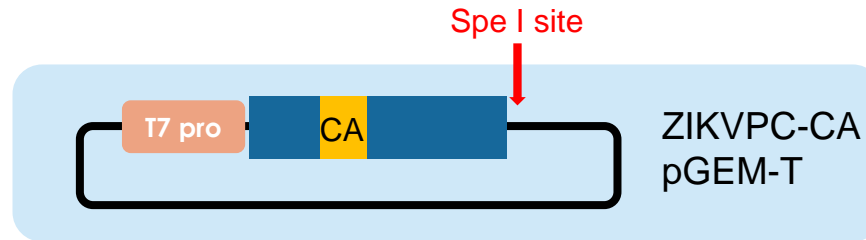
✓ 通常、 $1 \times 10^3$  copies/uL程度に希釈して使用



ZIKVはDNA組換え実験が  
 大臣確認実験であったため、  
 保留

**機関承認で可能になった**

# 陽性コントロール特異的配列の挿入



## ZIKV

ATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGATTGCCCGGC  
ATACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGTCAGGTGGGACTTGGGTGATGTTGTC  
TTGGAACATGGAGGTTGTGTCACCGTAATGGCACAGGACAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCA  
GCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCTGACAG**CCGCTGCCCAACACA**  
**AGG**TagtagcttgctctttcatctgttacgGA**AGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAAT**ATGTCTGCAAAAGAA  
**CGTTAGTGG**ACAGAGGCTGGGGAAATGGATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCC

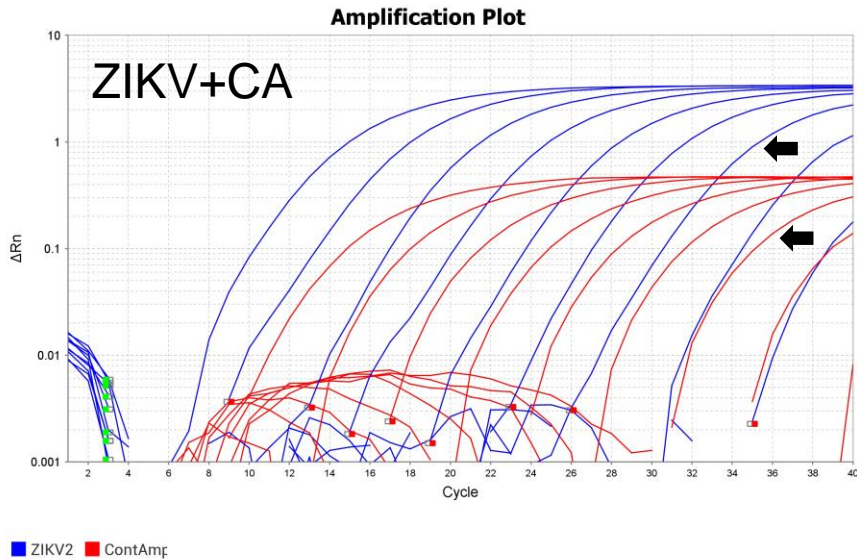
Forward primer

Probe

ContAmplicon

Reverse primer

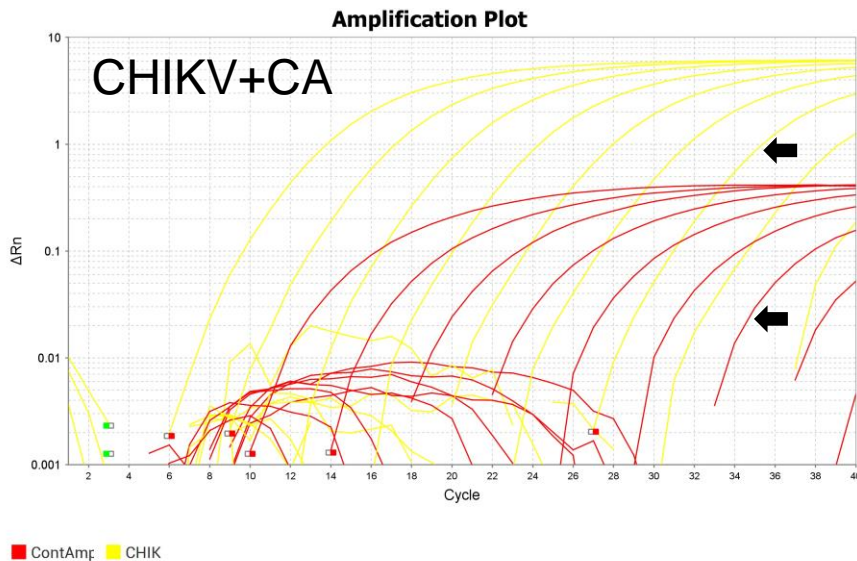
# ZIKV・CHIKV陽性コントロールおよびCAプローブのチェックデータ ( $5 \times 10^8$ - $5 \times 10^0$ copies/rxn)



← :  $5 \times 10^2$  copies/rxn

Posi. Contrl*	Ct値** ( $5 \times 10^2$ copies/ rxn)	
	Virus	CA
ZIKV+CA	31.6	33.3
CHIKV+CA	33.6	35.5

\*HEX-BHQ1, \*\* auto



✓ 通常、 $1 \times 10^3$  copies/uL程度に希釈して使用

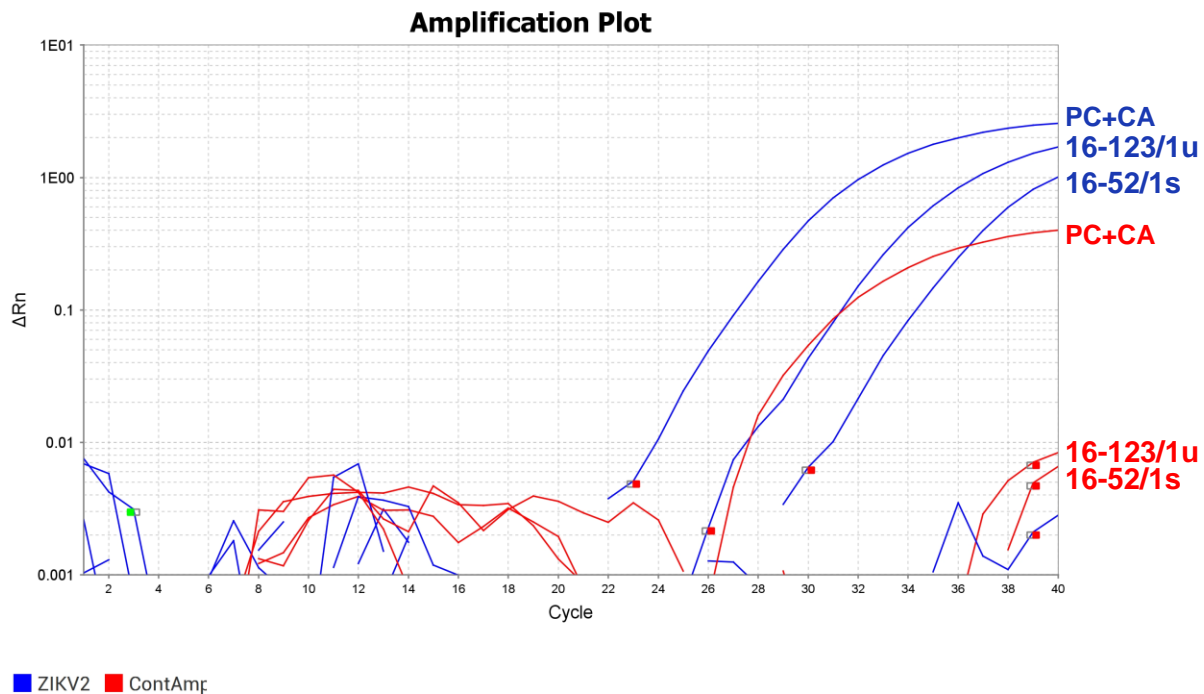
今後送付用に調製する予定

# 臨床検体を使用した検討 (ZIKV-positive samples)

Ct値(auto)

Probe	PC+CA*	NC	16-52/1s	16-123/1u
ZIKV	28.1	UD	35.4	32.3
CA	29.4	UD	UD	UD

\*5 x 10<sup>3</sup> copies/rxn

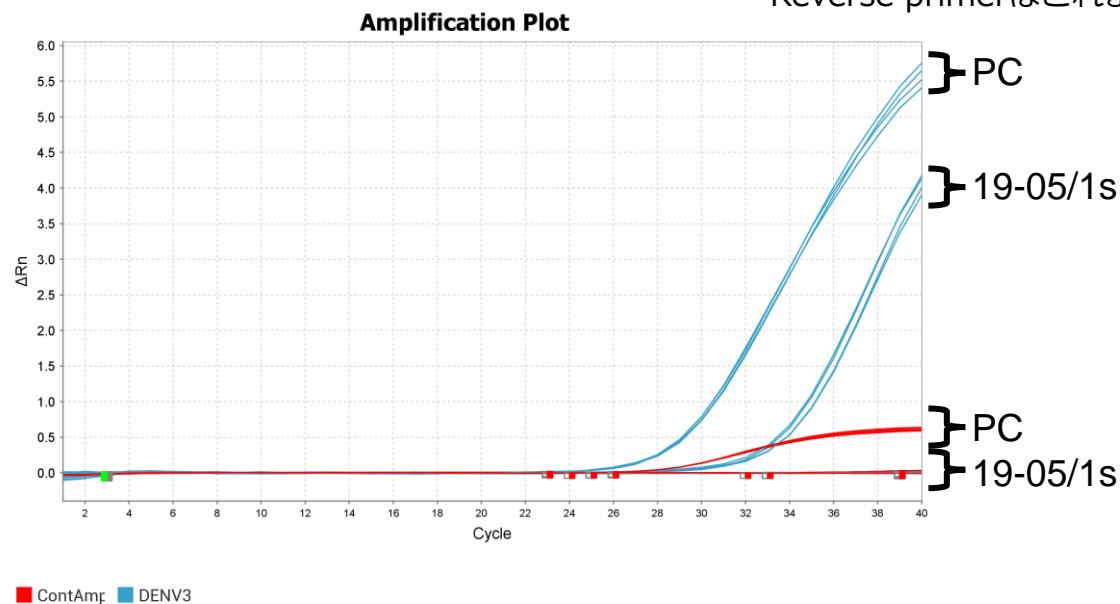


# DENV3用プライマー配列の変更

東京都健康安全研究センター：森先生からのご提案（より多くのDENV3に対応可能）

Set	Forward primer	Sequence
Ver. 1	D3MGBEn1s	ATG AGA TGY GTG GGA GTR GGA AAC
Ver. 2	D3MGBEn1s.v2	ATG AGA TGY GTG GGA GTR GGA AAC

\*Reverse primerはこれまで通り



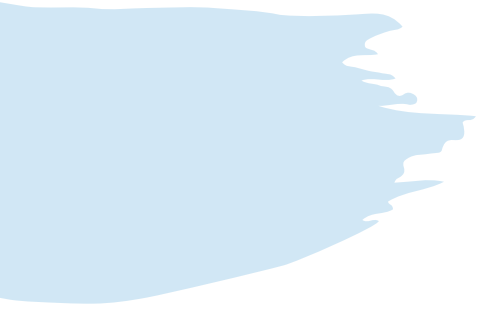
Ct値(auto)

Set	PC / CA	NC / CA	19-05/1s / CA
Ver. 1	29.1 / 28.5	UD / UD	33.6 / UD
Ver. 2	29.1 / 28.5	UD / UD	33.7 / UD



# DCZ Primer-Probe sequence (2022.7) (2022.10.26 ZIKVプローブ配列修正)

	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)



以上です

# 2019年以降に日本で報告された日本脳炎患者 から検出された日本脳炎ウイルスの遺伝子型

前木 孝洋<sup>1)</sup>、田島 茂<sup>1)</sup>、中山 絵里<sup>1)</sup>、勝田 奈穂子<sup>1)</sup>、柴崎 謙一<sup>1)</sup>、谷口 怜<sup>1)</sup>、林 昌宏<sup>1)</sup>、  
西條 政幸<sup>2)</sup>、海老原 秀喜<sup>1)</sup>

1) 国立感染症研究所 ウイルス第一部

2) 札幌市保健福祉局・保健所

令和4年7月29日

# 日本脳炎 (Japanese encephalitis, JE)

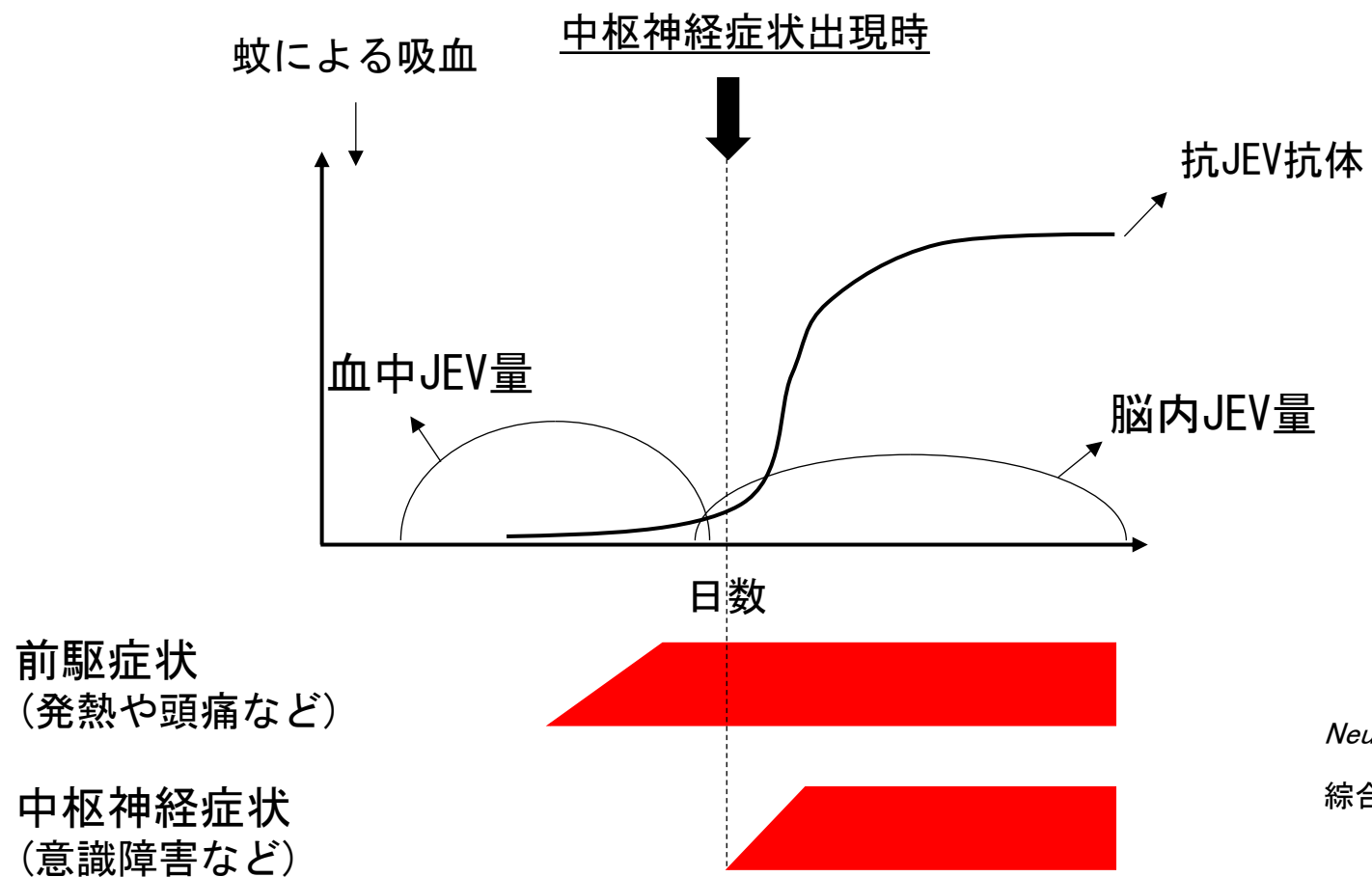
- 原因
  - 日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus, JEV)
- 感染経路
  - 主に、コガタアカイエカによる吸血
- 症状
  - 大半は無症状
  - 発症例では、発熱や頭痛などの前駆症状の後に痙攣や意識障害などが出現
  - 発症例の約20%が死亡、50%が後遺症を残して回復
- 治療法
  - 特異的な治療薬は存在しない
- 予防
  - 日本ではVero細胞由来の不活化ワクチン

2012年から2021年のJE患者報告数

10年間で44人 → 4.4人/年

年	JE患者報告数
2021	2
2020	4
2019	8
2018	0
2017	3
2016	11
2015	2
2014	2
2013	9
2012	2

# JEの診断

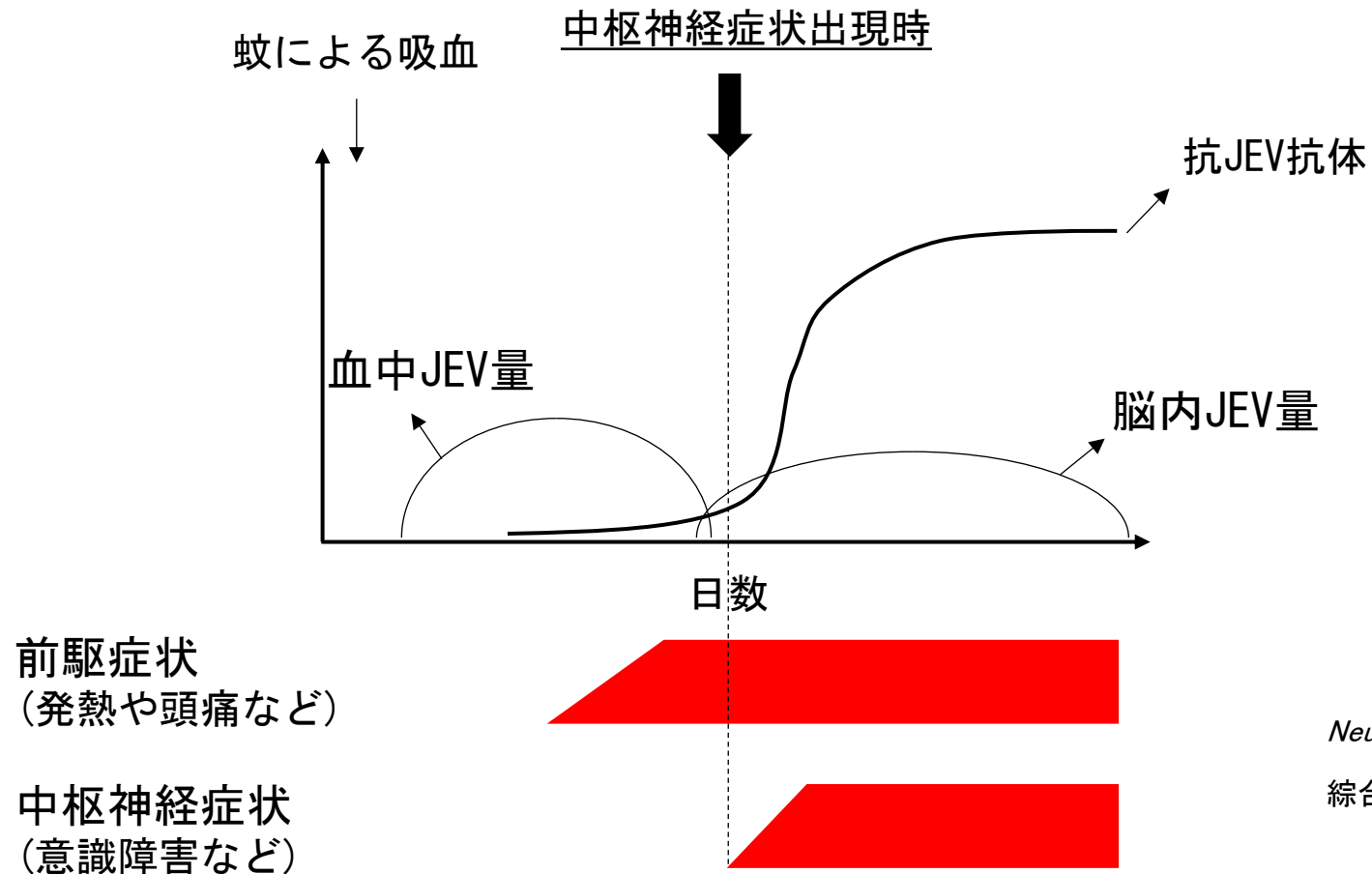


*Neurol Clin* 2008;26:727-57

総合臨床 1982. 31 (3) 452-456, 図1  
(一部修正)

# JEの診断

中枢神経症状が出現した時点では  
JEV遺伝子は血液や髄液からはほとんど検出されない

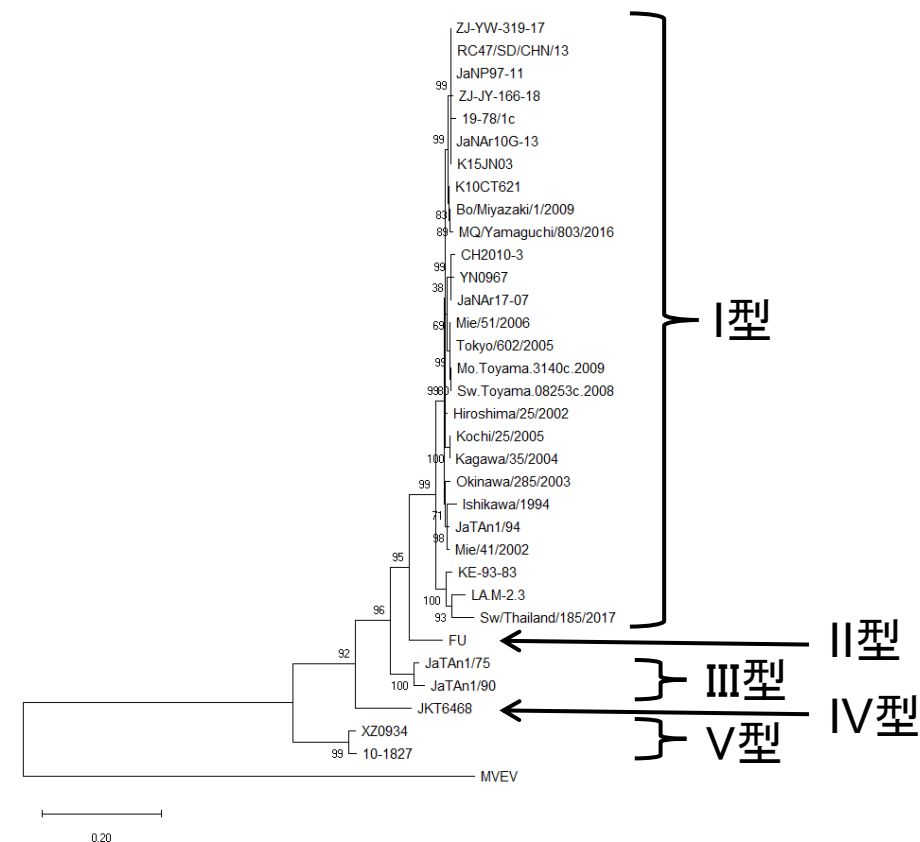


*Neurol Clin* 2008;26:727-57

総合臨床 1982. 31 (3) 452-456, 図1  
(一部修正)

# JEV

- 分類: フラビウイルス科フラビウイルス属
- 血清型: 1つ
- 遺伝子型: 5つ (I型 ~ V型)
  - 日本で検出された株
    - ~1990年代: III型
    - 1990年代~: I型
  - 日本で使用されているワクチン: III型株



▲ JEVの系統樹

# JEVの遺伝子型間でのアミノ酸配列の相同性

JEV V型株は他の遺伝子型株との相同性が低い

アミノ酸配列の差異 (%)

株名	遺伝子型	アミノ酸配列の差異 (%)				
		K9P05 (I型)	FU (II型)	Nakayama (III型)	JKT6468 (IV型)	Muar (V型)
K9P05	I	—	—	—	—	—
FU	II	2.1	—	—	—	—
Nakayama	III	3.1	2.2	—	—	—
JKT6468	IV	6.2	5.3	4.8	—	—
Muar	V	9.9	8.6	8.5	9.2	—



# JEV V型

JEV V型株が近年、中国および韓国で検出された

年	報告内容
1952	JEV V型株が脳炎患者の脳組織から分離された ～50年間以上、JEV V型株が発見されたという報告はなかった～
2009	中国のコガタアカエイカからJEV V型株が分離された
2010	韓国のイエカからJEV V型株の遺伝子が検出された
2012	韓国のアカエイカからJEV V型株の遺伝子が検出された
2020	韓国のJE患者(2015年発症)の髄液からJEV V型株が分離された

# JEV V型

JEV V型株が近年、中国および韓国で検出された



日本にJEV V型株が侵入する可能性

年	報告内容
1952	JEV V型株が脳炎患者の脳組織から分離された ～50年間以上、JEV V型株が発見されたという報告はなかった～
2009	中国のコガタアカエイカからJEV V型株が分離された
2010	韓国のイエカからJEV V型株の遺伝子が検出された
2012	韓国のアカエイカからJEV V型株の遺伝子が検出された
2020	韓国のJE患者(2015年発症)の髄液からJEV V型株が分離された

# 目的と方法

- 目的

- 近年の日本でJEの原因となっているJEVの遺伝子型を決定する。

- 方法

- 2016年以降に行政検査、あるいは医療機関からの依頼でJE診断のために検査\*を実施し、JEV遺伝子が検出され、エンベロープ(envelope, E)領域の配列を確定できた検体の結果を解析した。

\* ウイルス第一部で実施している検査

検体	検査
急性期検体(髄液、血清)	Real time RT-PCR
髄液(急性期、回復期)、血清(急性期、回復期)	IgM捕捉ELISA
血清(急性期、回復期)	中和試験

## 2016年以降に報告されたJE患者から採取された急性期検体と検査結果

年	患者番号	検体番号*	発症後日数 (日)	Real time	JEV特異的	
				RT-PCR結果**	IgM捕捉ELISA結果	
2016年	16-94	/1c	0	-	+	
		/1s	6	-	+	
	16-101	/0c	1	-	+	
		/1c	6	-	+	
		/1s	2	-	+	
	16-104	/1s	4	-	+	
		/1c	4	-	+	
	16-109	/1c	5	-	+	
	16-113	/1c	5	-	+	
	16-122	/1s	7	-	+	
	2017年	17-69	/1c	3	-	+
			/1s	3	-	+
17-78		/1s	0	-	+	
2019年	19-78	/1c	2	+ (33.9)	-	
		/1s	4	-	+	
	19-99	/1c	1	-	+	
		/1p	1	-	+	
	19-104	/1s	3	-	+	
	19-105	/1s	5	-	+	
	19-106	/1s	5	-	+	
	19-108	/1c	3	-	+	
2020年	20-12	/1c	1	-	+	
		/1s	1	-	+	
		/2c	3	-	+	
	20-13	/2s	5	-	+	
		/1c	4	+ (32.9)	-	
		/1s	7	-	+	
2021年	21-01	/1c	2	-	+	
		/1s	2	-	+	
	21-08	/1c	1	-	+	
		/1s	1	-	+	
		/2s	2	-	+	
2022年	22-01	/1c	4	-	+	
		/1s	3	+ (36.0)	+	
		/1B		+ (22.1)		

25検体中3検体で、E領域の塩基配列を決定できた

\* 検体番号

c: 髄液 (csf)

s: 血清 (serum)

p: 血漿 (plasma)

B: 脳組織 (brain)

\*\* ( )内の数字はCt値を表す

# 2016年以降に報告されたJE患者から採取された急性期検体と検査結果

年	患者番号	検体番号*	発症後日数 (日)	Real time	JEV特異的
				RT-PCR結果**	IgM捕捉ELISA結果
2016年	16-94	/1c	0	-	+
		/1s	6	-	+
		/0c	1	-	+
	16-101	/1c	6	-	+
		/1s	2	-	+
		/1s	4	-	+
		/1c	4	-	+
	16-104	/1s	4	-	+
		/1c	4	-	+
		/1c	5	-	+
16-109	/1c	5	-	+	
	/1c	5	-	+	
	/1s	7	-	+	
2017年	17-69	/1c	3	-	+
		/1s	3	-	+
	17-78	/1s	0	-	+
2019年	19-78	/1c	2	+ (33.9)	-
		/1s	4	-	+
	19-99	/1c	1	-	+
		/1p	1	-	+
	19-104	/1s	3	-	+
	19-105	/1s	5	-	+
	19-106	/1s	5	-	+
	19-108	/1c	3	-	+
2020年	20-12	/1c	1	-	+
		/1s	1	-	+
		/2c	3	-	+
	20-13	/2s	5	-	+
		/1c	4	+ (32.9)	-
		/1s	7	-	+
2021年	21-01	/1c	2	-	+
		/1s	2	-	+
	21-08	/1c	1	-	+
		/1s	1	-	+
		/2s	2	-	+
2022年	22-01	/1c	4	-	+
		/1s	3	+ (36.0)	+
		/1B		+ (22.1)	

25検体中3検体で、E領域の塩基配列を決定できた



遺伝子型は3つともI型

\* 検体番号

c: 髄液 (csf)

s: 血清 (serum)

p: 血漿 (plasma)

B: 脳組織 (brain)

\*\* ( )内の数字はCt値を表す

# 22-01と相同性の高い株

(E領域)

株名	地域	年	検体の由来	相同性(%)
JEV/Hu/Okayama/NIID13/2020	岡山県	2020	JE患者髄液	1492/1500 (99.5%)
IM-OI34	愛媛県	2019	キチマダニ	1490/1500 (99.3%)
JEV/Mo/Kagawa/NIID09/2020	香川県	2020	コガタアカイエカ	1490/1500 (99.3%)
JEV/Hu/Hiroshima/NIID78/2019	広島県	2019	JE患者髄液	1489/1500 (99.3%)
JaNP97-11	諫早湾(長崎県)	2011	ブタ血清	1488/1500 (99.2%)

# 22-01と相同性の高い株

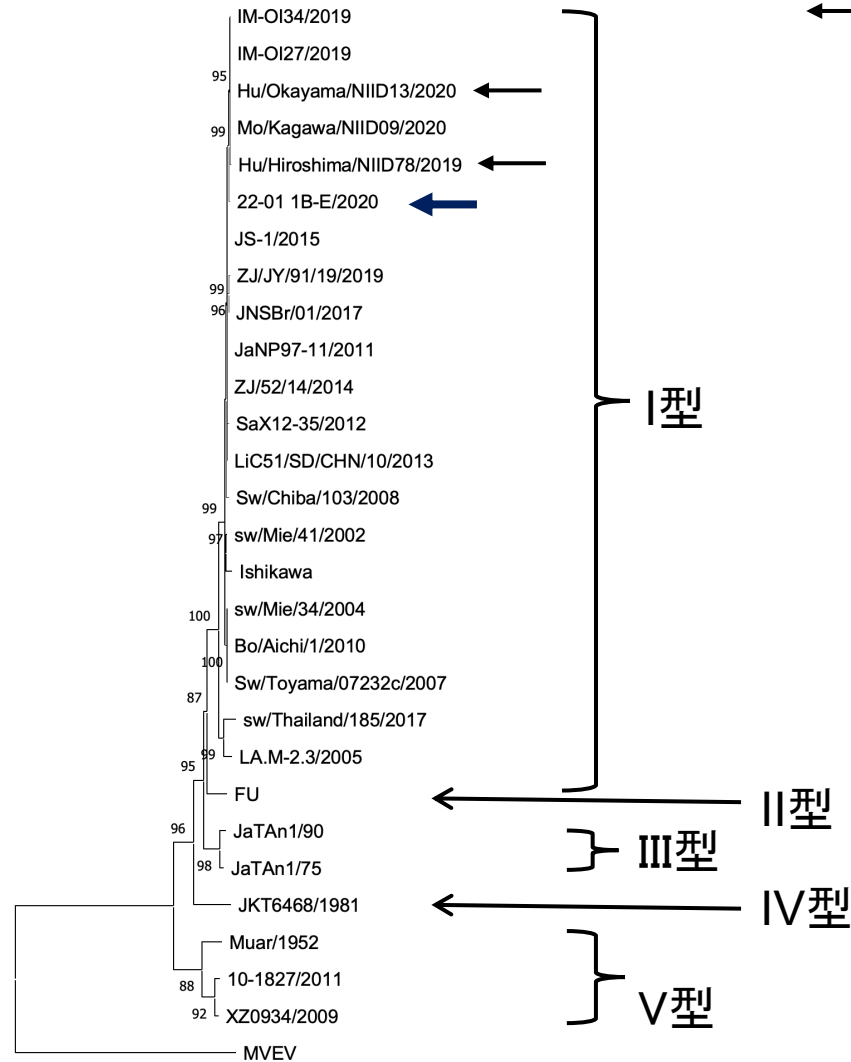
近年の西日本で検出された株と相同性が高い

(E領域)

株名	地域	年	検体の由来	相同性(%)
JEV/Hu/Okayama/NIID13/2020	岡山県	2020	JE患者髄液	1492/1500 (99.5%)
IM-OI34	愛媛県	2019	キチマダニ	1490/1500 (99.3%)
JEV/Mo/Kagawa/NIID09/2020	香川県	2020	コガタアカイエカ	1490/1500 (99.3%)
JEV/Hu/Hiroshima/NIID78/2019	広島県	2019	JE患者髄液	1489/1500 (99.3%)
JaNP97-11	諫早湾(長崎県)	2011	ブタ血清	1488/1500 (99.2%)

# 22-01の系統樹解析結果

← 22-01から検出された株  
← 2019年、2020年のJE患者髄液から検出された株



E領域

0.10



# まとめ

- 2016年以降に日本で発症したJE患者から採取された検体のうち3検体でJEVのE領域の配列を決定でき、遺伝子型はいずれもI型であった。
- 上記3株はいずれも近年の西日本で検出された株と高い相同性を示した。
- 近年の西日本でJEの原因となっているJEVは日本に土着しているものである可能性が高いと考えられた。

アルボウイルス・リケッチアレファレンスセンター等関連合同会議

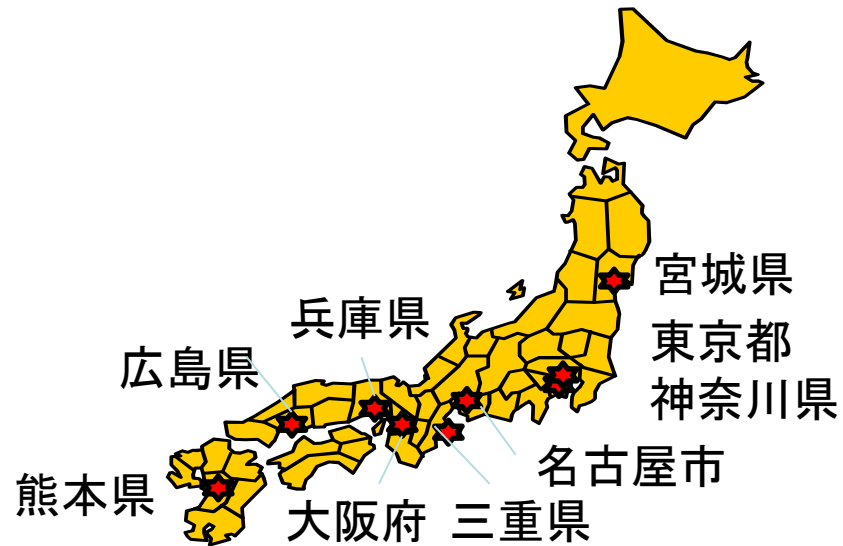
# 近年のアルボウイルス感染症の流行状況

2022年7月29日(金)

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

# アルボウイルス感染症レファレンスセンター



---

## レファレンスセンター

## 担当部・課

宮城県保健環境センター

微生物部

東京都健康安全研究センター

微生物部ウイルス研究科

神奈川県衛生研究所

所長

名古屋市衛生研究所

微生物部

三重県保健環境研究所

微生物研究課

大阪健康安全基盤研究所

微生物部ウイルス課

兵庫県立健康科学研究所

感染症部

広島県保健環境センター

保健研究部

熊本県保健環境科学研究所

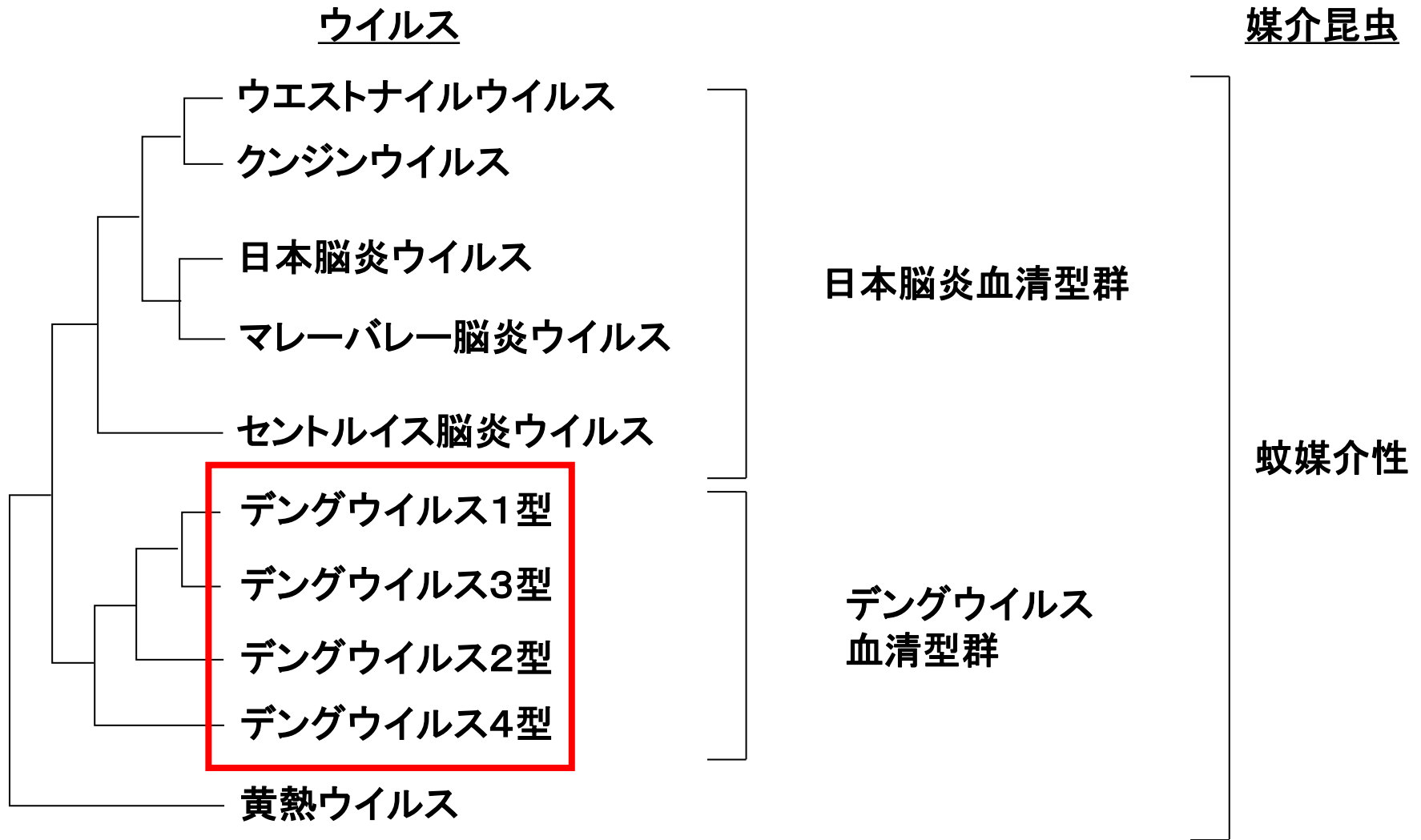
微生物科学部

国立感染症研究所

ウイルス第1部第2室

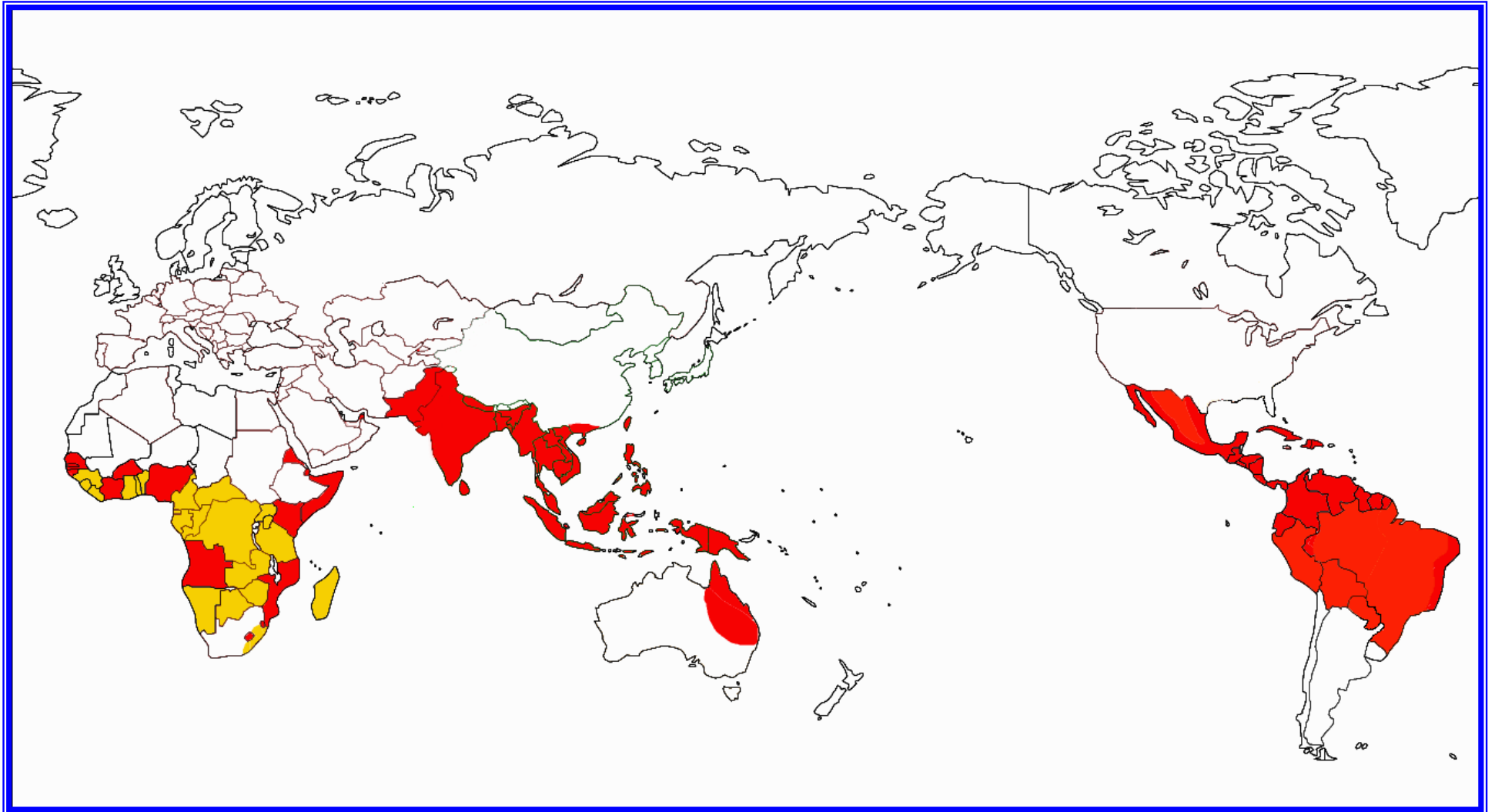
デングウイルス

# デングウイルス



(Fields Virology より改変)

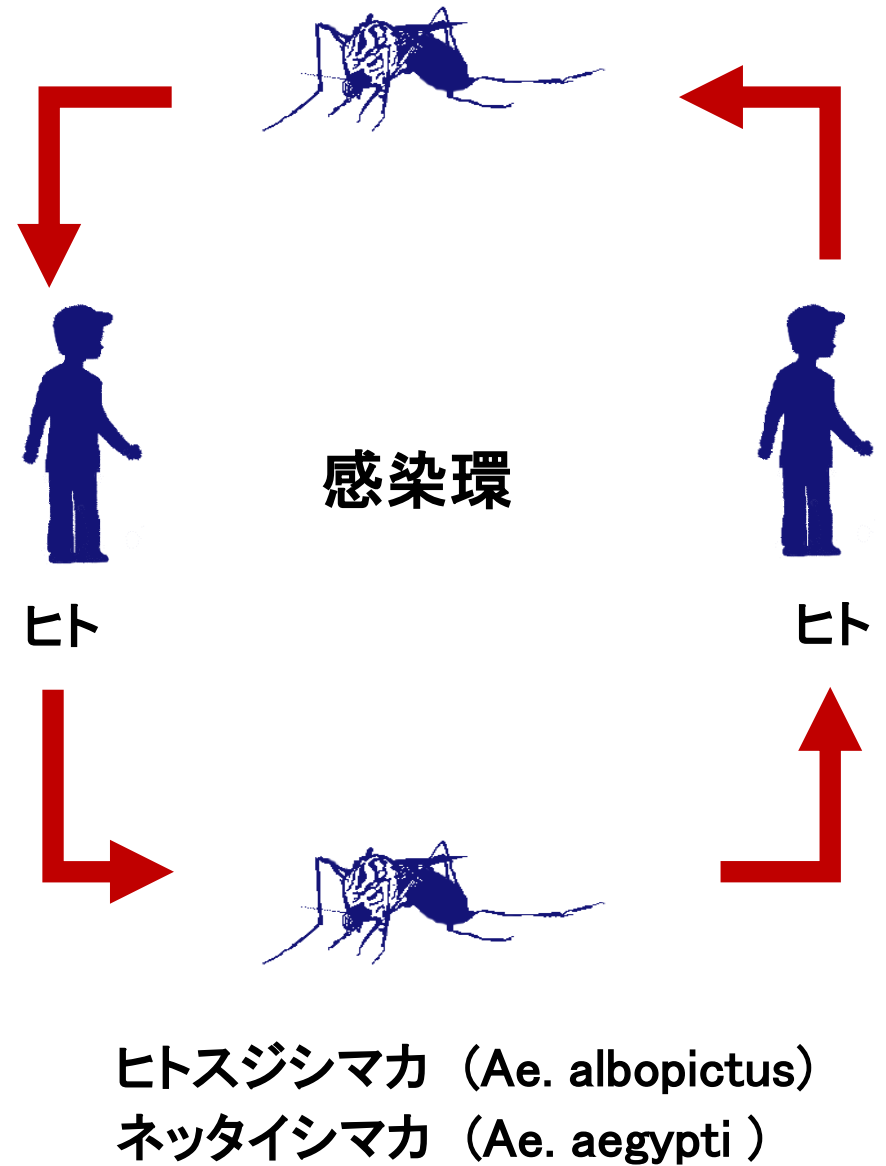
# デングウイルスの分布域



# デング熱

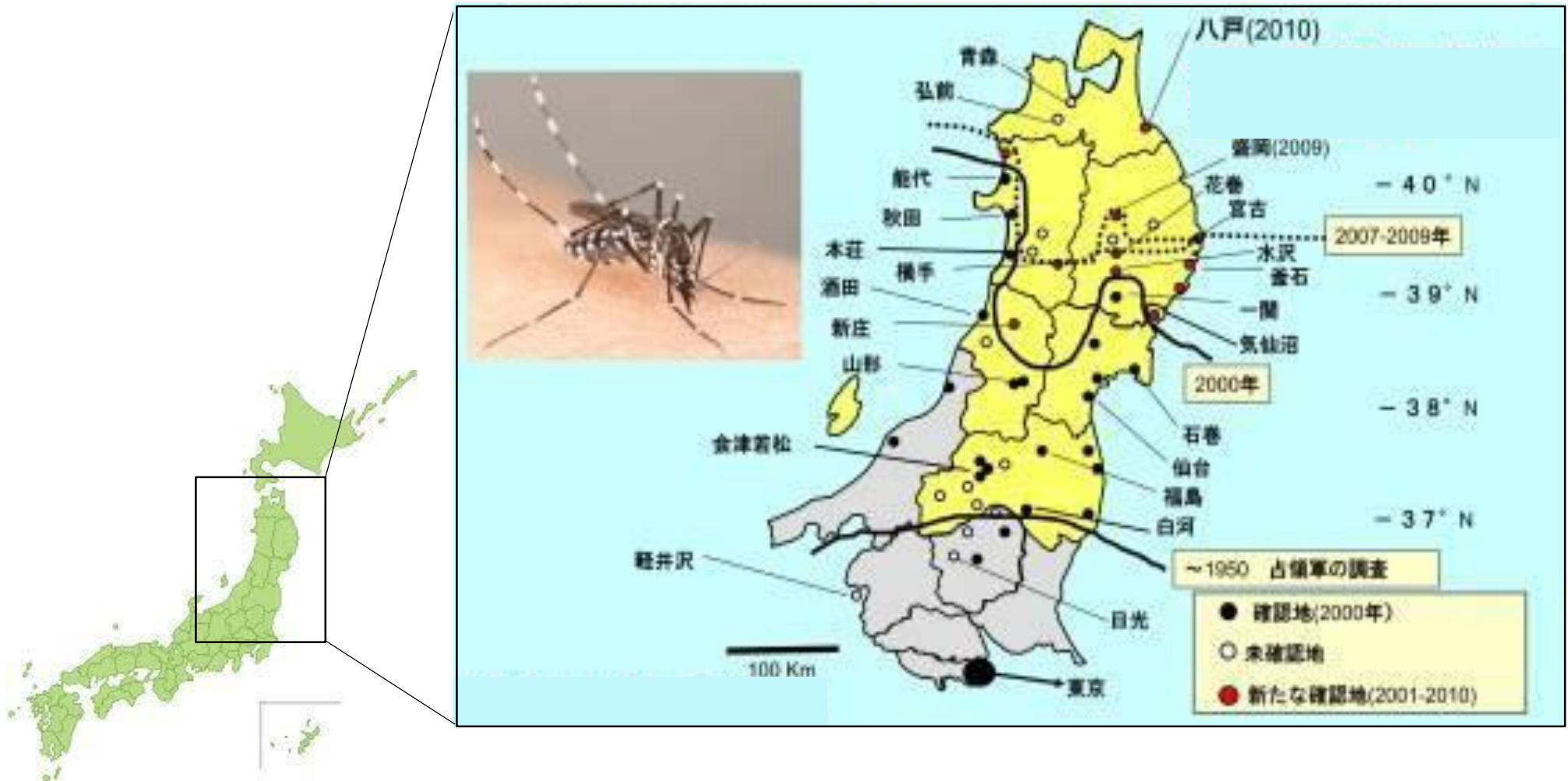
- デングウイルスによる蚊媒介性の急性熱性疾患である
- ヒトが感染しても無症候感染の頻度は50～80%で、症候性の場合の病態には軽症のデング熱と血管透過性亢進を伴うデング出血熱がある（WHOガイドライン1997年）
- WHOガイドライン(2009年)ではショック症状を伴うデング出血熱や重篤な出血、重篤な臓器障害を伴う場合を重症デングと呼称している
- 感染症法上では4類感染症

# デングウイルスの感染環



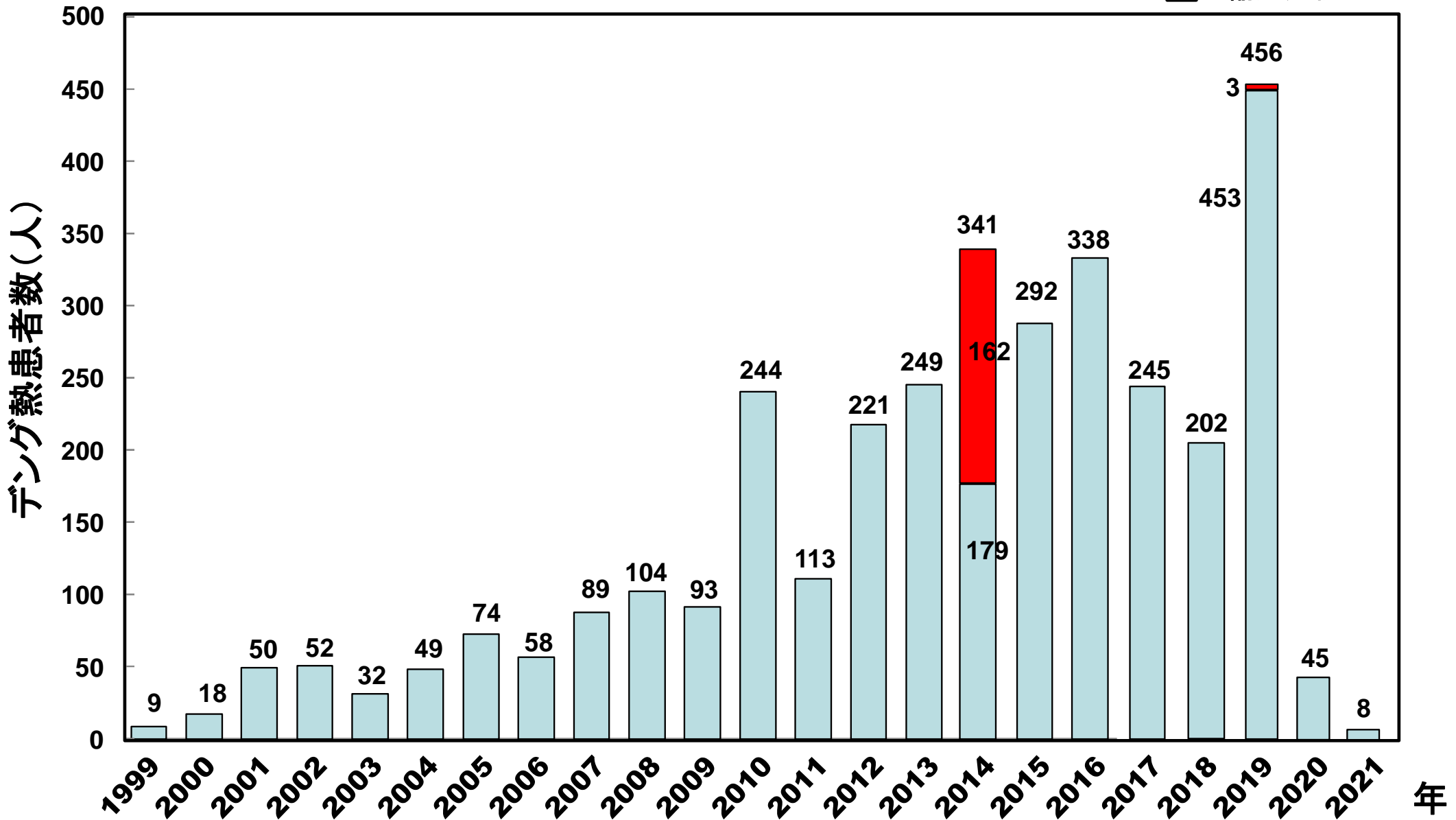


# 国内におけるヒトスジシマカの分布域の拡大

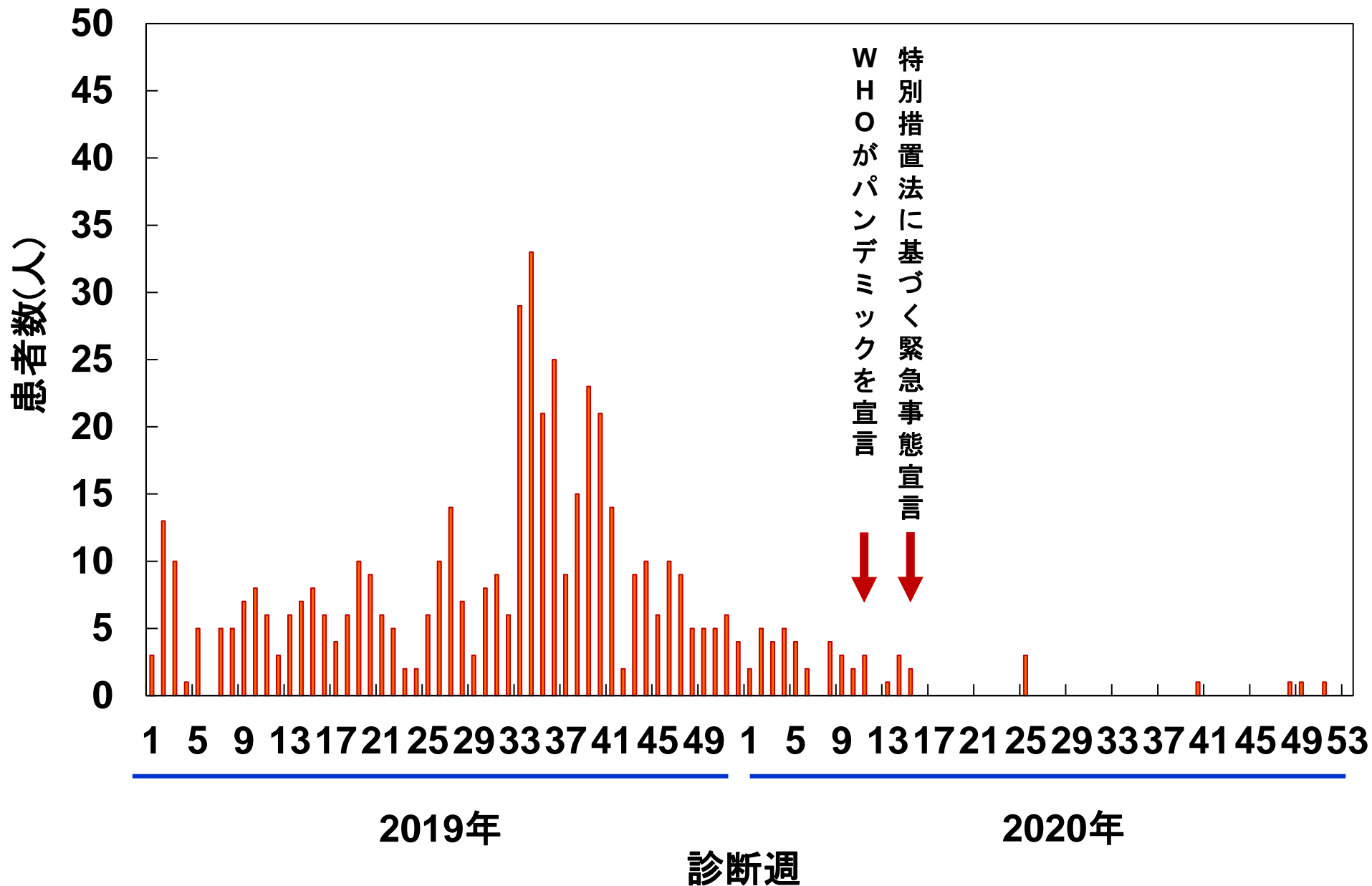


# 国内の1999年4月-2021年1におけるデング熱症例の推移

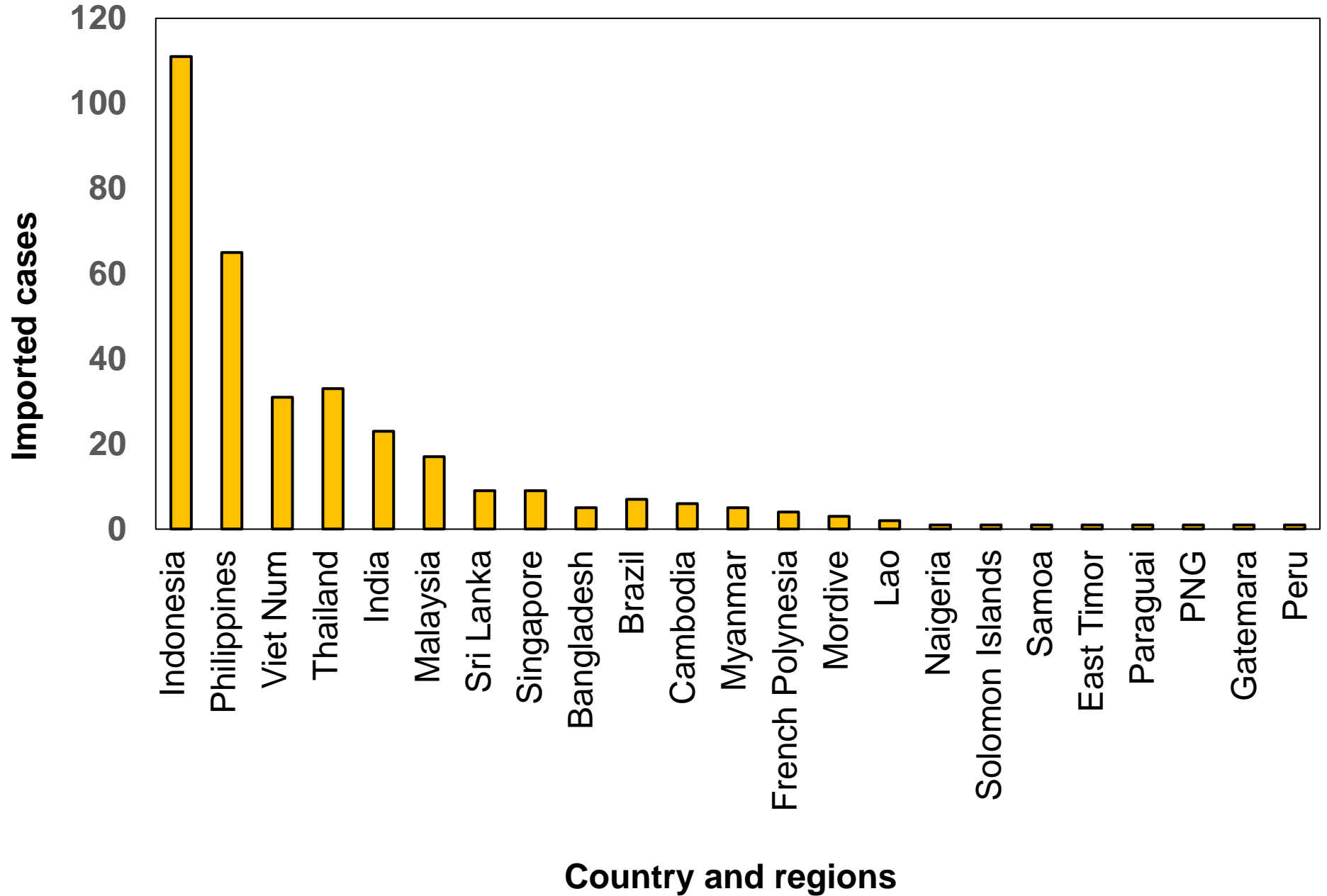
■ 国内発生例  
■ 輸入症例



# 2019年～2020年における診断週別デング熱症例数の推移(n=508)



# 2016年におけるデング熱輸入症例



# 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
- 2013年9月に国内で感染した可能性のあるドイツ人のデング熱症例が報告された
- 2014年8月に代々木公園およびその周辺という限られた地域で短期間にデングウイルス1型に起因する多数のデング熱症例の集積が認められた
- 2019年に5年ぶりに3例のデング熱国内発生が東京都で報告され、これら症例は、京都、奈良での感染の可能性が示唆された。
- インバウンドの減少によりデング熱患者数は減少したが、海外との交流の再開に伴う患者数の増加が考えられるため引き続き注視したい

# 日本脳炎ウイルス

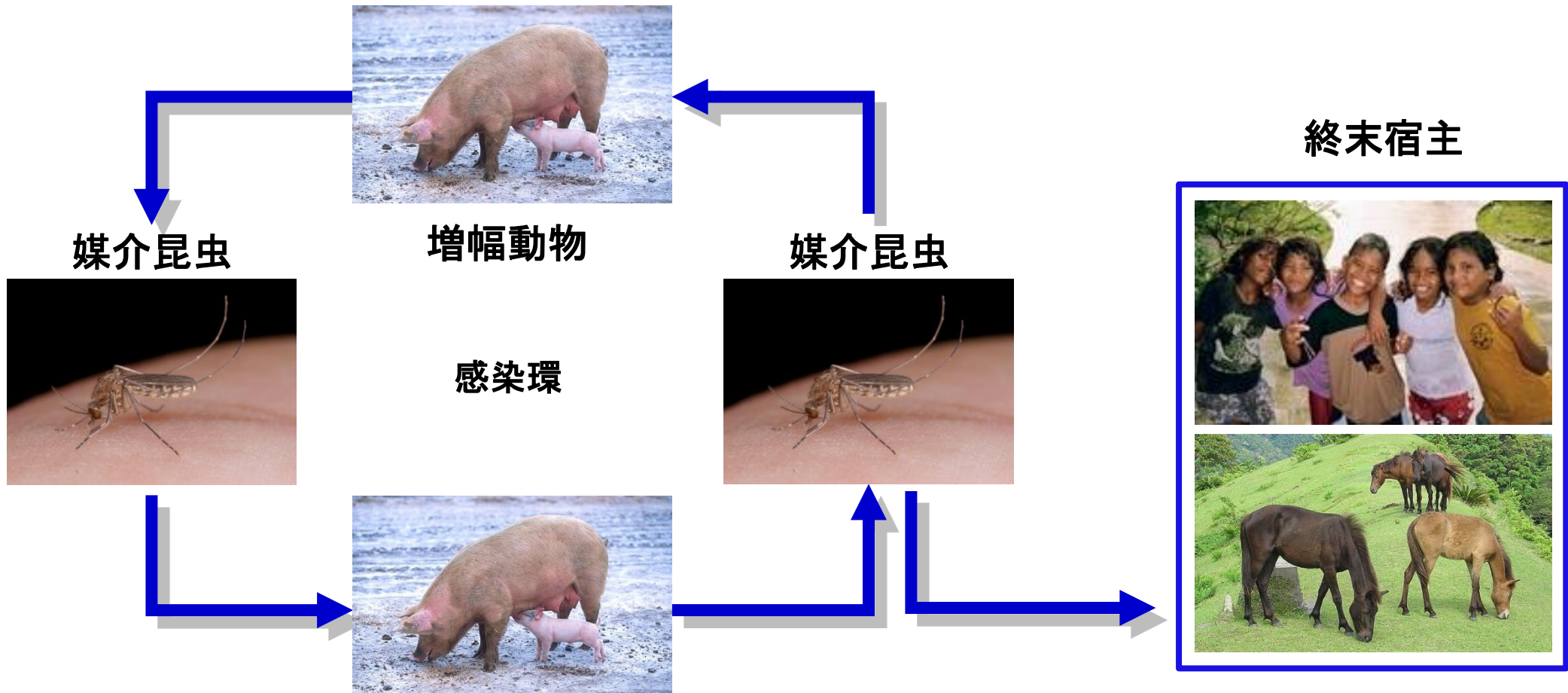
# 日本脳炎の分布

- 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年にオーストラリア南部にて日本脳炎患者が報告
- アジア以外の地域への日本脳炎ウイルスの広がりが見られるようになった



2012 WHO

# 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



# 国内における日本脳炎患者数の推移(1991年～2020年)

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	4	0	0
2005	7	0	0	2021	3	0	0
2006	8	1	1				

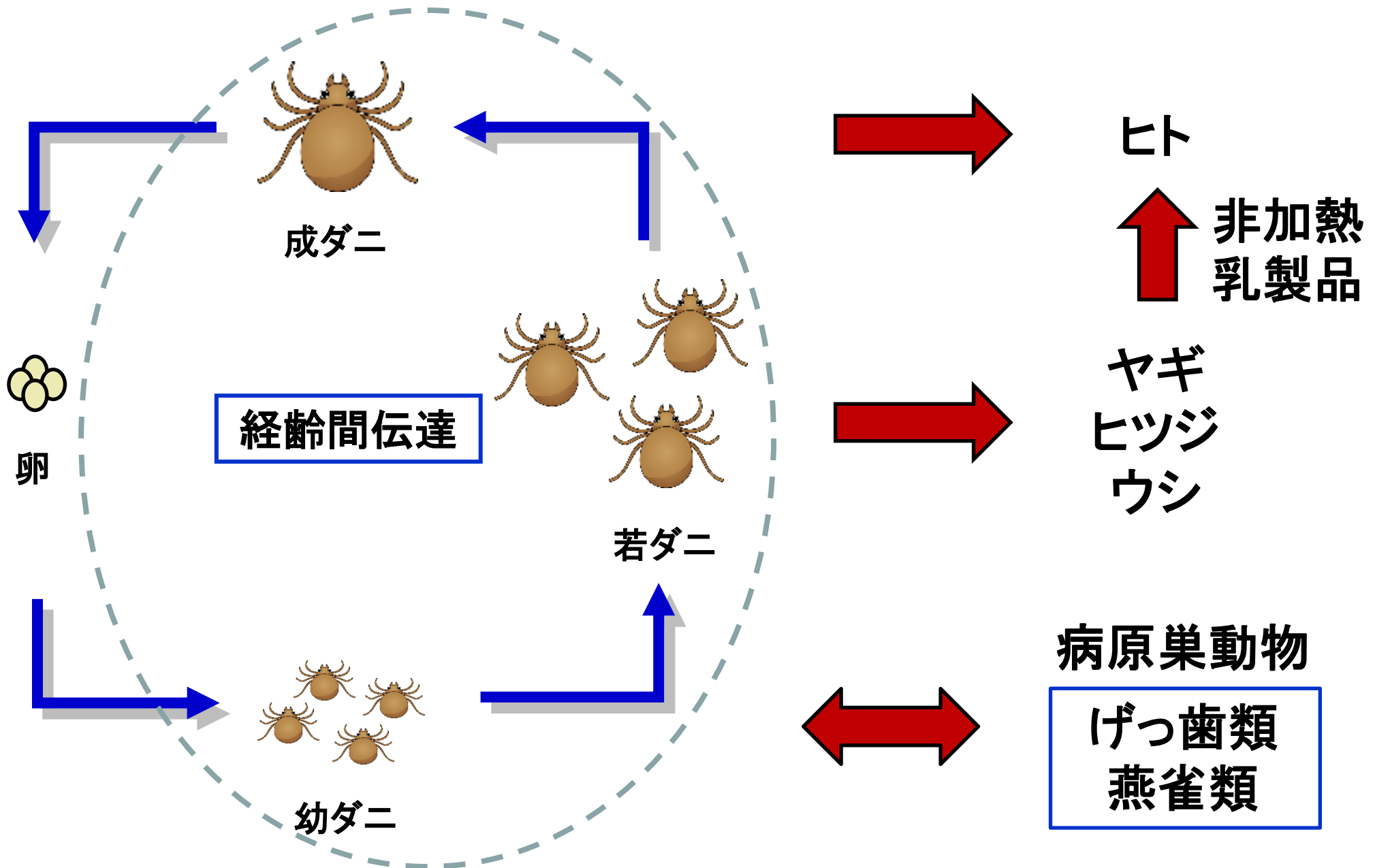
# WHO西太平洋地域における日本脳炎患者数の推移

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

# ダニ媒介脳炎

# ダニ媒介脳炎ウイルスの生態



## 国内におけるダニ脳炎症例

年代	性別	発症日	TBE中和抗体価	症状	推定感染地域
30's	女性	1993年10月	6病日：640倍, 43病日：2560倍	発熱、吐気、頭痛、髄膜刺激症 状、痙攣発作、意識障害	道南圏域
40's	男性	2016年7月中旬	3病日：<25倍, 10病日：3200倍	発熱、筋肉痛、関節痛、麻痺、 意識障害、痙攣、髄膜炎、 脳炎、 <b>死亡</b>	道内
70's	男性	2017年6月中旬	急性期血清（6/20）： 50倍， ペア血清（7/3）： 800倍	発熱、頭痛、意識障害、 脳炎、 <b>死亡</b>	道南圏域
70's	男性	2017年7月中旬	急性期血清（7/18）： 800倍， ペア血清（7/31）： 12800倍	発熱、頭痛、意識障害、脳炎	道央圏域
40's	女性	2018年5月下旬	-	発熱、意識障害、髄膜炎、脳炎	道北圏域

## まとめ

- 今後も適宜、遺伝子検査用陽性対照の配布および中和検査用ウイルスの分与を実施する
- 世界的に流行が継続しているデングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルスの流行状況を注視する
- 国内で流行が継続している日本脳炎、ダニ媒介脳炎の流行状況を注視する
- アルボウイルス感染症レファレンスセンターを中心にアルボウイルス感染症の検査体制を維持・強化する

# 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41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リケッチアレファレンスセンターとオンラインにて2021年7月に共同開催し情報共有を実施した
- ContAmplicon挿入陽性コントロール、プローブについて紹介した
- まずは全国のアルボウイルスレファレンスセンターに配布し各センターにおいて検討することにした

## 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

## 議題

- アルボウイルス感染症の流行状況について
- デングウイルス診断用プライマーとデングウイルス3型  
プライマーの改良について
- デングウイルス診断用プライマーの配布方法について