

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
関連会議資料

2021年7月9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
2021年7月9日

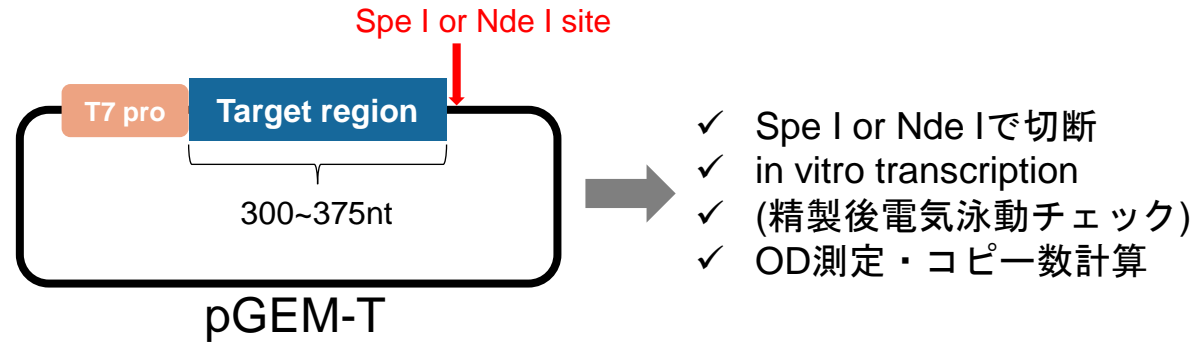
目的

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。

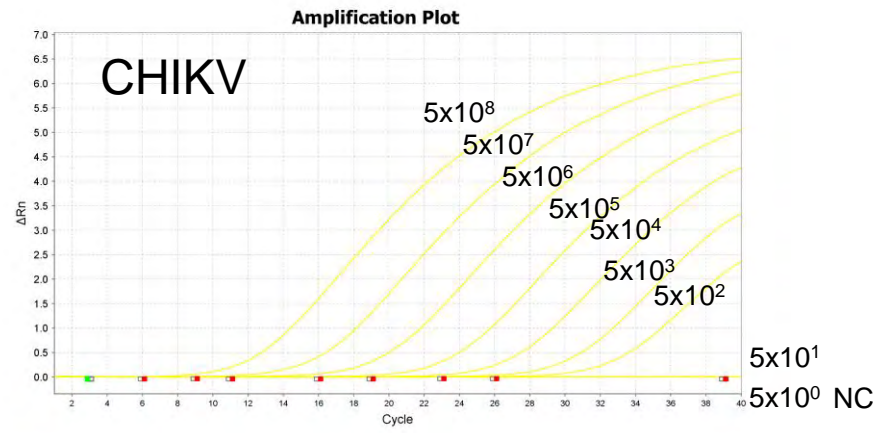
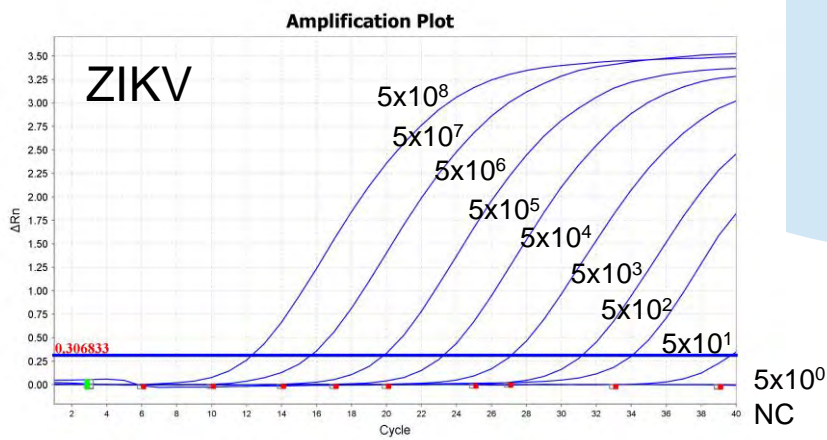
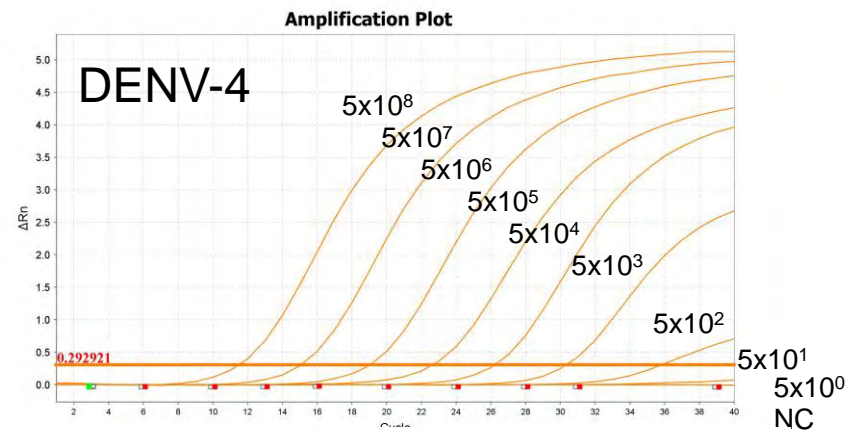
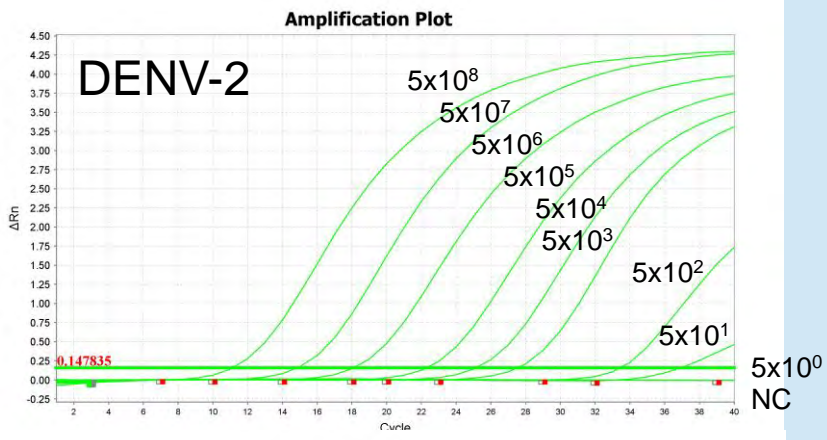
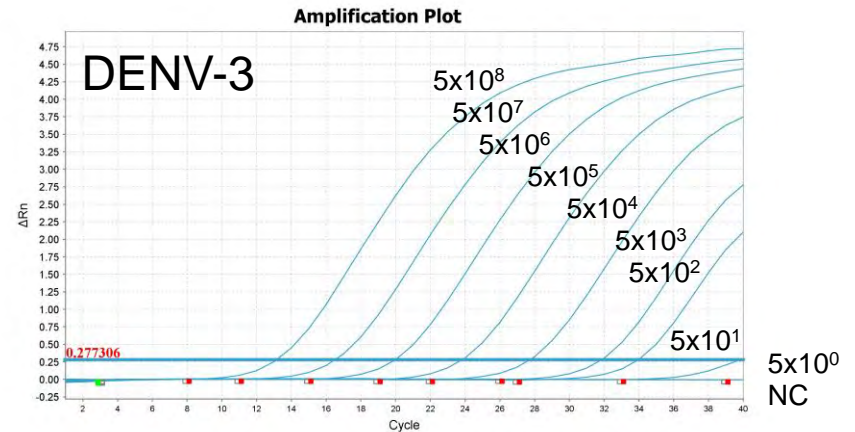
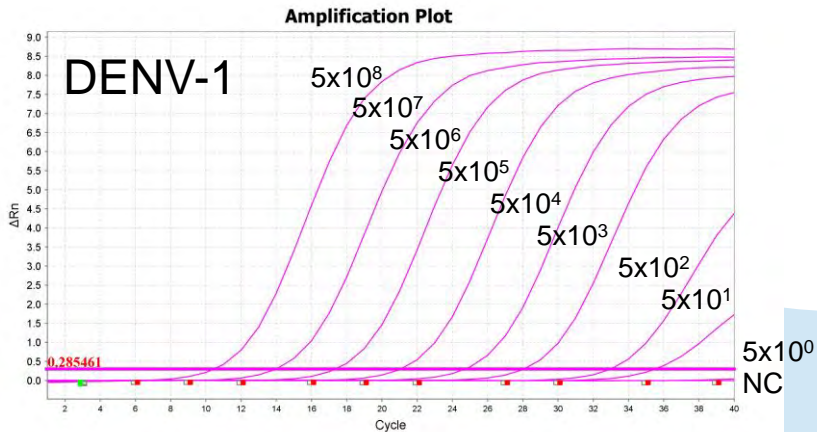
しかしこれらは、ウイルスゲノムの検体中のコピー数算出には使用できない。さらに、反応系や臨床検体への陽性コントロールのコンタミネーションの可能性を判断することも困難である。

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。

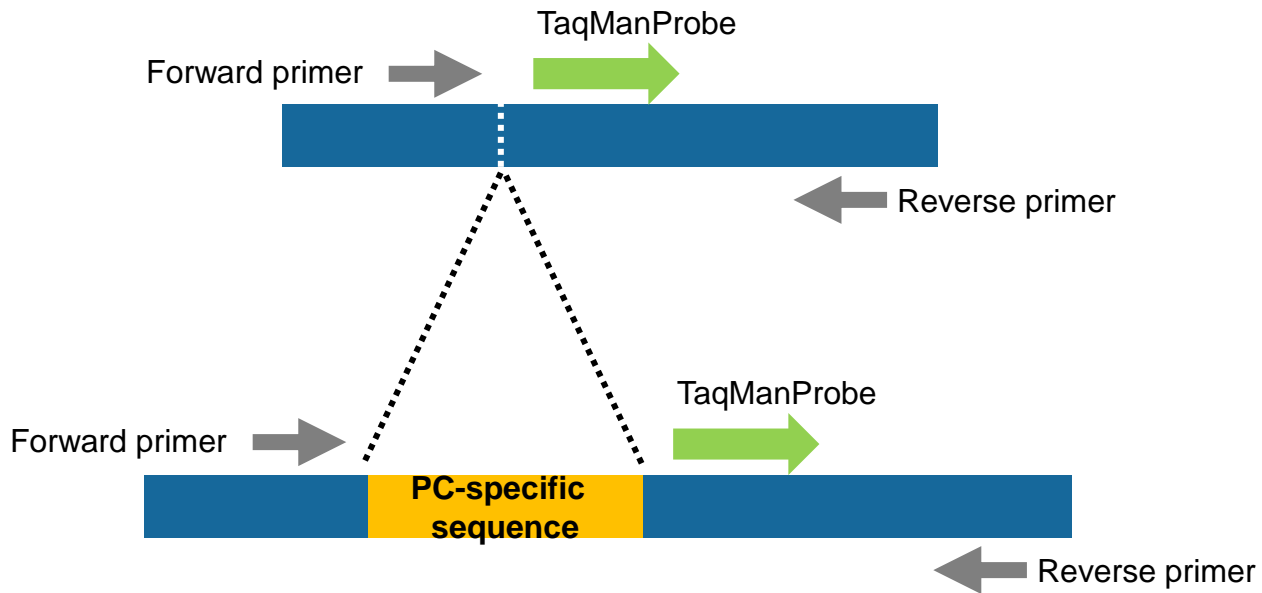
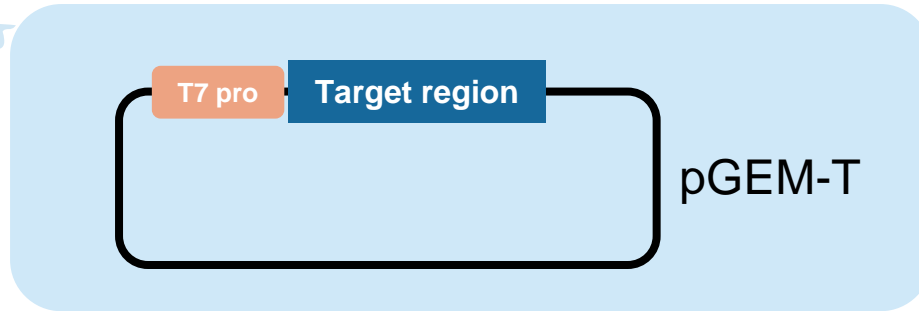
リアルタイムプライマー標的領域のクローニングとRNA合成



Primers used for cloning	Sequence (5-3)	Virus strain
FLA0035 DENV1-02-20-1200Fw	AAA AGG AAG CCT TAT AAC GT	DENV-1: NIID02-20 (AB178040)
FLA0036 DENV1-02-20-1500Rv	TGG ACT AGC CAT GAT TTT TC	DENV-2: D2/Hu/OPD030NIID (LC111438)
FLA0037 DENV2-16-42-1300Fw	AAG GAA AAA TCG TGC AAC CA	DENV-3: CH53489 (DQ863638)
FLA0038 DENV2-16-42-1600Rv	TGT CTG CTC CGG GCA GCC AT	DENV-4: TVP/360 (KU513442)
FLA0039 DENV3-14-59-700Fw	TGG CGT TAG CTC CTC ATG TT	CHIKV: SL10571 (AB455494)
FLA0040 DENV3-14-59-1000Rv	GTT CGA GCA CCA CGT CAA CC	ZIKV: SPH2016(KU321639), PRVABC59 (KU501215)
FLA0041 DENV4-15-98-1000Fw	CTT CAA TGA GAT GAT CCT GA	
FLA0042 DENV4-15-98-1300Rv	AAT TTC TCC ATA CGG ACT TT	
CHIKV_10801f	AAC TGC GCC GTA GGG AAC AT	
CHIKV_11100r	GAC TTG TAC GCG GAA TTC G	
ZKV(PRV).914f	AGC TCA ACG AGC CAA AAA GTC	
ZKV(PRV).1289r	ATC CAT TTC CCC AGC CTC TGT	
pGEM-T-T7	ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA	
pGEM-T-SP6	AGG TGA CAC TAT AGA ATA CTC	



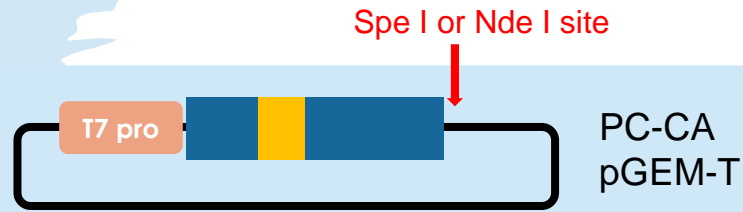
陽性コントロール特異的配列の挿入



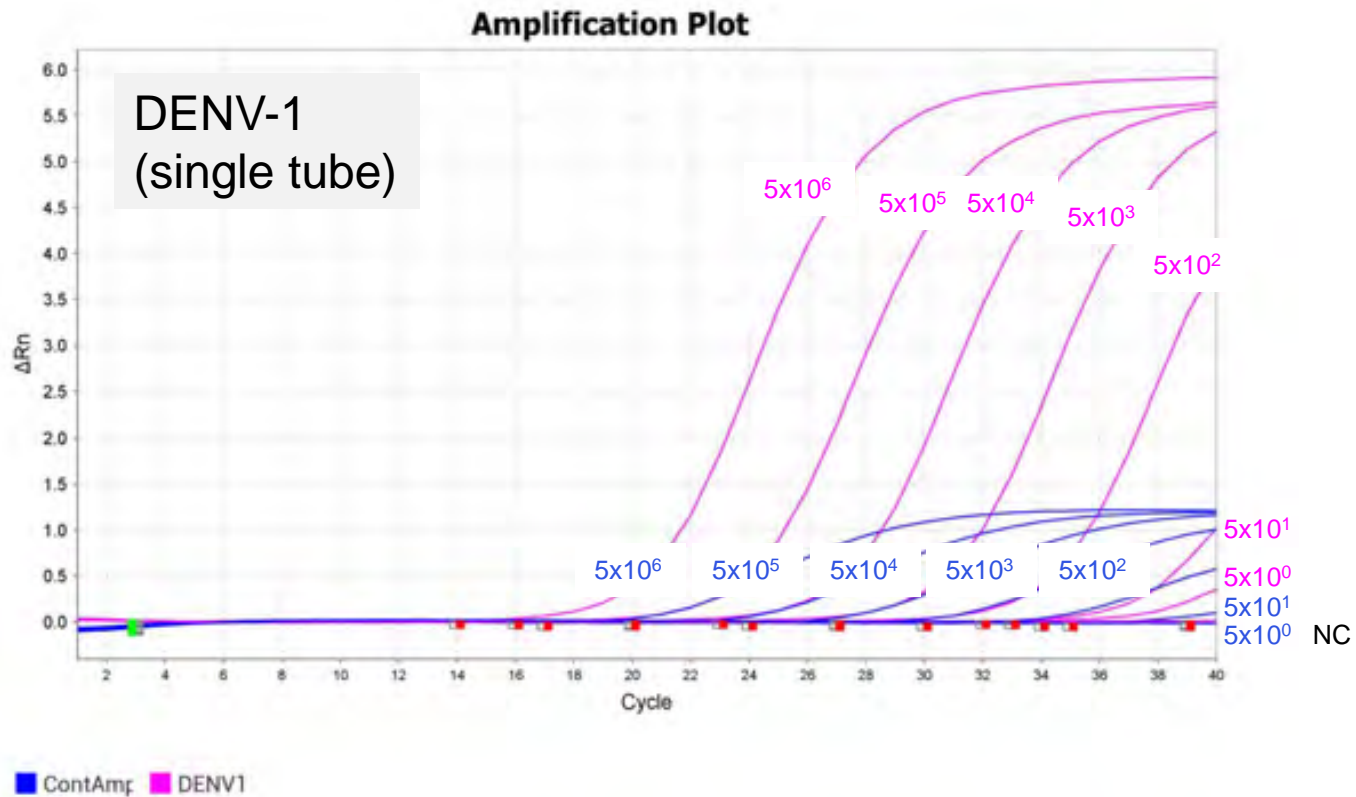
PC-specific sequence (PCSS): VIC(H₂EX)-AGC TAG CGC ATT GGA TCT CG-MGB

Contamplicon (CA): VIC(or H₂EX)-AGT AGC TTG CTC TTT CAT CTG TTA CG-none(or BHQ1)

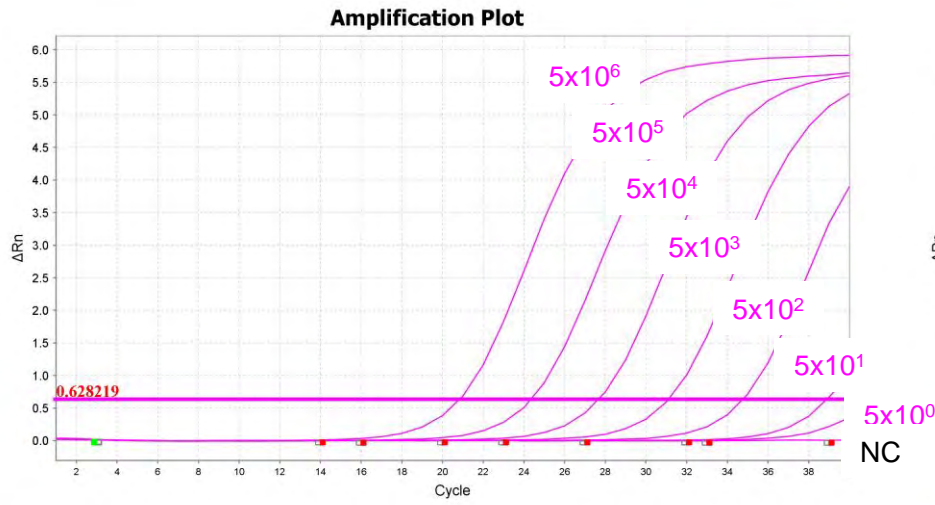
ContAmplicon挿入陽性コントロールの検討



- ✓ Spe I or Nde Iで切断
- ✓ in vitro transcription
- ✓ (精製後電気泳動チェック)
- ✓ OD測定・コピー数計算

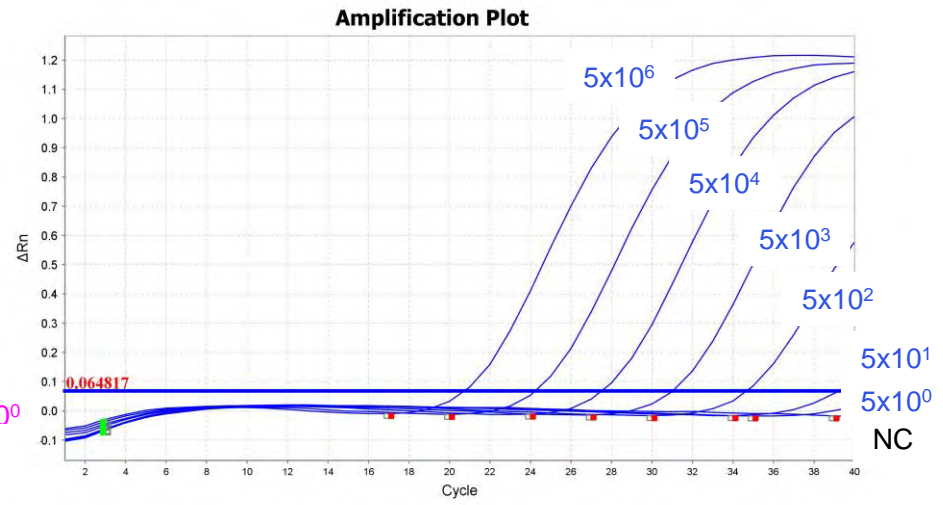


DENV-1 probe

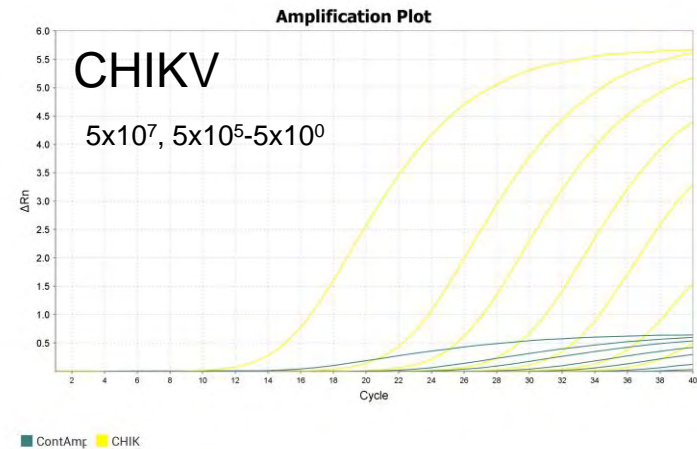
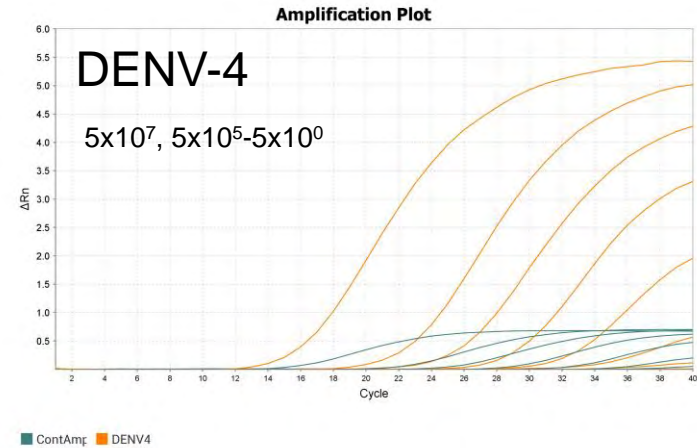
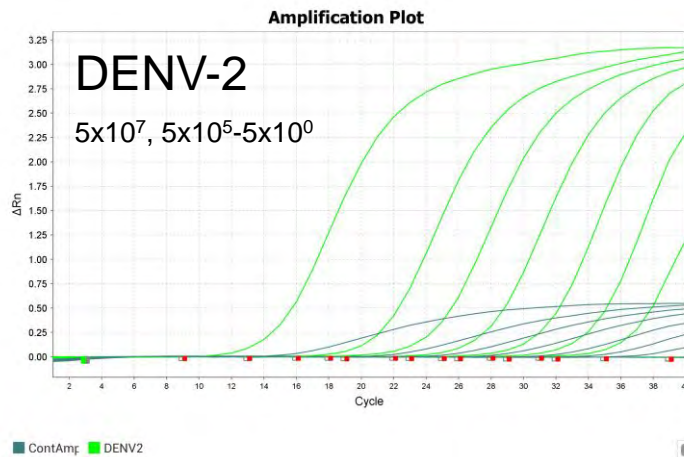
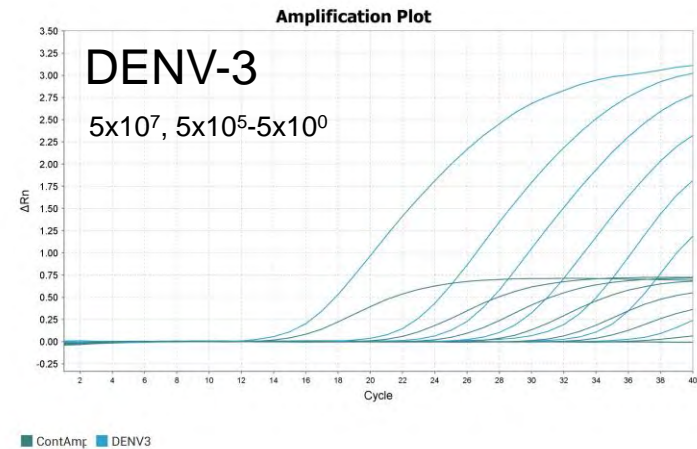
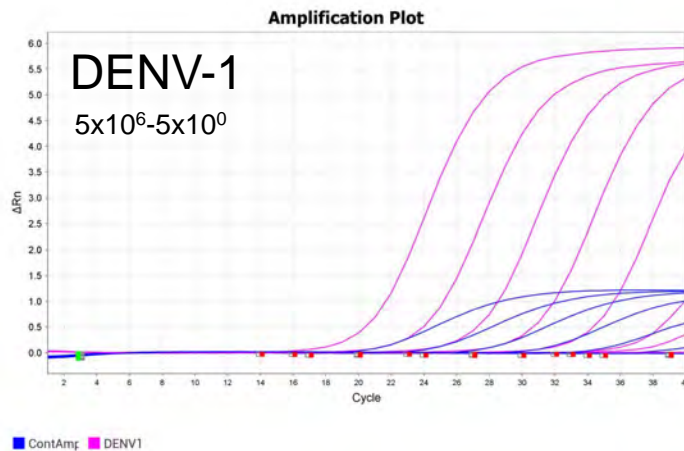


■ DENV1

ContAmplicon probe



■ ContAmp

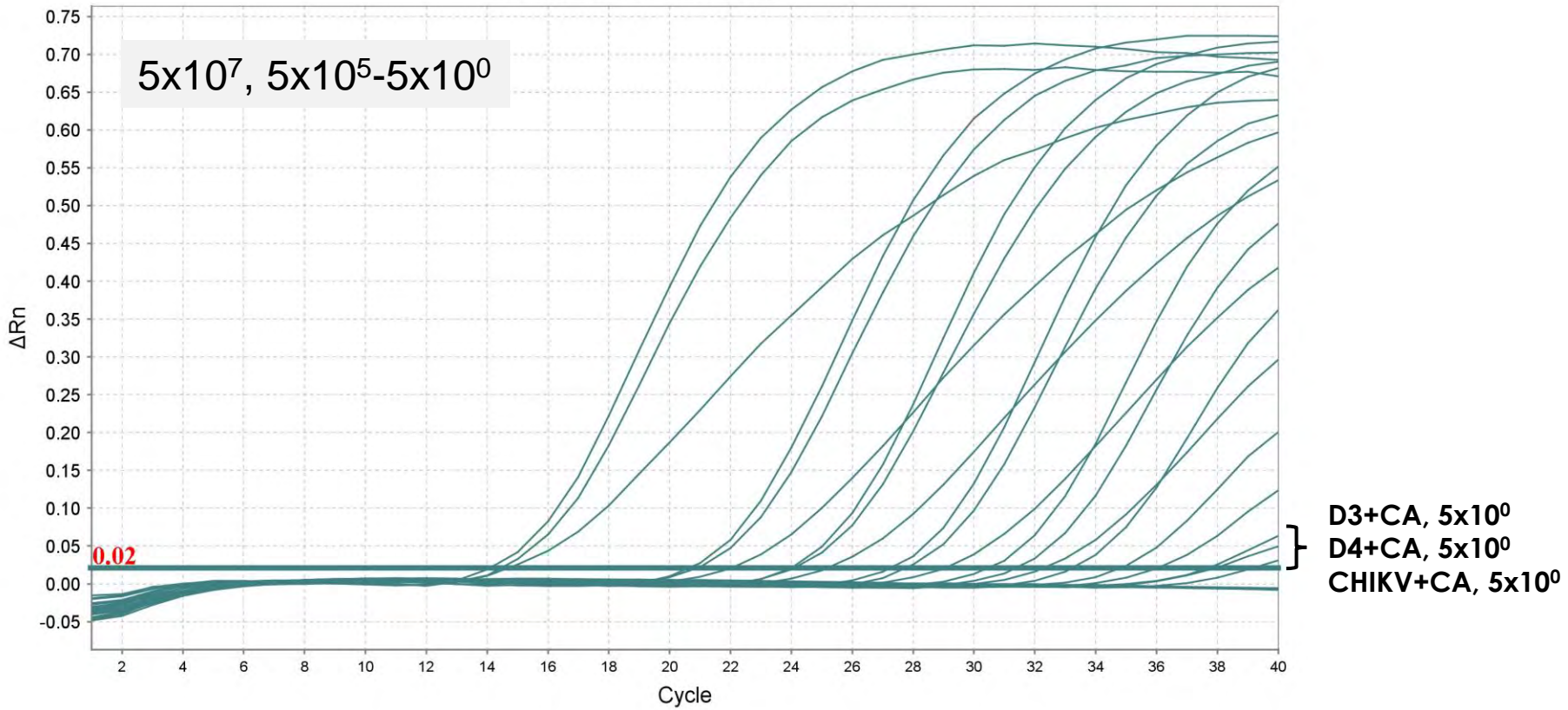


D2, D3, D4, CHIKV
 についても作製

ZIKVはDNA組換え実験が
 大臣確認実験であったため、
 今回保留

D3+CA, D4+CA, CHIKV+CA

Amplification Plot



■ ContAmp

ContAmplicon_DCZ Realtime RT-PCRの反応系

(FV1step DCZ-CA)

TaqMan mix prep.	Duplex(V-CA)		
	x1	Mixture	
DW	7.2	x10 72.0	
4x Master Mix (Thermo Fisher: Fast Virus 1-step kit)	5.0	50.0	
Primer FR mix (5pmol 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		

	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

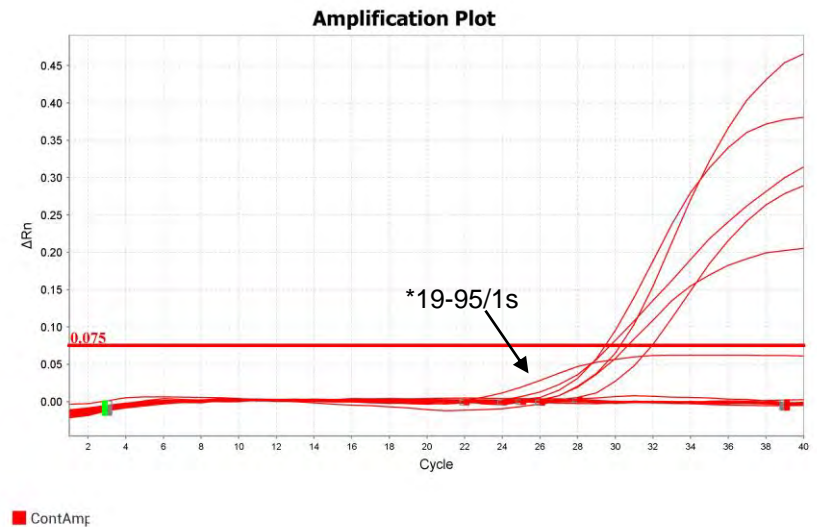
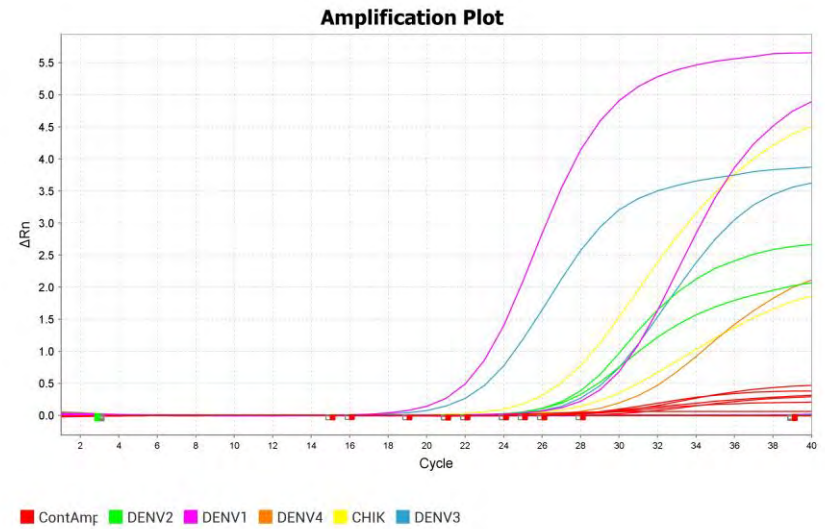
(fast)

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: 2.5×10^3 copies/uL
- ✓ CHIKV PC+CA: 10^4 copies/uL

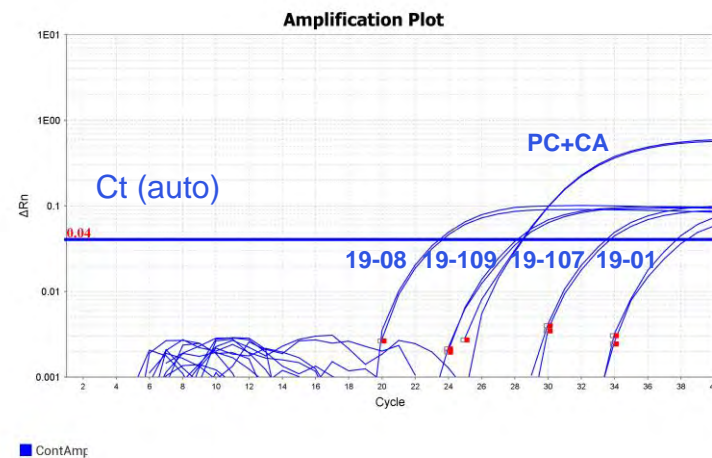
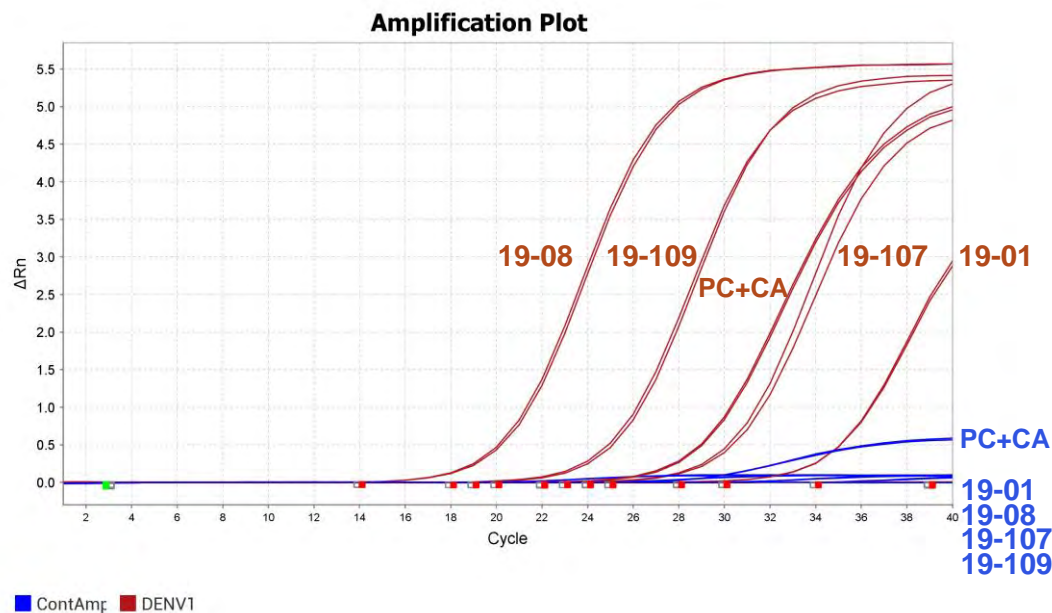
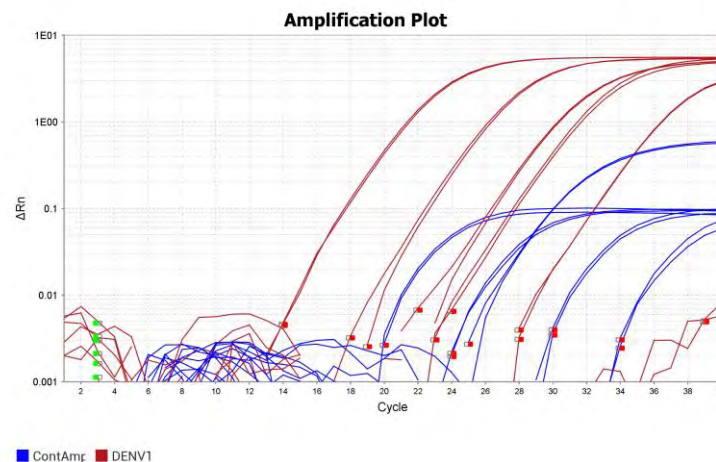


臨床検体を使用した検討 (DENV1-positive samples, duplicate)

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

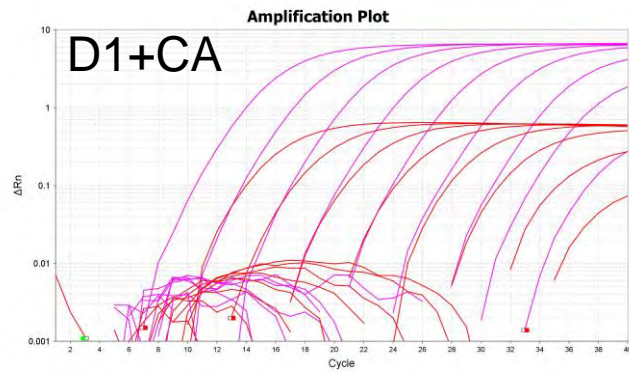


デングウイルス1型ゲノムと少し反応してしまうが、増幅パターンで判別可能。

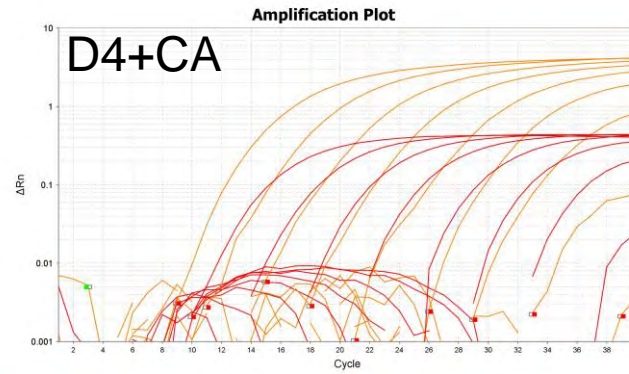
ContAmplicon挿入陽性コントロール、プローブについて

- ✓ 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。
- ✓ 今回配布予定のプローブはSigma-Aldrich (色素 : HEX-BHQ1)で合成したもののですが、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。

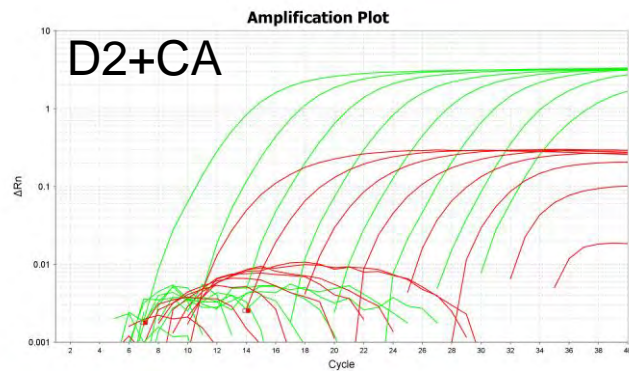
実際に送付する陽性コントロールおよびCAプローブのチェックデータ ($5 \times 10^8 - 5 \times 10^0$ copies/rxn)



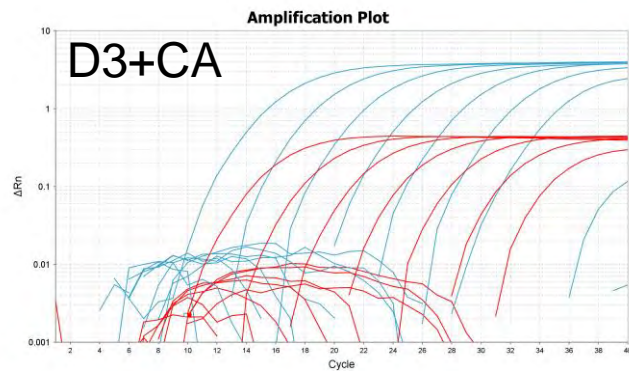
■ ContAmr ■ DENV1



■ ContAmr ■ DENV4



■ ContAmr ■ DENV2



■ ContAmr ■ DENV3

Posi. Contrl*.	Ct値** (5×10^2 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、 1×10^3 copies/uL程度に希釈して使用

アルボウイルスレファレンスセンター等関連会議

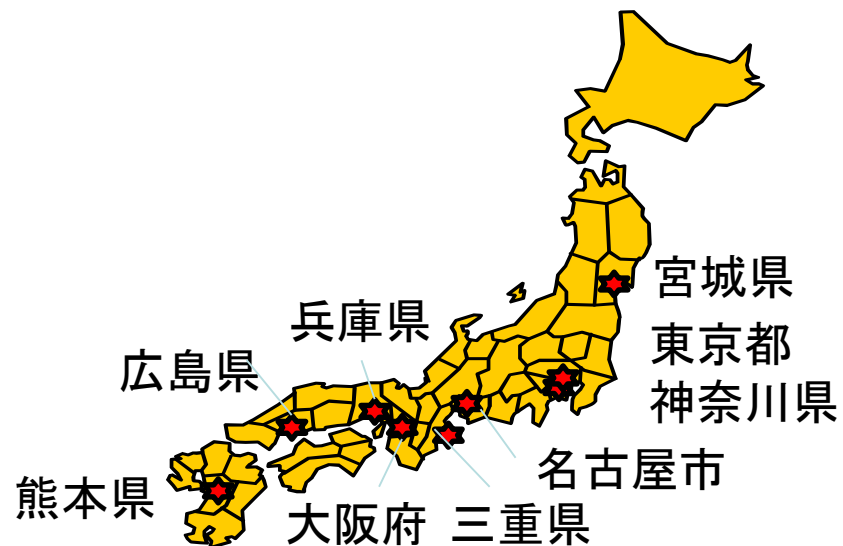
近年のアルボウイルス感染症の流行状況

2021年7月9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

遺伝子検査用陽性対照の配布（2020年度）

分与先

宮城県保健環境センター

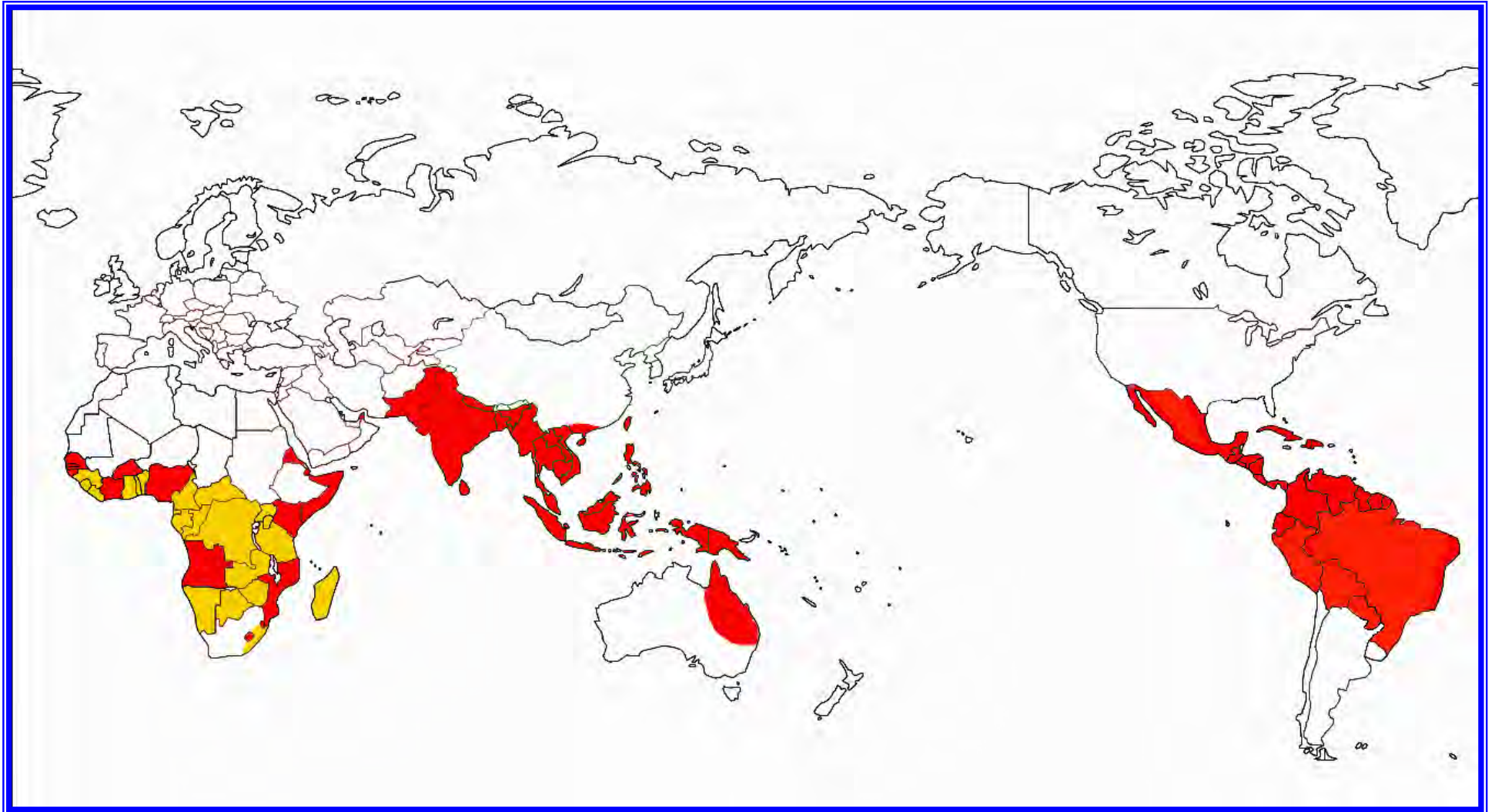
宮崎大学

横須賀市健康安全科学センター

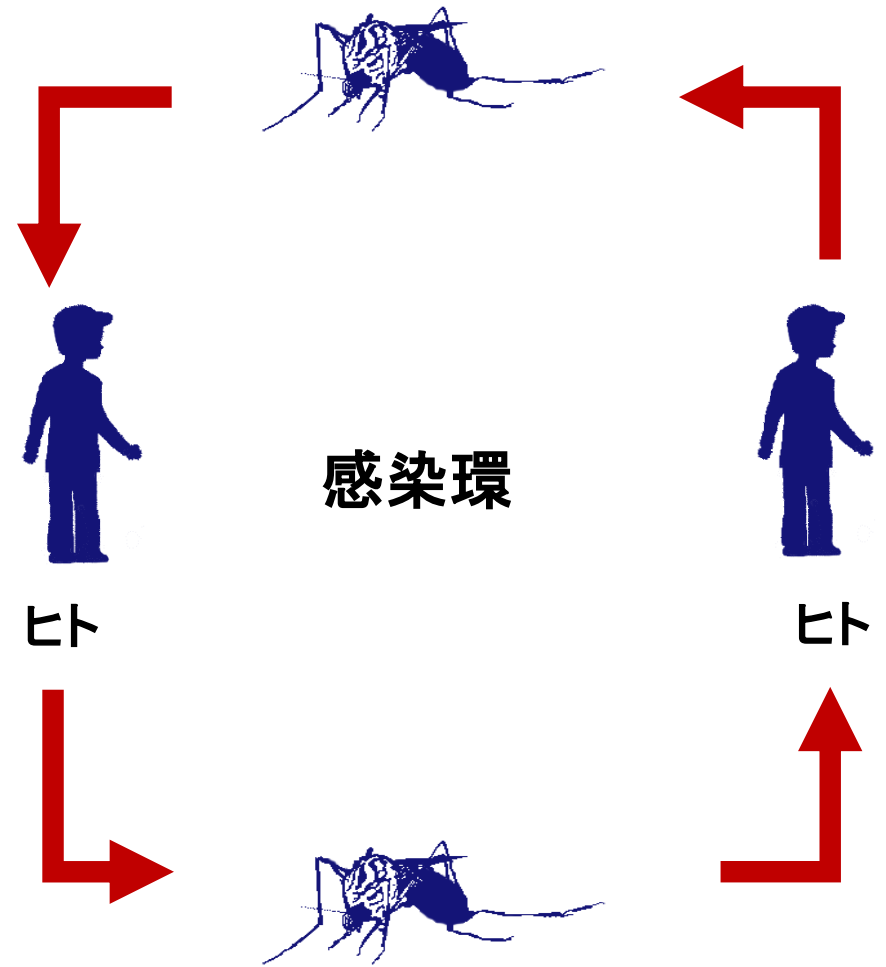
愛知県衛生研究所

デングウイルス

デングウイルスの分布域



デングウイルスの感染環



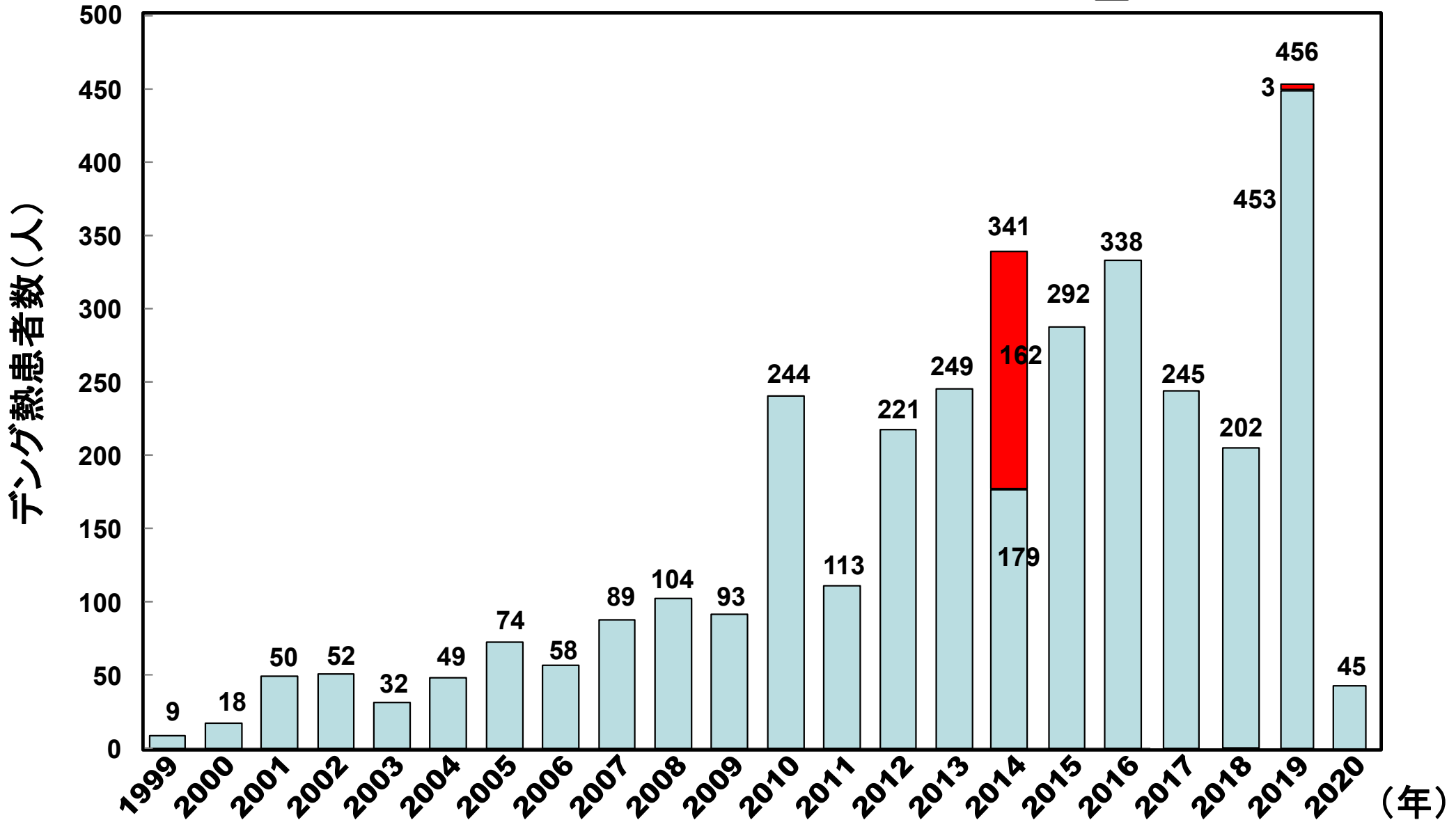
ヒト

ヒト

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

国内の1999-2020年におけるデング熱症例の推移

■ 国内発生例
■ 輸入症例



チクングニアウイルス

CHIKウイルスの感染環

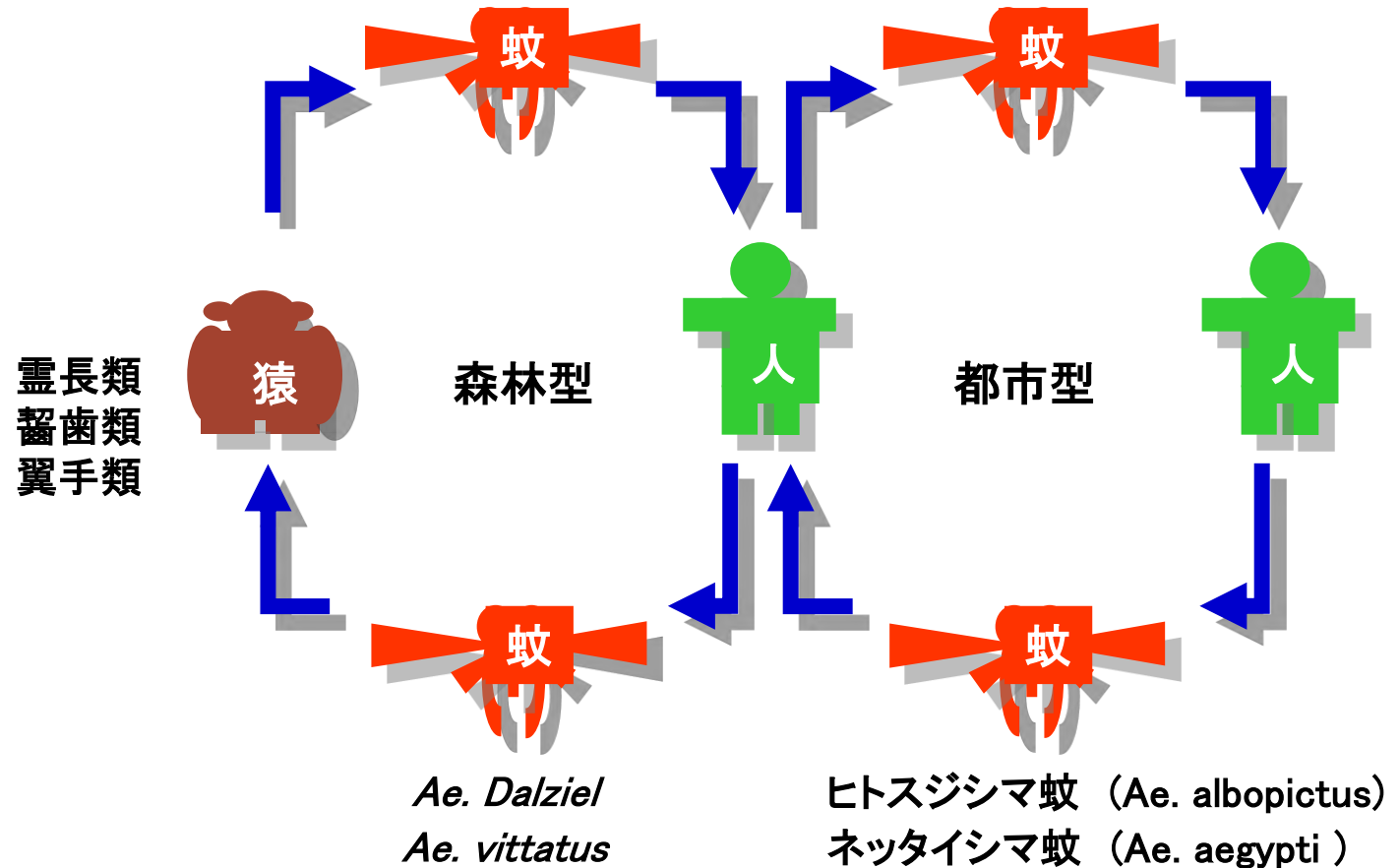
主な媒介蚊



ネッタイシマ蚊
(*Aedes aegypti*)

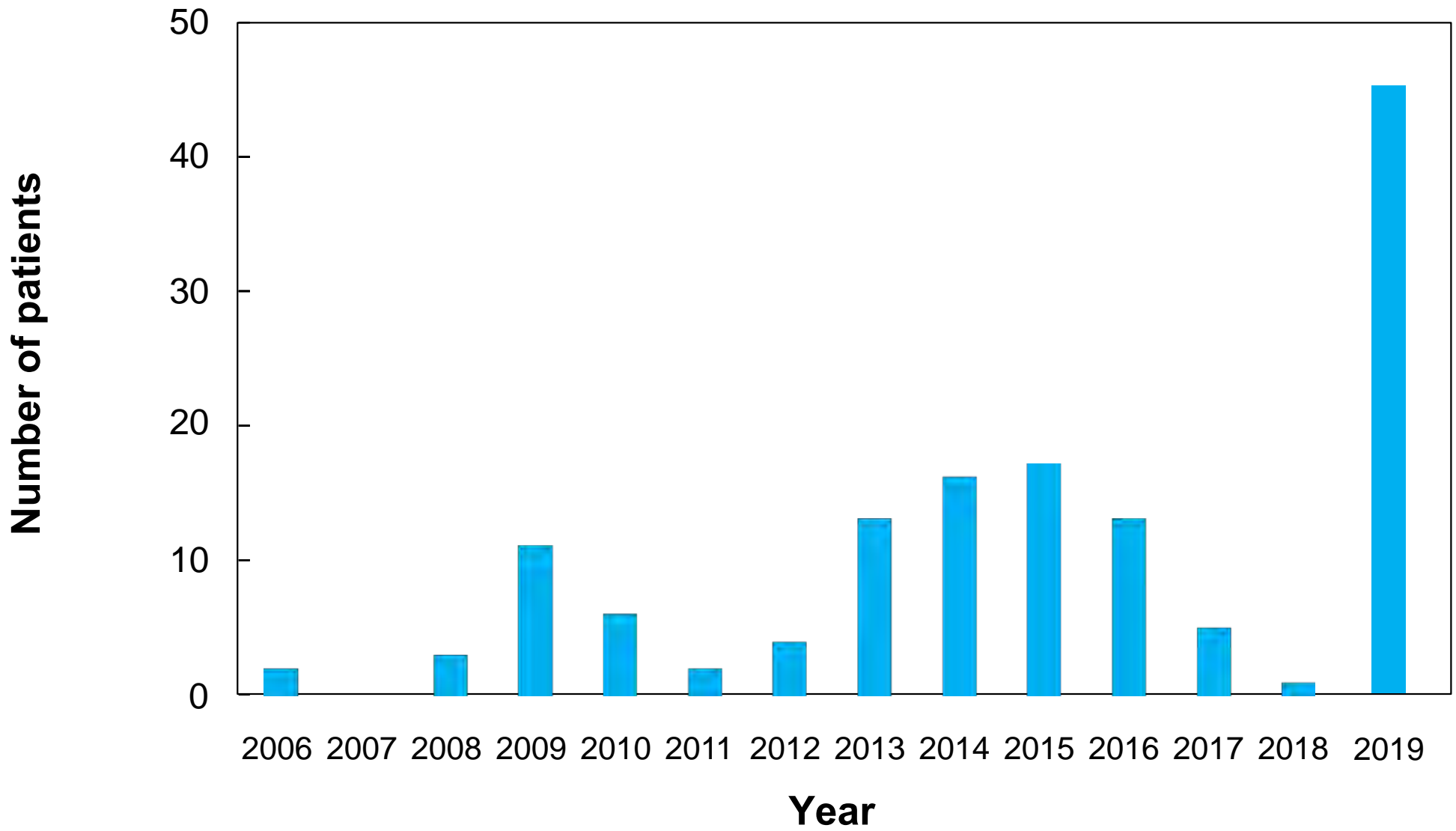


ヒトスジシマ蚊
(*Aedes albopictus*)

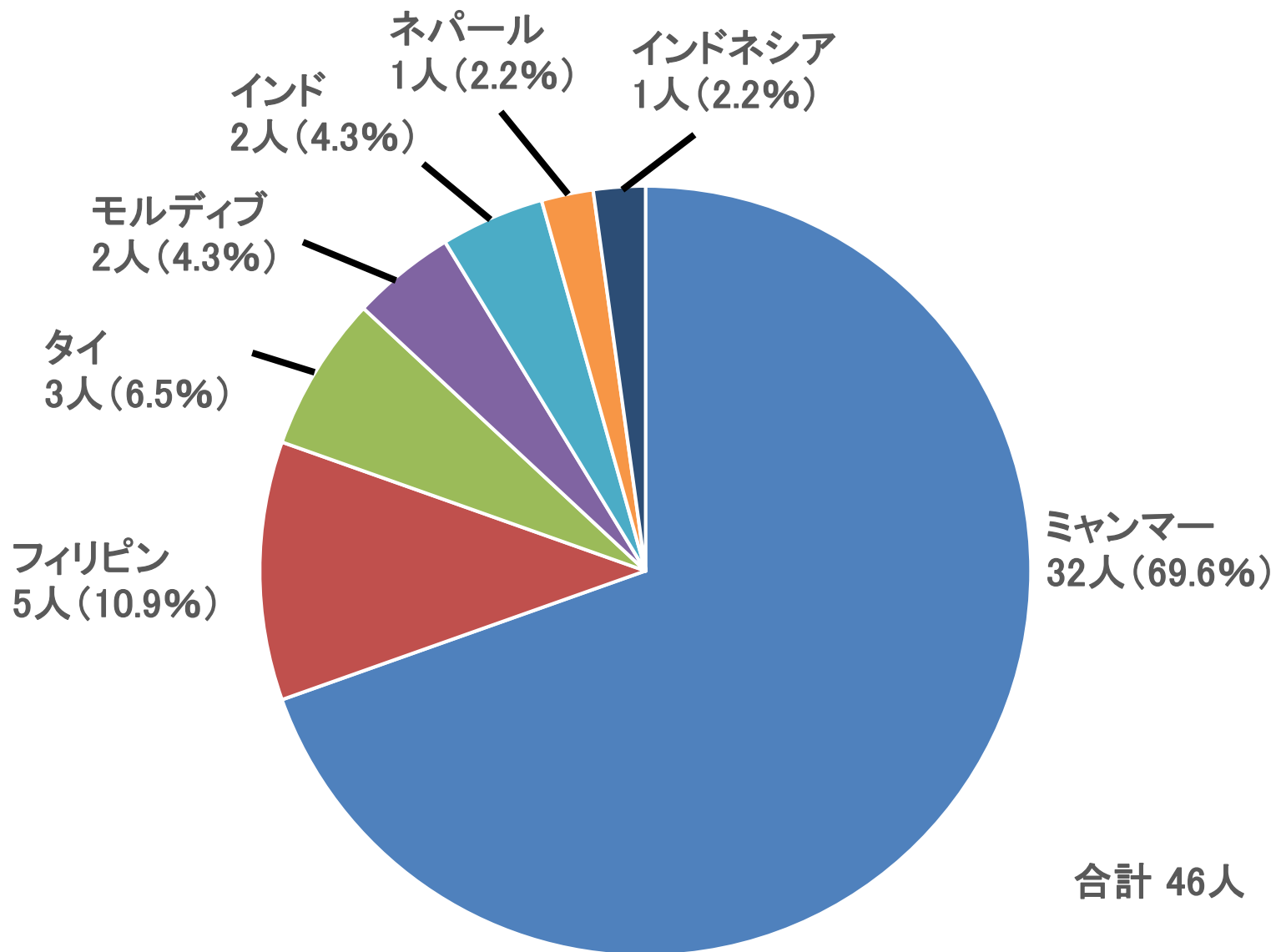


- 急性期のヒトにおけるウイルス血症は非常に高く、吸血した蚊がチクングニアウイルスに感染する可能性は極めて高い。
- したがって日本を含む温帯地域においても輸入症例からチクングニア熱が流行する可能性がある。

2006-2019年におけるチクングニア熱輸入症例の推移

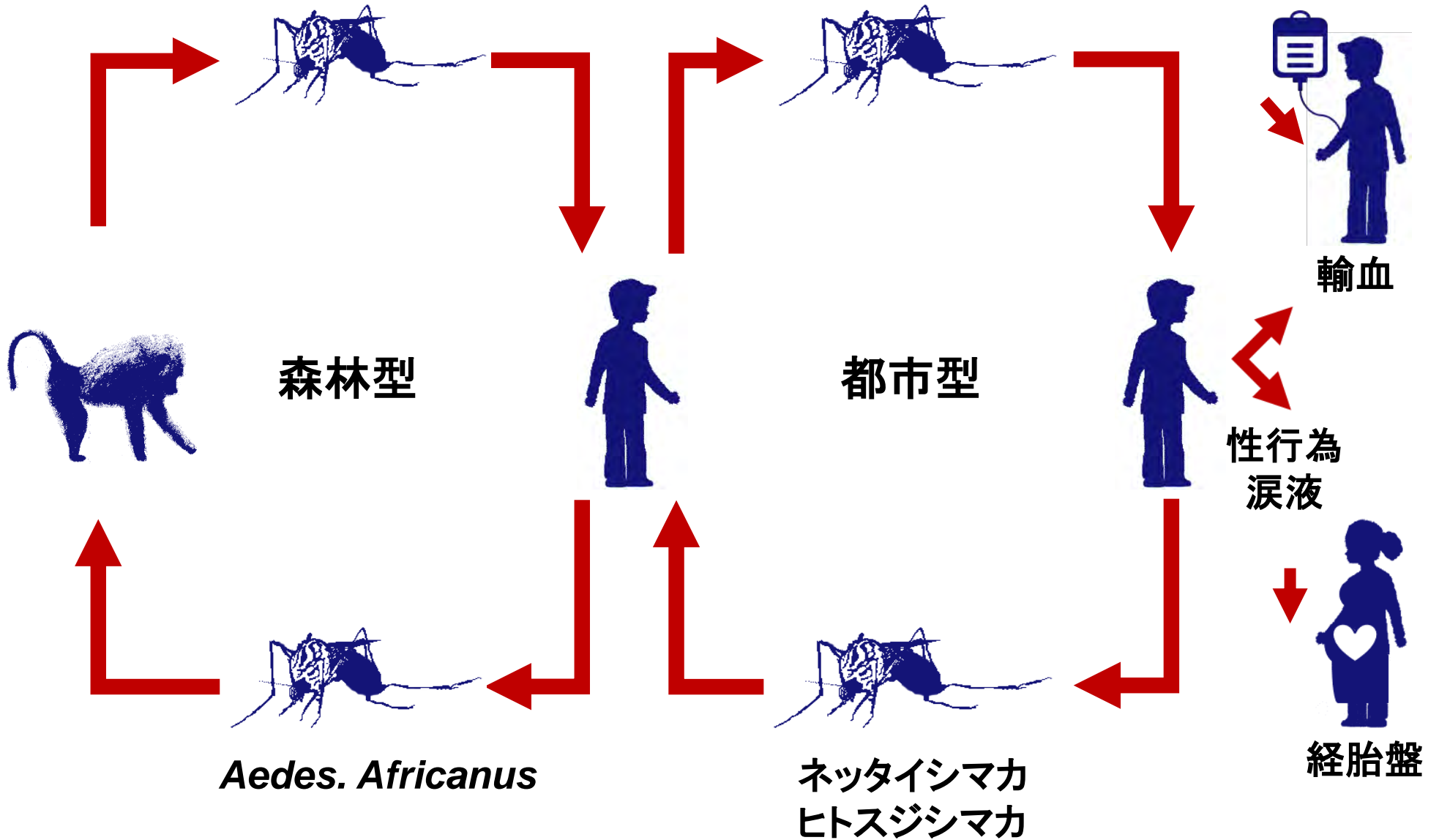


2019年度におけるチクングニア熱輸入症例の推定感染地域



ジカウイルス

ジカウイルスの感染環

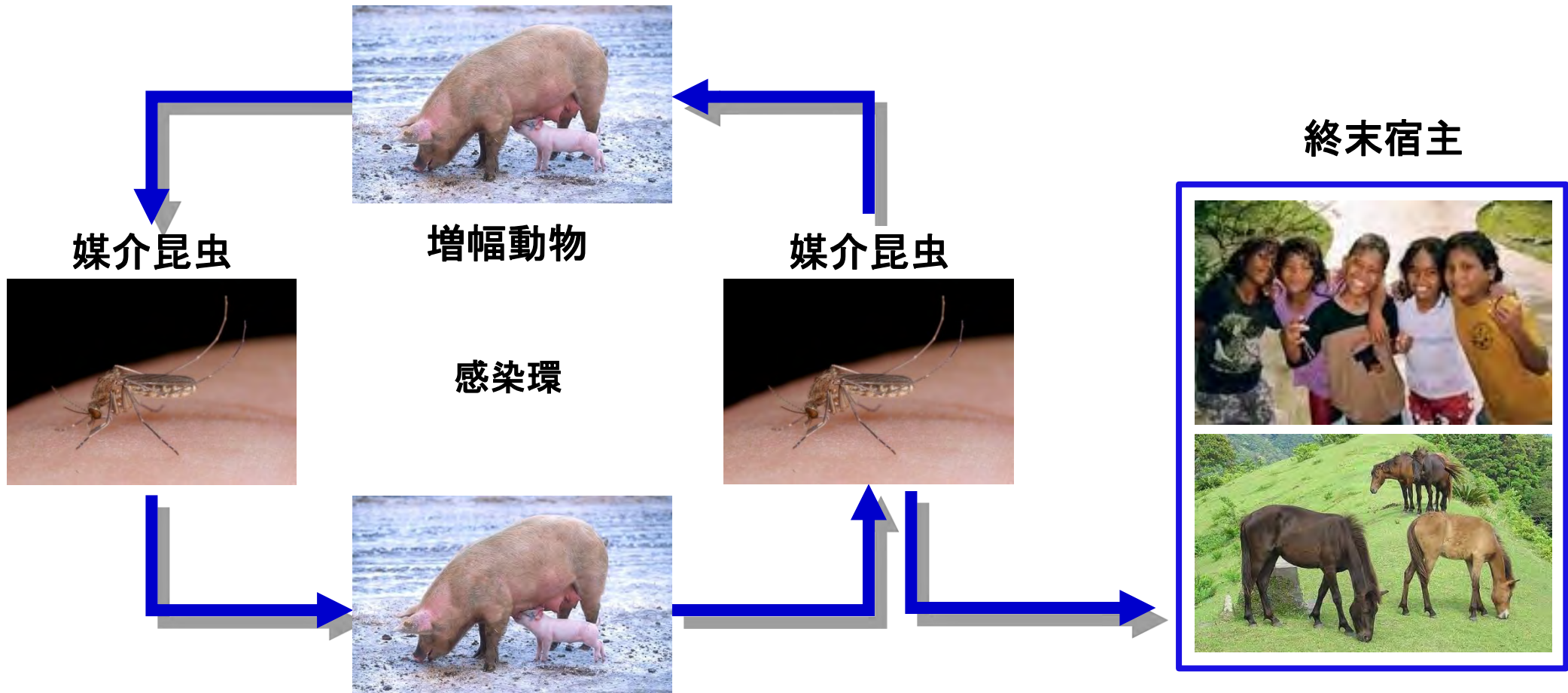


2019-2020年におけるジカウイルス病輸入症例

年	発生地域	性別	年齢	主な症状	推定感染地域
2019	静岡県	女	30		タイ
2019	愛知県	男	40	関節痛、筋肉痛	フィリピン セブ島
2019	愛知県	女	29	関節痛、筋肉痛	タイ バンコク
2020	埼玉県	男	39	発熱、発疹、結膜充血、白血球減少	インドネシア

日本脳炎ウイルス

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～2019年)

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

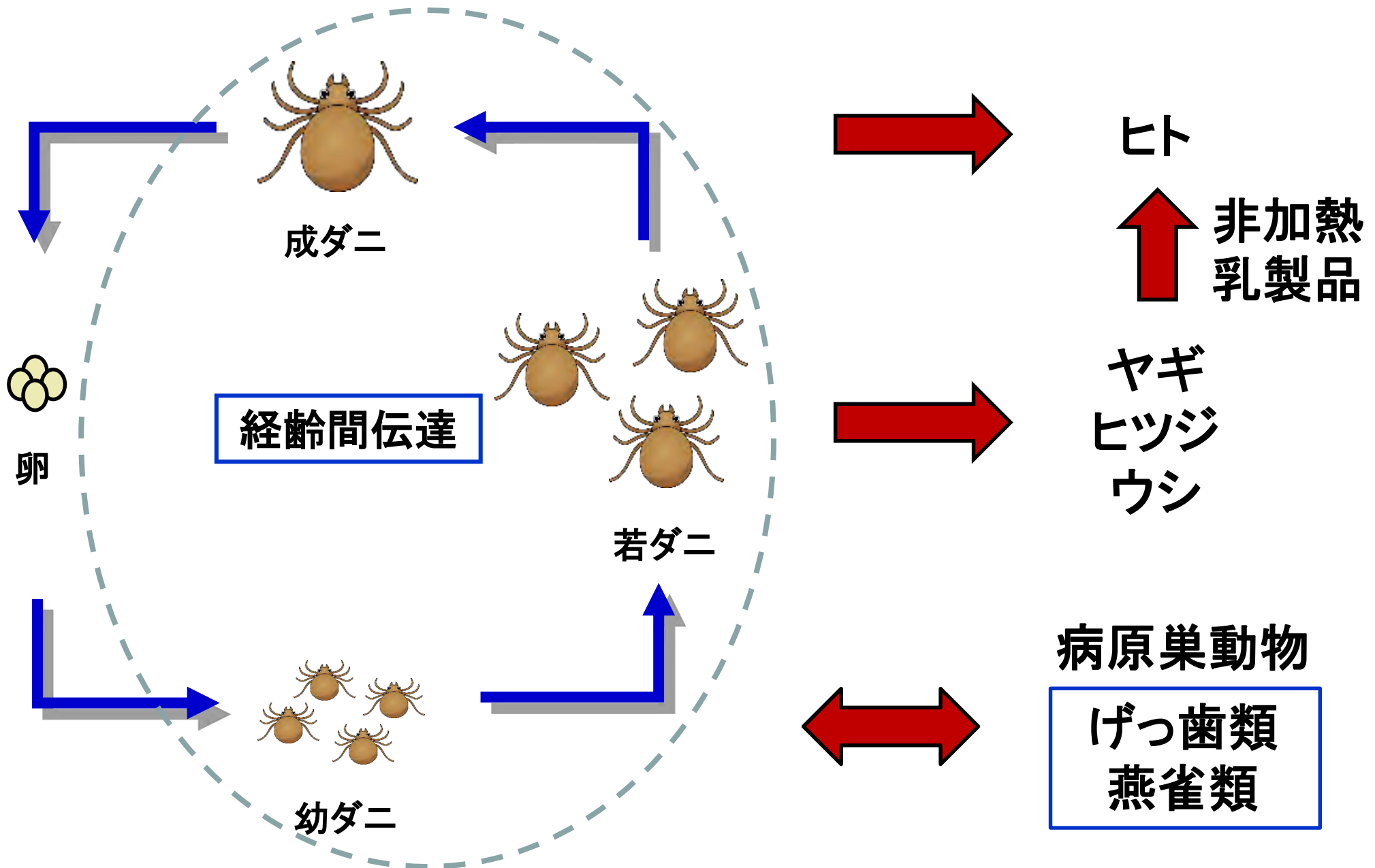
WHO西太平洋地域における日本脳炎患者数の推移

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、 死亡	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、 死亡	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