

# アルボウイルスレファレンス センター報告

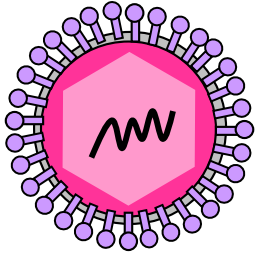


2015年7月24日(日)  
国立感染症研究所  
ウイルス第一部  
高崎智彦

# 国内流行発生後のアルボウイルスセンター関連検査に関する動き

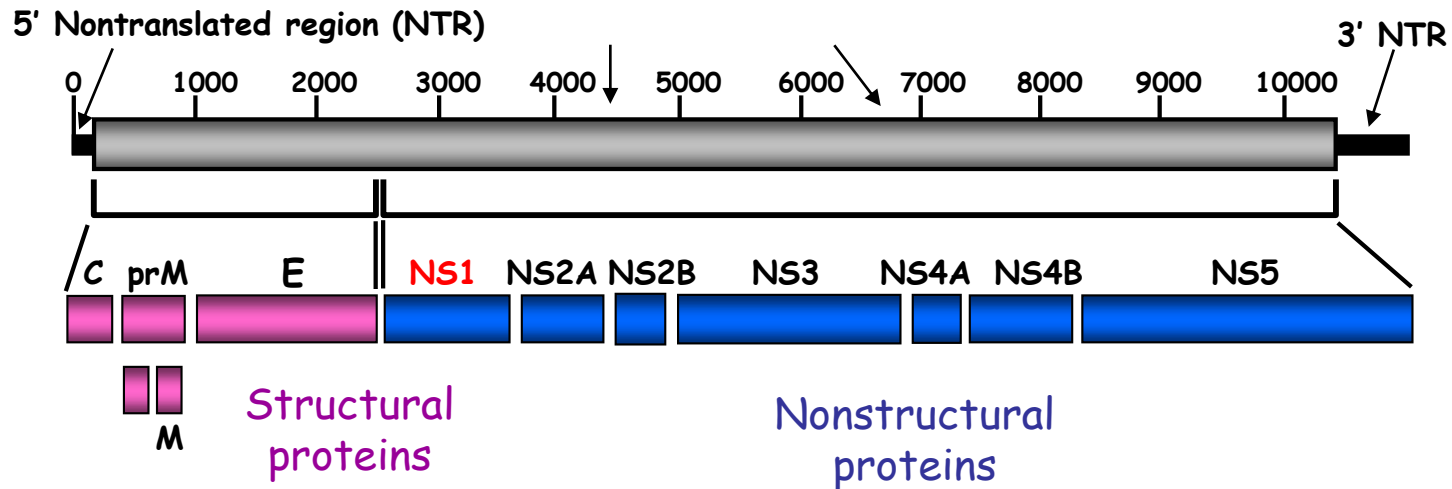
1. NS1抗原イムノクロマトキットを79地方衛生研究所に配布。2014年9月
2. デングウイルスリアルタイムPCR用プライマー&プローブをアルボウイルスセンターを通じて配布。2015年3月
3. チクングニアウイルスリアルタイムPCR用プライマー&プローブを79地方衛生研究所に配布。2015年3月
4. 陽性コントロールRNAを希望する施設送付した。

# フラビウイルスの構造について



プラス鎖RNAウイルス(11kb長)

3つの構造蛋白、7つの非構造蛋白、非翻訳領域から構成される



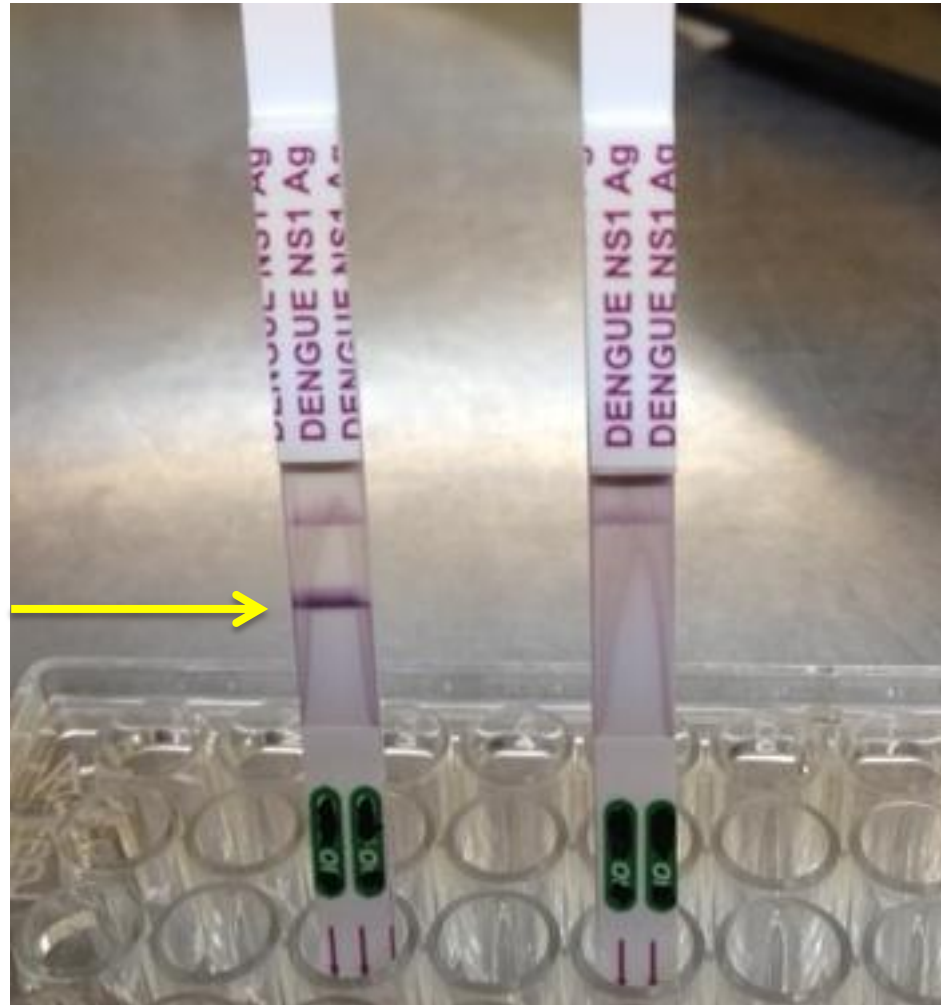
NS1(non-structural protein 1)抗原は、46kDのタンパクであり、デングウイルス感染哺乳類細胞質内、細胞膜表面に発現するとともに感染細胞から分泌されるウイルス抗原である。

# リアルタイムRT-PCR TaqMan法 プライマー・プローブの更新

- デングウイルス3型用をprM領域に設定し直し更新した。3月に配布したものはこの更新版である。
- 日本脳炎ウイルス遺伝子1型、3型共通TaqMan様はNS5領域に設定し直した。35サイクル以降に生じやすい非特異現象が解消された。

# デングウイルスNS1イムノクロマトキット

NS1抗原陽性バンド



かなりくっきりしたバンドが出ることが多い！

# 非特異反応がおきやすい検体

- リュウマチ因子陽性(3/25)
- 抗核抗体陽性(1/10)
- 妊婦(1/40)

- $\gamma$ -グロブリン製剤投与患者には注意
- 敗血症患者にも注意

念のために、2週間以内の黄熱ワクチン接種歴も確認しておく。日本脳炎不活化ワクチンは問題ない。

# ELISAにはReaderが必要です

デングウイルスNS1抗原検出ELISAキット

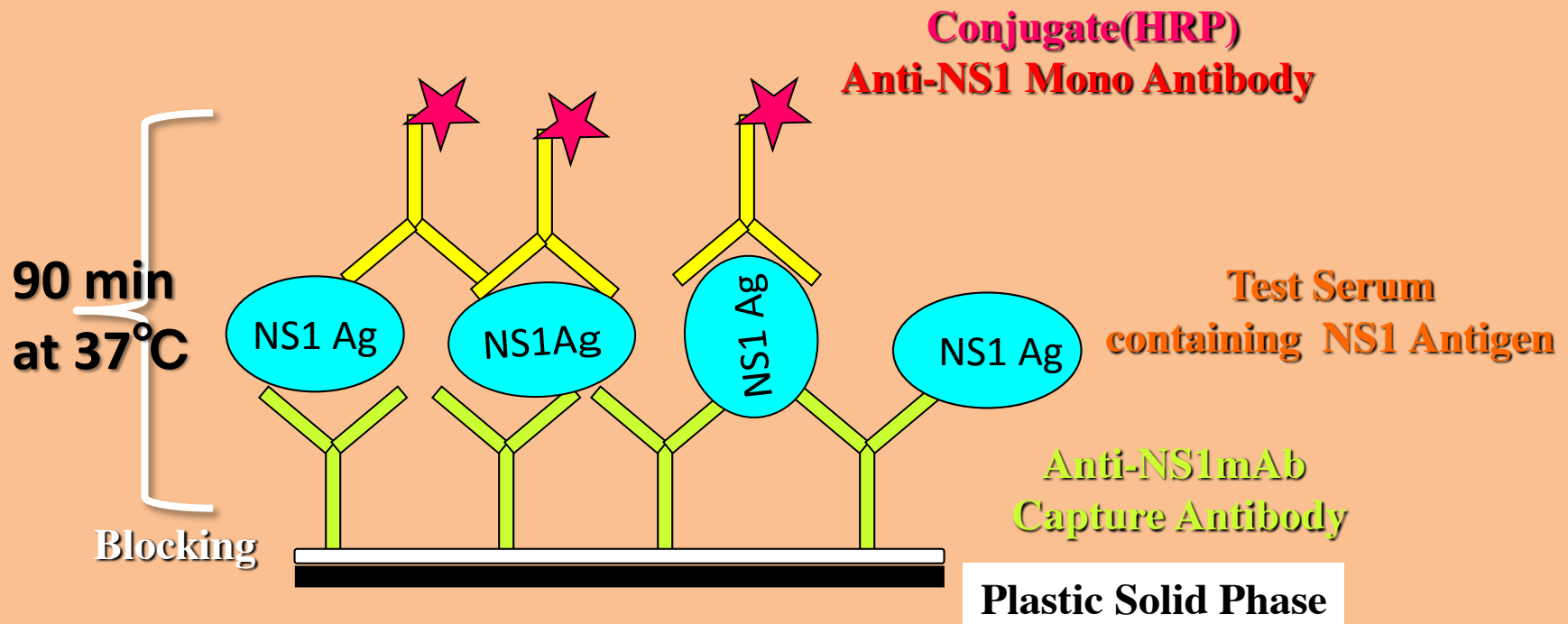


ELISA reader (吸光度を測定する)

# Dengue virus NS1 ELISA

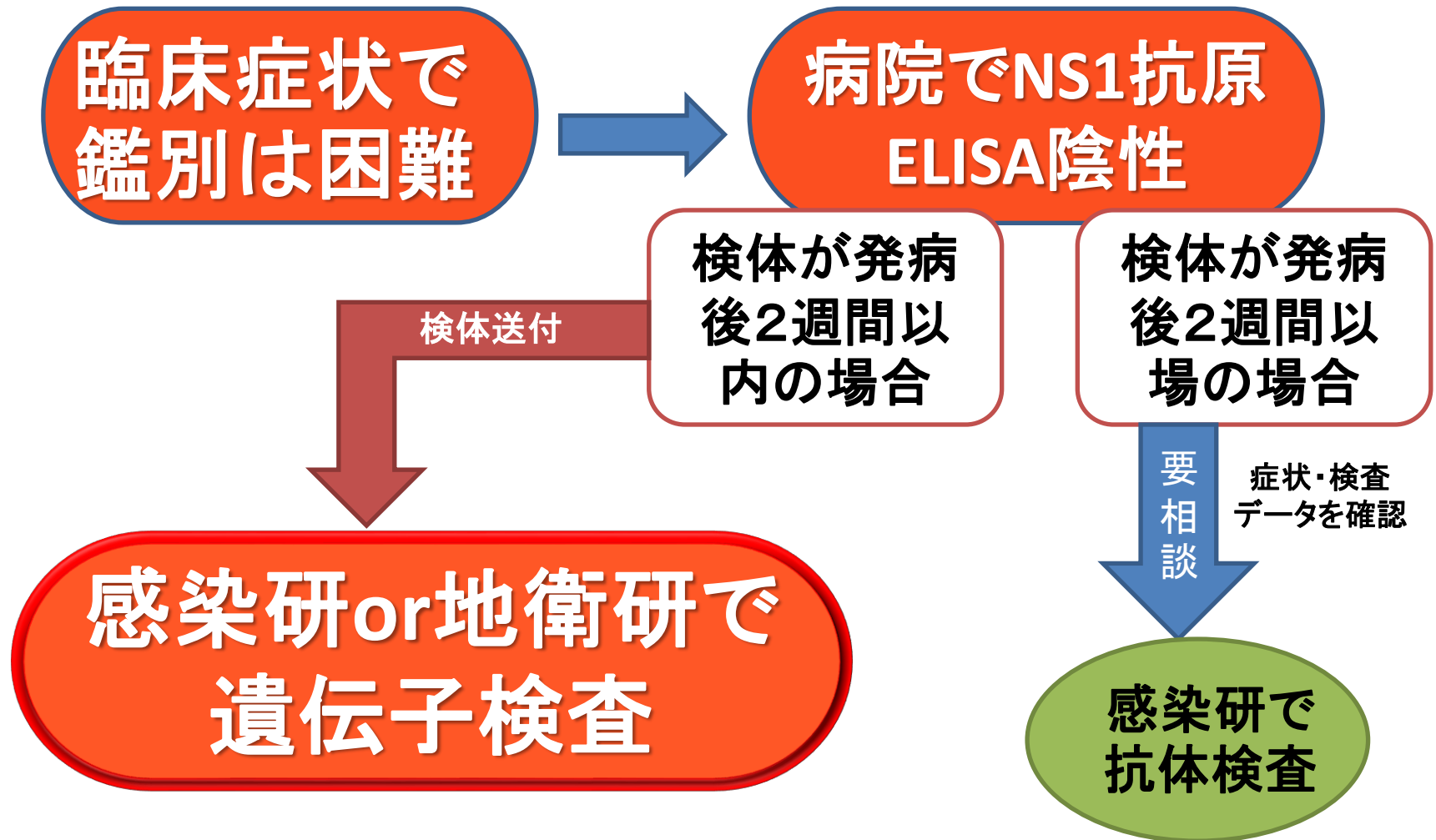
NS1抗原検査ではウイルス型別は決定出来ない

Substrate (TMB)  
30min at RT





# デング熱、チクングニア熱 鑑別のためのフローチャート



(議題)

- 1、デングウイルス、チクングニアウイルス プライマー・プローブ配布状況の確認
- 2、デングウイルス NS1 抗原検査についての情報共有
- 3、ウイルス遺伝子解析について
- 4、日本脳炎ウイルス リアルタイム RT-PCR 用プライマー・プローブについて
- 5、2015 年第 27 週現在のデング熱、チクングニア熱情報

デングウイルス用 primers and probe (TaqMan RT-PCR)

Sub-type	Primer and TaqMan Probe Name	Sequence (5'-3')	Size Gene	Gene
type 1	D1MGBEn469s forward	GAACATGGRACAAYTGCAACYAT	67	E
	D1MGBEn493p* probe	ACACCTCAAGCTCC		
	D1MGBEn536r reverse	CCGTAGTCDGTCAGCTGTATTTCA		
type 2	D2MGBEn493s forward	ACACCACAGAGTTCATCACAGA	68	E
	D2MGBEn545p* probe	CGATGGARTGCTCTC		
	D2MGBEn568r reverse	CATCTCATTGAAGTCNAGGCC		
type 3	DEN-3(4P) forward	GGA CTG GAC ACA CGC ACT CA	73	prM
	DEN3p-Barbara	FAM-ACC TGG ATG TCG GCT GAA GGA GCT TG-TAMRA		
	DEN-3(4P) reverse	CAT GTC TCT ACC TTC TCG ACT TGT CT		
type 4	D4TEEn711s forward	GGTGACRTTYAARGTHCCTCAT	75	E
	D4TEEn734p** probe	FAM-CCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTRGGATC-TAMRA		
	D4TEEn786c reverse	WGARTGCATRGCTCCYTCCTG		

\*type 1, type 2 は MGB プローブである。

\*\*FAM,TAMRA 標識である。

日本脳炎ウイルス用 primers and probe (TaqMan RT-PCR)

①遺伝子1型・3型共通検出用

Primer and Probe	Sequence(5'-3')	Size(bp) Gene
JENS5s269AF092550	GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA	61 NS5
JENS5r330AF092550	TGT TAA CCC AGT CCT CCT GGA A	
JENS5p294AF092550	FAM -CTG CCT GCG TCT CA-MGB	

②遺伝子1型検出用

Primer and Probe	Sequence(5'-3')	Size(bp) Gene
------------------	-----------------	---------------

JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	67 E
JE1en1119c-1082	GGG AGC GTT TGG AGT TAC AGT AA	
JEEen1082pb	FAM-CTC AAG CAG CAA A-MGB	

③遺伝子3型検出用

Primer and Probe	Sequence(5'-3')	Size(bp) Gene
JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	67 E
JE1en1119c-1082	AGG AGC ATT GGG TGT TAC TGT AAA	
JEEen1082pb	FAM-CCC AGG CGG CAA A-MGB	

※FAM、TAMRA

表1 渡航先別検出デングウイルス（型別）H27年第27週時点

推定感染国	1	2	3	4	不明	保留	総計
インドネシア	8	17	1		28		54
コンゴ民主共和国	1						1
シンガポール					1		1
スリランカ	1				1		2
タイ		5	1	1	3		10
フィリピン	3	2	4	3	5		17
ブラジル	2				2		4
ベトナム					1		1
マレーシア	10	2			11		23
ミャンマー					3		3
モルディブ	2						2
仏領ポリネシア	2					1	3
<b>総計</b>	<b>29</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>55</b>	<b>1</b>	<b>121</b>

表2 デング熱報告数 H27年第27週時点

都道府県名	症例数	都道府県名	症例数	都道府県名	症例数
北海道	4	石川県	0	岡山県	0
青森県	0	福井県	0	広島県	0
岩手県	0	山梨県	0	山口県	0
宮城県	1	長野県	4	徳島県	0
秋田県	0	岐阜県	5	香川県	0
山形県	0	静岡県	2	愛媛県	1
福島県	2	愛知県	5	高知県	1

茨城県	0	三重県	0	福岡県	3
栃木県	0	滋賀県	1	佐賀県	0
群馬県	3	京都府	5	長崎県	1
埼玉県	7	大阪府	10	熊本県	1
千葉県	5	兵庫県	4	大分県	1
東京都	35	奈良県	3	宮崎県	0
神奈川県	14	和歌山県	1	鹿児島県	1
新潟県	1	鳥取県	0	沖縄県	0
富山県	0	島根県	0	合計	121

表3 チクングニア熱輸入症例（H27年第27週時点）

推定感染国/週数	2	9	12	14	20	21	23	24	25	26	総計
インド							1				1
インドネシア					1						1
コロンビア	1										1
ソロモン諸島									1		1
ニュージーランド			1					1			2
ボリビア						1					1
ホンジュラス										1	1
ミクロネシア				1							1
仏領ポリネシア		1									1
<b>総計</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>