

とが知られている HTNV, SEOV, DOBV, THAIV に関しては血清型鑑別診断 ELISA の構築が終了し、迅速に血清型を予測することができる。

本年度は、完成したシステムを用いて一部の疫学調査を開始した。その結果、ヒトで初めて TPMV 関連ウイルスに感染した疑いのある抗体陽性例が見つかった。この血清はタイの不明熱患者由来ではあるが、本症例はラオスで発症した後タイの病院を受診したラオス人であるため、タイではなくラオスで感染した可能性がある。今後どのように調査をすすめてゆくか慎重に計画する必要がある。また、インドネシアのスンクスで陽性例が見つかったが、1960 年代にインドで捕獲されたスンクスから TPMV が分離されて以来、スンクスの疫学調査は行われておらず、本当に TPMV がスンクス由来であるのか明らかではなかった。そのため、この抗体陽性例の存在は TPMV の分布を考える上で重要である。また、インド Verolle 周辺のハンタウイルス抗体陽性例を血清型鑑別 ELISA で調べた結果、THAIV 感染が示唆される例と、鑑別不能例が見つかった。このことは THAIV の自然宿主である *Bandicota indica* がインドにも広く分布していることに関連すると考えられる。しかしながら、鑑別不能例の存在は、インド南部に新規の HTNV 関連ウイルスが存在する可能性を示唆している。また、ベトナムでは港湾地区を中心に SEOV 感染がヒトおよびラットで確認されたが、内陸部の陽性例に鑑別不能例が確認されている。これらの結果はアジア地区においてハンタウイルスが予想以上のバリエーションで存在し、ヒトに感染しうることを示唆すると考えられるが、例数を重ねたさらなる解析が必要と考えられる。

また、インド南部の Verolle は TPMV が分離され

た地域でもある。今回はこの地域で TPMV 感染例は見つからなかったが、今後ヒトおよびスンクスにおける TPMV 感染にも注意を払って疫学的調査を続けてゆく必要がある。TPMV が分離されたインド、ヒトの感染例が見いだされたラオス、そしてスンクスの感染例が見つかったのがインドネシアという結果から、TPMV が東南アジア、南アジアの広範囲にスンクスの分布にあわせて存在する可能性が考えられる。

## E. 結論

本研究によって、TPMV, THAIV を加えたさらに広範囲なハンタウイルス感染症の血清診断体制を整えた。さらに、広範囲な疫学的調査を開始し、スンクスが真に TPMV の自然宿主であり、ヒトへ感染しうることを示唆する結果を得た。また、インドおよびベトナムでの調査の結果から未知のハンタウイルス感染症 (HTNV 関連ハンタウイルスに含まれる) の発見が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Schmidt, J., Jandrig, B., Klempa, B., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Meisel, H., Niedrig, M., Pitra, C., Kruger, D.H. and Ulrich, R.: "Nucleocapsid Protein of Cell Culture-Adapted Seoulvirus Strain 80-39: Analysis of its Encoding Sequence, Expression in Yeast and Immuno-Reactivity." *Virus Gene*, 30(1)37-48(2005)
  - 2) S. Chandy, S. Mitra, N. Sathish, T.S. Vijayakumar, O.C. Abraham, M.V. Jesudason, P. Abraham, K. Yoshimatsu, J. Arikawa & G. Sridharan: "A pilot study for serological evidence of hantavirus infection in human population in south India" *Indian J Med Res* 122, 211-215(2005)
  - 3) Lee B-H, Yoshimatsu K, Araki K, Okumura M, Nakamura I, Arikawa J, "A pseudotype vesicular stomatitis virus containing Hantaan virus envelope glycoproteins G1 and G2 as an alternative to hantavirus vaccine in mice." *Vaccine in press.*
2. 学会発表
- 1) Yoshimatsu K, Arikawa J, Kariwa H, 2005. "Rattus and its close allies as hosts and vectors for viral diseases." IX International Mammalogical Congress. Sapporo, Japan (2005.7-8).
  - 2) Pattamadilok, S., Lee, B.H., Kumperasart, S., Yoshimatsu, K., Okumura, M., Nakamura, I., Araki,

- K., Khoprasert, Y., Dangsupa, P., Panlar, P., Jandrig, B., Kruger, D.H., Klempa, B., Jakel, T., Schmidt, J., Ulrich, R., Kariwa, H. and Arikawa, J.: "Serological detection and antigenic and genetic characterization of Thailand virus genus Hantavirus in humans and rodents in Thailand." XIII International Congress of Virology, San Francisco, California, USA, Moscone Convention Center (2005.7)
- 3) Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Araki, K., Tachi, A., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: "Genetic and Antigenic Characterization of Hantavirus Isolates in Amur and Far East Genotype." XIII International Congress of Virology, San Francisco, California, USA, Moscone Convention Center (2005.7)
  - 4) Matsuura Y, Yoshimatsu K, Suzuki M, Yokoyama M, Igota H, Arikawa J, "prevalence of antibodies to the hepatitis e virus in wild sika deer in Japan." The 1st Scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife Medicine. Bangkok, Thailand (2005. 10).
  - 5) 木村享史、澤 洋文、片倉 賢、中村一郎、有川二郎、松本芳嗣、R.P.V. Jayanthe Rajapakse、高島郁夫、梅村孝司：スリランカ津波被災地ならびにその近郊に生息する野生げっ歯類の病理学的検査、第140回日本獣医学会学術集会 鹿児島 (2005. 9)
  - 6) 谷川洋一、荻和宏明、Nur Hardy bin Abu Daud, Nandadeva Lokugamage, Kumari Lokugamage、舘 敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター

(*Mesocricetus auratus*)における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析、第 140 回日本獣医学会学術集会 鹿児島 (2005. 9)

7) 中村一郎、吉松組子、奥村 恵、Yanagihara Richard、荻和宏明、高島郁夫、有川二郎：食虫類由来ハンタウイルス(トッタパラヤンウイルス)のスンクスにおける感受性の検討、第 140 回日本獣医学会学術集会 鹿児島 (2005. 9)

8) 谷川洋一、荻和宏明、萩谷友洋、Nandadeva Lokugamage, Kumari Lokugamage、舘 敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：野生げっ歯類からのハンタウイルス抗原検出用 ELISA の開発、第 139 回日本獣医学会学術集会 和光 (2005. 3)

9) 荻和宏明、谷川洋一、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析、第 53 回日本ウイルス学会 横浜 (2005. 11)

10) 奥村 恵、吉松組子、荻野倫子、中村一郎、垂石みどり、有川二郎：Thottapalayam 型ハンタウイルスの血清診断法の確立、第 53 回日本ウイルス学会 横浜 (2005. 11)

11) 中村一郎、吉松組子、奥村 恵、垂石みどり、荻和宏明、高島郁夫、有川二郎：タイランド型ハンタウイルス感染症の血清診断系の開発、第 53 回日本ウイルス学会 (2005. 11)

12) 吉松組子、奥村 恵、垂石みどり、有川二郎：ハンタウイルスエンベロープ糖蛋白の分泌の解析、第 53 回日本ウイルス学会 (2005. 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

# TaqMan PCR 法によるクリミア・コンゴ出血熱 高感度診断法

分担研究者 西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)

研究要旨:クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのS-遺伝子の塩基配列に基づいて, TaqMan PCR 法のためのプライマーおよびプローブを設計し, 高感度にクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの遺伝子を定量的に測定するためのシステムを開発した. クリミア・コンゴ出血熱の診断には, 一般的に nested RT-PCR 法による遺伝子の増幅法が用いられている. 今回開発された TaqMan PCR 法では, 高感度に, 定量的に, しかもより迅速にクリミア・コンゴ出血熱ウイルス遺伝子を増幅して検出することが可能であった. クリミア・コンゴ出血熱の診断のみならず, クリミア・コンゴ出血熱患者における病勢の判定にも有用と考えられた.

## A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱 (Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF) は, ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される CCHF ウイルスによる感染症で, 致死率の高いウイルス感染症の一つである. CCHF はエボラウイルス感染症などとともに, 感染症新法 (感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律) で1類感染症に分類される. ヒトは感染ダニ (*Hyalomma* 属) に咬まれたり, ウイルス血症を伴う感染動物 (ヒツジなど) の血液や体液に接触したりして CCHF ウイルスに感染する. また, ヒトからヒトへの感染もまれではなく, CCHF 患者の治療にあたった医療関係者が患者から CCHF ウイルスに感染する院内感染例も報告されている. さらに, 抗 RNA ウイルス薬のひとつであるリバビリンが, CCHF の治療に有用であるとの報告もある. そのため, CCHF の迅速診断は, 感染拡大の防止や治療に重要である.

クリミア・コンゴ出血熱の遺伝子診断には, 一般的には S-遺伝子の部分遺伝子を, nested RT-PCR 法で増幅する方法が用いられている. つまり, PCR のステップは2回必要で, かつ,

疑陽性の成績を呈する可能性が高い方法と考えられる. そこで, 本研究ではより迅速にしかも定量的にクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの部分遺伝子を増幅するための TaqMan PCR 法を開発した.

## B. 方法

- 1) 血清. クリミア・コンゴ出血熱患者 (28歳, 羊飼い) から経時的 (発症後第1日目, 第5日目および第9日目) に採取された血清を用いた. 尚, この患者の詳細な経過については既に報告されている (Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 10:489-491, 2003)
- 2) TaqMan-PCR: Forwardプライマーには 5'-GCAGGAACCATTAATCTTG-3' を, reverse primer には 5'-TGCATTGACACGAAAACCTA-3' を用いた. また, TaqManプローブには 5'-CTCCACTTGAGAGCAGCCTGTTGGT-3' を用いた. 血清から Viral Nucleic Acid Purification Kit (Roche Diagnostics 社) を用いて RNA を抽出した. 抽出された RNA をテンプレートとして,

random hexamerをプライマーとして ready-to-go RT-PCRキット (Promega社) を用いてreverse transcription反応によりcDNAを作製した. 作製されたcDNAが含まれる反応液5  $\mu$ lをテンプレートとして, LightCycler FastStart DNA Master Hybridization ProbeおよびLightCycler-PCR システム (Roche Diagnostics社, Mannheim, ドイツ) を用いて試料中に含まれるクリミア・コンゴ出血熱遺伝子を定量的に検出した. ただし, 遺伝子検出感度を決定するためのstandard遺伝子には, 濃度が決定されているクリミア・コンゴ出血熱ウイルスS-遺伝子の挿入されたpGEM-T-easyベクターを用いた.

- 3) RT-PCR法. RT-PCR: 血清中のCCHFウイルス部分S-遺伝子は, 先の報告に従い検出した (Clin Diagn Lab Immunol 10:489-491, 2003).
- 4) CCHFウイルスに対する抗体検出: CCHFウイルスの組換え核蛋白を抗原とした抗体検出システムを用いてCCHFウイルスに対する抗体を検出した (J Clin Microbiol 40:1587-1591, 2001 ; J Med Virol 75:295-299, 2005).

#### C. 結果

- 1) 患者: 患者は中国新疆ウイグル自治区西部に在住する 28 歳男子で, 職業は羊飼いである. 発熱および出血症状のため, 巴楚人民病院に搬送された. クリミア・コンゴ出血熱が疑われ, 入院後は補液とリバビリンの静注療法を受けた. 発症後ほぼ 10 日目には後遺症を残すことなく回復した.
- 2) TaqMan PCR. 発症第 1 日目に採取された血清から, クリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムが,  $2.4 \times 10^6$  コピー/ml (血清 1ml 中に含まれるウイルス量に換算) 検出されたが, 発症第 5 日目および 9 日目に採取された血清からはクリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムは検出されなかった (図 1). 発症第 1 日目の血清には, クリミア・

コンゴ出血熱ウイルスに対する抗体は検出されなかったが, 発症第 5 日目および 9 日目の血清には IgG 抗体と IgM 抗体が検出された. また, TaqMan PCR 法の成績と同様に, nested RT-PCR 法では第 1 日目の血清からはウイルスゲノムが増幅されたが, 第 5 日目および第 9 日目の血清にはウイルスゲノムは増幅されなかった.

#### D. 考察

本研究では, クリミア・コンゴ出血熱ウイルス中国株の S-遺伝子において, 株間で比較的保存されている領域に forward プライマーを reverse プライマーおよび TaqMan プライマーを設計した. クリミア・コンゴ出血熱ウイルス 66019 株の S-遺伝子 (GenBank accession No., AJ010648) において, forward プライマー, reverse プライマーおよび TaqMan プライマーが結合する部位は, 5' ポジションはそれぞれ 353 番, 465 番, 432 番に相当する. この部位は比較的保存されている領域であり, 今回設計されたプライマーおよびプローブを用いた TaqMan PCR 法では, クリミア・コンゴ出血熱ウイルス中国株の検出は可能であると考えられるが, 更なる検討を要すると考えられる.

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのゲノム配列には, 株間により (特に S-遺伝子の場合, 地域によって) 比較的高い相違が認められる. そのため, PCR 法や TaqMan PCR 法におけるプライマーおよびプローブの設計には更なる改善が必要と考えられる.

本診断法は, クリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムを定量的に測定することが可能であることから, クリミア・コンゴ出血熱の診断のみならず, 病勢の判定にも有効であると考えられる. また, 血清からウイルスゲノムの抽出および TaqMan PCR の反応の酋長まで, ほぼ 2 時間以内で成績を得ることができる. この特徴も本診断法の利点のひとつであろう.

世界各国で分離されたクリミア・コンゴ出血熱ウイルスのゲノム塩基配列情報が明らかになりつつあることから, それらの情報をも

とに、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス多くの株を検出するためのシステムを準備することが求められる。

#### E. 結語

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムを定量的に、しかも、迅速に検出するための TaqMan PCR 法を開発した。本法は診断および病勢の判定に有用と考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Research* 66:159-63, 2005
- 2) Saijo M, Niikura M, Maeda A, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Medical Virology* 76:111-118, 2005
- 3) Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *Journal of Virological Methods* 125:181-186, 2005
- 4) Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral anti-smallpox immunity among the current Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:520-524, 2005
- 5) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama

S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of General Virology* 86:2269-2274, 2005

- 6) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3K/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV-infection in Vero E6 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1741:4-10, 2005
  - 7) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *Journal of Medical Virology* 77:83-88, 2005
  - 8) Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *Journal of Virology* 79:11873-11891, 2005
2. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）  
特許取得：該当なし
  3. 学会発表
    - 1) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    - 2) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus

- Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
- 3) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
  - 4) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, protects monkeys from monkeypox. XIIIth International Congress of Virology. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
  - 5) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Protection of non-human primates from monkeypox by highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of B5R membrane protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program 39th Virology Panel Meeting. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
  - 6) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂. LC16m8痘そうシクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果(続報). 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  - 7) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARSコロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  - 8) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSVシュードタイプを用いたSARS-CoV感染の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  - 9) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウス, ラットを用いた経代によるSARS-CoVの病原性の変化. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  - 10) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVスパイクタンパク質とACE2の相互作用のVSVシュードタイプを用いた解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005年12月, 博多

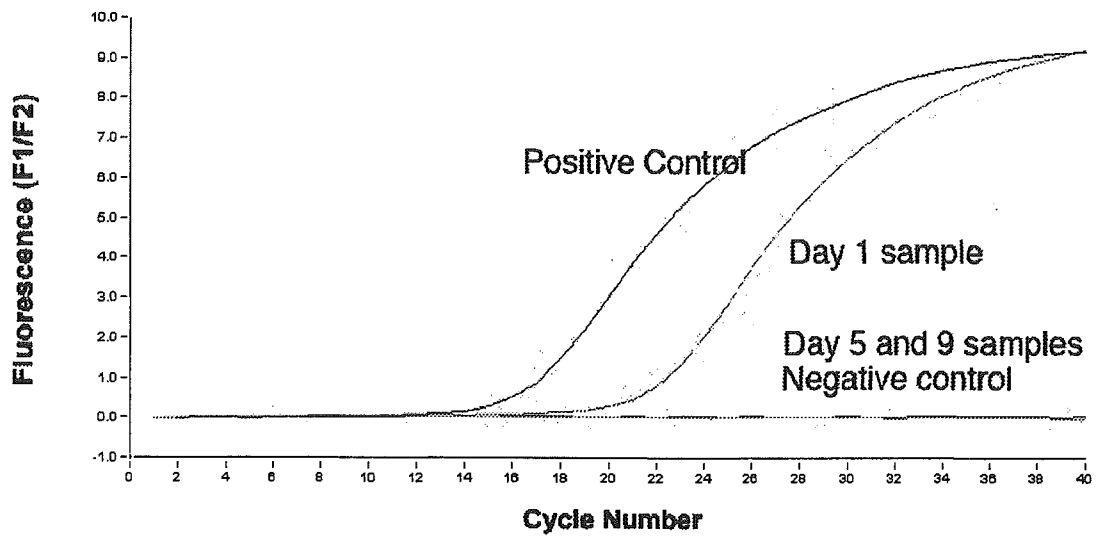


図1. TaqMan PCR法によるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムの検出. 本患者から, 発症第1日目に採取された血清中には,  $2.4 \times 10^6$ コピー/ml検出されたが, 発症第5日および9日目に採取された血清にはウイルスゲノムは検出されなかった. この成績は, nested RT-PCR法による成績と一致していた.



厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

新規ワクチンによる日本脳炎の予防

分担研究者 倉田 毅 国立感染症研究所 所長  
小島 朝人 国立感染症研究所 感染病理部室長

研究要旨

東南アジアからインドに及ぶ地域の日本脳炎流行を予防するには、広範な予防接種による財政圧迫を最小限に止められる、より安価で安全な製造法の新規ワクチンを必要とする。そこで、我々が開発してきたバイオプロダクター技術を駆使してこの目的に迫った。即ち、日本脳炎ウイルス抗原のバイオプロデューサー細胞株を、①無血清培養産生系に転換し、②導入cDNA、細胞の性状、抗原の性状が安定に保存されている事、③精製抗原が現行ワクチンと同等の抗原性・有効性を維持している事、を示した。安価・安全に製造可能な新規日本脳炎サブユニットワクチン実用化に向けた路を拓いたものと思われる。

A. 研究目的

東南アジア～インドにおける重大なフラビウイルス感染症の1つである日本脳炎は、昨年インドで大流行を引起し、図らずもワクチンによる予防の有効性・重要性を示した。現存するワクチンは我国の感染マウス脳由来ワクチンが唯一のものであるが、脳物質の混入リスクを負う。そのため、組織培養由来ワクチンが我国で開発され、脳由来ワクチンとの交代が今後の課題となっている。

しかし、流行地域の人口数・経済状況を考慮すると、ワクチン価格による財政負担が広範な予防接種の実施を困難にしている。そこで、我々のバイオプロダクター技術による安価なサブユニット日本脳炎ワクチン開発を目指した。

価格上昇圧力の1つが日本脳炎ウイルスを大量に培養するための施設・設備・稼動・維持費用にある。従って、①感染性ウイルスを用いず、②日本脳炎ウイルス prM-E 構造蛋白遺伝子の発現系

で、③ワクチン抗原を大量生産でき、④不純物混入の元となる培養用牛胎児血清(FBS)も用いない、今後応用可能なワクチン産生システム確立を目的とした。

B. 研究方法

日本脳炎ウイルス prM-E 抗原をコードする cDNA を導入した持続産生細胞(特願 2002-229597)をバイオプロデューサーとして用いた。FBS 濃度を順次低下させ無血清培地へ馴化させた。馴化細胞を VP-SFM 無血清培地で継代し、FBS 添加培地で継代された細胞親株と、抗原産生量・ゲノム中の挿入 cDNA の保存状態を比較した。

ワクチン抗原は、培養上清中からゲル濾過、蔗糖密度勾配遠心法を組合わせて精製した。抗原のヘマグルチニン活性を定法に従い測定した。抗原量はサンドイッチ ELISA で抗原価として定量し、性状は抗・日本脳炎ウイルス抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。形状は

ネガティブ染色後電子顕微鏡で観察した。

中和抗体誘導試験は、現行ワクチン試験法に準じて、6週齢ddY雌マウス腹腔に1週間隔で2回抗原を投与した。血清中の中和抗体価は、Vero細胞を用いたウイルスプラーク減少法で測定した。感染防御試験は、4週齢ddY雌マウスを2回免疫後、ウイルスを腹腔接種して生存率を検討した。

#### (倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は動物倫理規定に則り、申請・承認を受けた方法で実施した。即ち、必要最小限のマウス数を使用し、採血時にはマウスに対して麻酔処置を施して負担を最大限軽減し、実験終了後は安楽殺の処置を行った。

#### C. 研究結果

(1)細胞培養液の FBS 濃度を順次低下させて、無血清培地に馴化した細胞株を確立した。この馴化株の形態・継代安定性は親株と変化なく、細胞増殖速度は低下したものの、最終的な単層形成細胞数は同等であった。従って、細胞当りの抗原産生量は同等であった。

(2)細胞のゲノム中に挿入されている cDNA の状態を、サザンハイブリダイゼーションで検討した。1 種類の制限酵素では大分子量 DNA 領域に cDNA がブロードに分散していたが、cDNA の両端を切断する 2 種の制限酵素処理では、該当サイズの位置に明瞭なシングルバンドを形成した。しかも、馴化或いは継代数に拘わらず親株と同等であった。

(3)培養上清から抗原を精製した。回収率は 40-50%で、蔗糖密度勾配遠心法ではビリオンより比重の軽い SHA (Slow Sedimenting Hemagglutinin)粒子画分に沈降し、ウエスタンブロットで 53kDa の E 蛋白及び 7kDa の M 蛋白が確認された。電子顕微鏡観察の結果は、SHA と同サイズの直径約 25 nm の均一な粒子であった。

(4) 日本脳炎ワクチン試験法に準じて精製抗原を ddY マウスに免疫した。その結果、中和抗体の誘導は現行脳由来ワクチンと同等或いはやや高い成績を示した。ウイルスの腹腔内感染攻撃に対して、精製抗原で免疫したマウスは全匹生存し、100%の防御効果を示した。

#### D. 考察

細胞培養由来ワクチンでは、培養液の牛胎児血清が不明物質混入のリスク源となる。従って、無血清培養系に変換することが望ましいが、変換過程で産生量・産生細胞頻度の低下、挿入遺伝子の欠失・発現効率低下を招く事が多々ある。

本研究では、これらネガティブ要因を伴わずにバイオプロデューサーの変換に成功した。cDNA は安定に保存され、産生量低下を伴わず、産生細胞も 100%保存されていた。安価で製造上安全なサブユニットワクチンへの進展と思われる。

しかも、現行ワクチン試験法に準じた抗原性・免疫原性の検討で、現行ワクチンと同等の中和抗体価が誘導され、感染防御試験で免疫マウスが 100%の生存率を示したことは、抗原性も安定に保存されていることを示唆している。今後の実用化に向けた開発研究に移行できる基盤は整えられたものと思われる。

#### E. 結論

新規日本脳炎ワクチン抗原のバイオプロダクター細胞株を、①無血清培養産生系に転換し、②導入cDNA、細胞の性状、抗原の性状が安定に保存されている事、③精製抗原が現行ワクチンと同等の有効性を持つ事、を示した。実用化に向けた路を拓いたものと思われる。

F. 健康危険情報：該当事項無し。

G. 研究発表：1.Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeno A, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hiramata C, Yoshida T,

Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A: An Attenuated LC16m8 Smallpox Vaccine: Analysis of Full-Genome Sequence and Induction of Immune Protection. J Virol 79(18):11873-11891, 2005

2. M Saijo, M Niikura, T Ikegami, I Kurane, T Kurata, S Morikawa. Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins. Clinical and Vaccine Immunol in press

H. 知的財産権の出願・登録状況：該当事項無し。

(別添5-1)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表  
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nukui Y, Tajima S, Kotaki A, Ito M, Takasaki T, Koike K, Kurane I.	Novel Dengue virus type 1 from travelers to Yap State, Micronesia.	Emerging infectious Diseases	12(2)	343-346	2006
Murakami, M, Ota, T, Nukuzuma, S, Takegami, T.	Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo.	Microbiol Immunol	49	1047-1056	2005
Eiji, Konishi, Mizue, Shoda, Takashi, Kondo.	Analysis of yearly changes in levels of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein in ratchores in central Japan shows high levels of natural virus activity still exist.	Vaccine	24	516-524	2005
Ando, T, Yamashiro, T, Sonoda YT, Mannen K, Nishizono A.	A pilot study for serological evidence of hantavirus infection in human population in south India.	Microbiol Immunol	49	311-322	2005
Khawplod, P, Shoji, Y, Ubol, S, Mitmoonpitak, C, Wilde, H, Nishizono, A, Kurane, I, Moromo, K.	Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok.	Infect. Genet Evol	Jul		2005
Khawplod, P, Inoue, K, Shoji, Y, Wilde, H, Ubol, S, Nishizono, A, Kurane, I, Moromo, K.	A novel rapid fluorescent focus inhibition test(RFFIT) for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein.	J of Immunol Methods	125	35-40	2005
Irie, K, Kawai A.	Further studies on the mechanism of rabies virus neutralization by mAb#1-46-12.	Microbiol.Immunol	49	721-731	2005
Thirapanmethee, K, Ootani, N, Sakai, M, Lien, C.K., Kawai, A.	Futher studies on the soluble form(Gs) of rabies virus glycoprotein(G): Molecular structure of Gs protein and possible mechanism of the shedding.	Microbiol Immunol	49	733-743	2005
Toriumi, H, Kawai, A.	Structural difference recognized by a monoclonal antibody #404-11 between the rabies virus nucleocapsid(NC) produced in virus infected cells and the NC-like structures produced in the nucleoprotein(N) cDNA-transfected cells.	Microbiol Immunol	49	757-770	2005
Scmidt J, Jandrig B, Klempa B, Yoshimatsu K, Arikawa J, Meisel H, Niedring M, Pitra C, Kruger D.H, Ulrick R.	Nucleocapsid protein of Cell culture-adapted Seoulvirus strain 80-39: Analysis of its encoding sequence, expression in yeast and Immuno-Reactivity.	Virus Gene	30	37- 48	2005
Candy S, Mitra S, Sathish N, Vijayakumar T S, Abraham OC, M.V. Jesudason MV, Abraham P, Yoshimatsu K, Arikawa J, Sridharan G.	A pilot study for serological evidence of hantavirus infection in human population in south India.	J Med Res	122	211-215	2005

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・印刷

# Novel Dengue Virus Type 1 from Travelers to Yap State, Micronesia

Yoko Nukui,\*† Shigeru Tajima,\* Akira Kotaki,\*  
Mikako Ito,\* Tomohiko Takasaki,\*  
Kazuhiko Koike,† and Ichiro Kurane\*

Dengue virus type 1 (DENV-1), which was responsible for the dengue fever outbreak in Yap State, Micronesia, in 2004, was isolated from serum samples of 4 dengue patients in Japan. Genome sequencing demonstrated that this virus belonged to genotype IV and had a 29-nucleotide deletion in the 3' noncoding region.

Dengue virus (DENV) is a mosquito-borne flavivirus; there are 4 serotypes, DENV-1, -2, -3 and -4. DENV has been found in  $\geq 100$  countries and 2.5 billion people live in areas where dengue is endemic. Fifty to one hundred million cases of dengue infection are estimated to occur annually (1). In Japan, outbreaks of dengue fever occurred in Nagasaki, Hiroshima, Kobe, and Osaka from 1942 to 1945, but none thereafter (2). However,  $\approx 50$  imported dengue cases occur annually in Japan.

The DENV genome is a single-stranded positive-sense RNA of  $\approx 11,000$  nucleotides (nt) that encodes 3 structural proteins (capsid, membrane, and envelope) and 7 non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) (3). Surrounding the open reading frame (ORF) are 5' and 3' noncoding regions (NCRs) that form RNA secondary structures (4). These regions are  $\approx 100$  and  $\approx 400$  nt, respectively (5).

Dengue fever developed in 9 Japanese patients in 2004 after they returned from Yap state. We report the genetic characterization of RNA from DENV-1 isolates from these patients.

## The Study

Yap is the westernmost state of the Federated States of Micronesia and composed of 4 major islands. Yap has a total area of 102 km<sup>2</sup> and a population of 11,241 (2000 census). The climate is moderate and fairly constant. The mean annual temperature is 27°C. Relative humidity ranges from 65% to 100% (annual mean 83%). Rainfall averages 120 inches a year and is seasonal.

In 1995, a dengue epidemic caused by DENV-4 occurred in Yap state (6), but no dengue outbreaks have since been reported. However, the Yap EpiNet Team reported a dengue outbreak caused by DENV-1 in Yap state that began in the last week of May 2004. A total of 658 reported dengue fever cases (defined by the World Health Organization) occurred as of December 29, 2004. No deaths or dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases were reported (7).

Fever, headache, and diarrhea developed in 7 Japanese adults who visited Yap after their return to Japan in August 2004. DENV infection was serologically confirmed in 5 patients (patients 1–5) by an immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Focus Diagnostics Inc., Herndon, VA, USA) and an IgG ELISA (PANBIO Ltd., Brisbane, Queensland, Australia) at the National Institute of Infectious Diseases in Tokyo, Japan. Of these 5 patients, 4 had a primary DENV infection and 1 had a primary dengue infection and a secondary flavivirus infection. DENV infection was serologically confirmed in the sixth patient at another institute. The seventh patient did not visit a medical facility but had symptoms of dengue fever. In addition, 2 other Japanese patients who traveled to Yap in September 2004 were diagnosed with dengue (data not shown).

Four virus isolates (NIID04-27, -31, -41, and -47) were obtained from serum samples from patients 1–4, respectively. Two hundred microliters of serum samples diluted 1:40 was injected onto C6/36 cells in minimal essential medium supplemented with 2% fetal calf serum. The cells were incubated at 28°C for 7 days and culture supernatant fluids were collected. DENV isolates were used for analysis without any further passage.

Complete nucleotide sequencing of RNA of NIID04-27, -31, and -47 and partial sequencing of NIID04-41 were performed. Viral RNA was extracted by using a High Pure RNA extraction kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions, transcribed to cDNA, and amplified by polymerase chain reaction, as described previously (8). The cDNA was purified and sequenced by using the ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Seventeen pairs of primers were designed based on the DENV-1 NIID02-20 sequence (GenBank accession no. AB178040) and used in the analyses (9).

The nucleotide sequences of the viral isolates were compared with published complete sequences of DENV-1 (Table 1). Sequence alignment and analysis were performed by using ATGC analysis programs (version 4.02; Genetyx Corp., Tokyo, Japan). Phylogenetic analyses of nucleotide sequences were conducted with ClustalX software version 1.83 (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClusterW/>). A phylogenetic tree was reconstructed for

\*National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; and  
†University of Tokyo, Tokyo, Japan

Table 1. Dengue virus (DENV) strains used in the study

Virus	Strain	Origin	Year isolated	GenBank accession no.
DENV-1	NIID04-27	Yap Island	2004	AB204803
DENV-1	NIID03-41	Republic of Seychelles	2003	AB195673
DENV-1	FGA/89	French Guiana	1989	AF226687
DENV-1	BR/90	Brazil	1990	AF226685
DENV-1	BR/97-111	Brazil	1997	AF311956
DENV-1	BR/01-MR	Brazil	2001	AF513110
DENV-1	Abidjan	Côte d'Ivoire	1998	AF298807
DENV-1	Mochizuki	Japan	1943	AB074760
DENV-1	S275/90	Singapore	1990	M87512
DENV-1	16007	Thailand	1964	AF180817
DENV-1	GZ/80	China	1980	AF350498
DENV-1	A88	Indonesia	1988	AB074761
DENV-1	Cambodia	Cambodia	1998	AF309641
DENV-1	Djibouti	Ethiopia	1998	AF298808
DENV-1	West Pac 74	Nauru	1974	U88535
DENV-1	98901530	Indonesia	1998	AB189121
DENV-1	98901518	Indonesia	1998	AB189120
DENV-1	259par00	Paraguay	2000	AF514883
DENV-1	295arg00	Argentina	2000	AF514885
DENV-1	ARG9920	Argentina	1999	AY277664
DENV-1	NIID02-20	Thailand	2002	AB178040
DENV-1	99-36-1HuNIID	Paraguay	1999	AB111065
DENV-1	01-27-1HuNIID	The Philippines	2001	—
DENV-1	01-32-1HuNIID	The Philippines	2001	—
DENV-1	01-36-1HuNIID	Singapore, Malaysia	2001	AB111067
DENV-1	01-42-1HuNIID	Thailand, Cambodia	2001	AB111069
DENV-1	01-44-1HuNIID	Tahiti	2001	AB111070
DENV-1	01-54-1HuNIID	India	2001	—
DENV-1	01-54b-1HuNIID	India	2001	—
DENV-1	01-61-1HuNIID	Cambodia	2001	AB111071
DENV-1	01-65-1HuNIID	Thailand	2001	AB111072
DENV-1	01-66-1HuNIID	Thailand	2001	—
DENV-2	DENtype2-TB16i	Indonesia	2004	AY858036
DENV-3	DENtype3-TB55i	Indonesia	2004	AY858048
DENV-4	DENtype4-8976/95	Indonesia	2004	AY762085

aligned nucleotide sequences by using the neighbor-joining method. Bootstrap reassembling analysis of 1,000 replicates was used to assess confidence values for virus groupings. The phylogenetic tree was constructed by using Treeview software version 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.htm>).

The full-length RNA genomes of NIID04-27, -31, and -47 were 10,706 nt. A previous study reported that the full-length RNA genome of DENV-1 was 10,735 nt (8). The differences in the genome sequence between NIID04-27 and the other 2 isolates (NIID04-31 and -47) were subtle; identities with NIID04-31 and -47 were 99.94% and 99.92%, respectively. The results suggest that these 3 isolates belong to the same strain. Therefore, we used NIID04-27 as a representative isolate for further analysis.

To characterize the molecular structure of the genome, the complete NIID04-27 nucleotide sequence was compared with those of other DENV-1 strains available in GenBank (Table 1). NIID04-27 shared sequence identity ranging from 90.9% to 96.9% (Table 2) with 12 other

DENV-1 strains. With respect to the alignment of full-length genomes, some alterations were found in the 3' NCR. These alterations included a deletion of 29 nt starting at the 13th position from the ORF termination codon (Figure 1). The same deletion in the 3' NCR was found in the viral genome amplified directly from the serum sample from patient 1 and was also observed in NIID04-31, -41, and -47.

To further analyze the genetic variation in the 3' NCR of DENV-1, we analyzed the sequence of 24 other DENV-1 strains. Only the NIID03-41 strain, which was isolated in our laboratory from a patient returning from the Republic of Seychelles, had a 17-nt deletion in the 3' NCR (Figure 1). The complete genomes of the 25 DENV-1 strains analyzed showed high levels of nucleotide sequence identity in the 3' NCR, except for a small region of 50 nt immediately after the ORF, which is the hypervariable region. The nucleotide sequence identities in the 3' NCR between NIID04-27 and 12 other DENV-1 strains ranged from 89.3% to 92.5% (Table 2).

Table 2. Pairwise comparisons of full-length genome and 3' noncoding region sequences of dengue virus type 1 (DENV-1) strains\*

Virus strain	% identify of nucleotide												
	NIID 04-27	FGA/89	BR/90	BR/97 -111	Abidjan	Mochizuki	S275/90	16007	GZ/80	A88	Cambodia	Djibouti	West Pac74
Full-length genome													
NIID04-27		<b>91.5</b>	<b>91.5</b>	<b>91.3</b>	<b>90.9</b>	<b>93.4</b>	<b>91.9</b>	<b>93.1</b>	<b>92.3</b>	<b>96.9</b>	<b>91.7</b>	<b>91.7</b>	<b>95.6</b>
FGA/89	<b>89.5</b>		<b>98.3</b>	<b>97.9</b>	<b>94.5</b>	<b>93.7</b>	<b>93.4</b>	<b>93.5</b>	<b>92.5</b>	<b>92.3</b>	<b>92.0</b>	<b>92.1</b>	<b>93.3</b>
BR/90	<b>89.5</b>	<b>99.4</b>		<b>98.8</b>	<b>94.5</b>	<b>93.9</b>	<b>93.7</b>	<b>93.7</b>	<b>92.7</b>	<b>92.3</b>	<b>92.2</b>	<b>92.0</b>	<b>92.9</b>
BR/97-111	<b>89.3</b>	<b>98.7</b>	<b>99.4</b>		<b>94.4</b>	<b>93.7</b>	<b>93.5</b>	<b>93.5</b>	<b>92.5</b>	<b>92.2</b>	<b>92.1</b>	<b>91.8</b>	<b>92.8</b>
Abidjan	<b>89.7</b>	<b>94.0</b>	<b>93.8</b>	<b>94.2</b>		<b>92.9</b>	<b>92.8</b>	<b>92.9</b>	<b>92.1</b>	<b>92.0</b>	<b>91.7</b>	<b>91.6</b>	<b>92.3</b>
Mochizuki	<b>91.2</b>	<b>94.8</b>	<b>94.7</b>	<b>94.9</b>	<b>93.4</b>		<b>95.0</b>	<b>95.4</b>	<b>96.1</b>	<b>94.6</b>	<b>95.3</b>	<b>95.2</b>	<b>95.1</b>
S275/90	<b>91.2</b>	<b>91.7</b>	<b>91.5</b>	<b>91.9</b>	<b>96.6</b>	<b>94.4</b>		<b>93.8</b>	<b>96.1</b>	<b>93.0</b>	<b>96.4</b>	<b>95.2</b>	<b>93.7</b>
16007	<b>90.8</b>	<b>96.2</b>	<b>95.9</b>	<b>95.7</b>	<b>93.2</b>	<b>97.4</b>	<b>93.4</b>		<b>94.2</b>	<b>94.2</b>	<b>93.7</b>	<b>93.5</b>	<b>94.7</b>
GZ/80	<b>90.2</b>	<b>94.1</b>	<b>93.8</b>	<b>94.4</b>	<b>93.6</b>	<b>97.4</b>	<b>94.4</b>	<b>95.7</b>		<b>93.3</b>	<b>96.7</b>	<b>98.0</b>	<b>93.9</b>
A88	<b>92.5</b>	<b>93.8</b>	<b>93.6</b>	<b>93.8</b>	<b>92.3</b>	<b>96.8</b>	<b>92.9</b>	<b>96.8</b>	<b>95.5</b>		<b>92.7</b>	<b>92.7</b>	<b>97.2</b>
Cambodia	<b>89.9</b>	<b>92.1</b>	<b>92.1</b>	<b>92.1</b>	<b>96.4</b>	<b>94.4</b>	<b>96.9</b>	<b>93.6</b>	<b>95.1</b>	<b>92.8</b>		<b>95.9</b>	<b>93.4</b>
Djibouti	<b>89.5</b>	<b>92.1</b>	<b>91.9</b>	<b>91.9</b>	<b>95.3</b>	<b>95.3</b>	<b>96.9</b>	<b>94.0</b>	<b>95.5</b>	<b>93.2</b>	<b>97.6</b>		<b>93.3</b>
WestPac74	<b>91.4</b>	<b>95.1</b>	<b>94.9</b>	<b>95.1</b>	<b>93.8</b>	<b>93.8</b>	<b>93.2</b>	<b>97.2</b>	<b>95.1</b>	<b>97.2</b>	<b>93.0</b>	<b>93.4</b>	
3' noncoding region													

\*The percentage nucleotide sequence identities of the complete genomes are shown in the upper right half of the table. The percentage nucleotide sequence identities of the 3' noncoding region of the genomes are shown in the lower left half of the table. The percentage sequence homologies between NIID04-27 and each of 12 other DENV-1 strains are shown in boldface.

To understand the genetic relationships and evolution of DENV-1 strains, we also performed phylogenetic analysis of the fully sequenced DENV-1 strains that included NIID04-27 (Figure 2). NIID 04-27 belonged to genotype IV along with A88, 98901518, 98901530, NIID03-41 and West Pac74. This cluster was called the Pacific group in a previous report (10). NIID04-27 and NIID03-41 are the first DENV-1 strains to have deletions in 3' NCR.

**Conclusions**

We have genetically characterized DENV-1 isolate NIID04-27 by determining its complete nucleotide sequence and comparing the sequence with most of the available DENV-1 full-length sequences. Sequence heterogeneity in the 3' NCR of the genus *Flavivirus* has been reported for tickborne encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, DENV-2, and DENV-4 (11-13). For example, DENV-2 isolated in Texas, Peru, Venezuela, Mexico, and Puerto Rico had a 10-nt deletion starting at

the 19th nucleotide position from the ORF termination codon (13).

The terminus of the 3' NCR has a conserved sequence and secondary structure. The functions of the 3' NCR of flaviviruses have not been fully determined. The 3' NCR in flaviviruses affects RNA replication but does not affect viral translation (14,15). Introduction of a 30-nt deletion starting at the 212th position from the ORF termination codon in the 3' NCR of DENV-4 reduced the ability of the virus to propagate in vivo and in vitro (16).

We have identified a 29-nt deletion in the 3' NCR of DENV-1 isolated from a dengue patient returning to Japan from Yap. Isolates from 3 other patients infected in the same outbreak also had the same deletion. The DENV-1 strain with a 29-nt deletion in the 3' NCR was responsible for the dengue epidemic in Yap in 2004. The biologic characteristics induced by this deletion should be further analyzed.

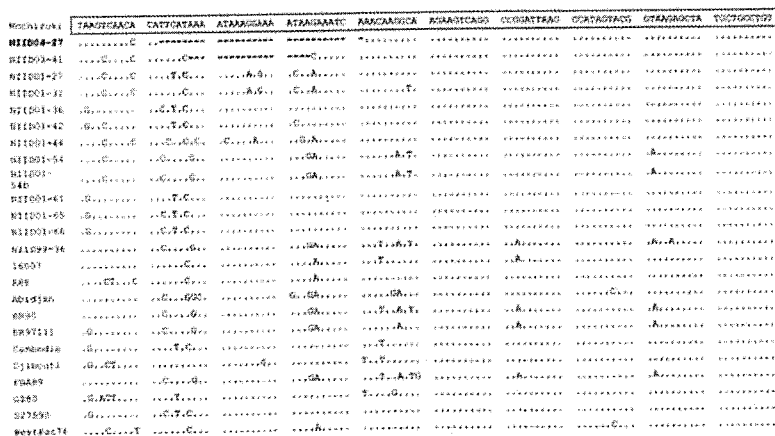


Figure 1. Nucleotide sequence alignment of the variable region in the 3' noncoding region of dengue virus type 1 strains, including NIID04-27 sequenced in the present study. The Mochizuki strain was used as the consensus sequence, and the sequence of 100 nucleotides immediately downstream of the open reading frame termination codon is shown at the top. Solid dots indicate nucleotides identical to the consensus sequence and hyphens indicate deletions.



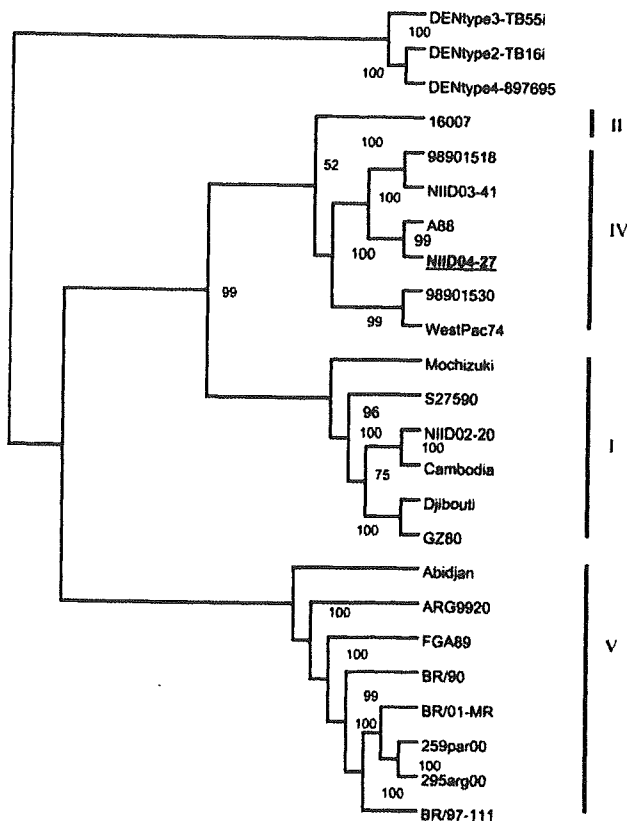


Figure 2. Phylogenetic tree based on the full-length genome sequence of 21 available dengue virus (DENV) type 1 strains and DENV-2, -3, and -4. The multiple sequence alignments were obtained with ClustalX, and the tree was constructed by the neighbor-joining method. The percentage of successful bootstrap replicates is indicated at the nodes. The NIID04-27 strain is indicated in boldface. Genotypes I, II, IV, and V correspond to DENV-1 genotypes as defined by Goncalvez et al. (10).

### Acknowledgment

We thank doctors from the various clinics and hospitals for providing us with serum samples for laboratory confirmation of dengue infection.

This work was supported by a grant for research on emerging and reemerging infectious diseases from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan.

Dr Nukui is a graduate student in the Department of Infectious Diseases, University of Tokyo, Tokyo, Japan. Her research interest is vectorborne viral diseases.

### References

1. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:33-42.

2. Takahashi M, Yamada K, Sato Y, Ikawa K, Matsumoto Y, Sano T, et al. Detection of dengue virus-infected patients among passengers at the quarantine station of the New Tokyo International Airport. *Jpn J Infect Dis.* 2002;55:215-6.
3. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:649-88.
4. Proutski V, Gritsun TS, Gould EA, Holmes EC. Biological consequences of deletions within the 3'-untranslated region of flaviviruses may be due to rearrangements of RNA secondary structure. *Virus Res.* 1999;64:107-23.
5. Markoff L. 5'-and- 3'-non coding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res.* 2003;59:177-228.
6. Savage HM, Fritz CL, Rustein D, Yolwa A, Vorndam V, Gubler DJ. Epidemic of dengue-4 virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and implication of *Aedes hensilli* as an epidemic vector. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:519-24.
7. Martin B. Dengue fever type 1 outbreak in Yap. ACTION n-20 2005: 11-2. [cited 2005 Nov 14]. Available from <http://www.spc.int/phs/ENGLISH/Publications/InformACTION/IA20-contents.htm>
8. Barrero PR, Mistchenko AS. Complete genome sequencing of dengue virus type 1 isolated in Buenos Aires, Argentina. *Virus Res.* 2004;101:135-45.
9. Tajima S, Nukui Y, Ito M, Takasaki T, Kurane I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' nontranslated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. *Virus Res.* Epub 2005 Oct 24. In press.
10. Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salasa RA, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology.* 2002;303:110-9.
11. Gritsun TS, Venugopal K, Zanotto PM, Mikhailov MV, Sall AA, Holmes EC, et al. Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs. *Virus Res.* 1997;49:27-39.
12. Nam JH, Chae SL, Won SY, Kim EJ, Yoon KS, Kim BI, et al. Short report: genetic heterogeneity of Japanese encephalitis virus assessed via analysis of the full-length genome sequence of a Korean isolate. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:388-92.
13. Shurtleff AC, Beasley DW, Chen JJ, Ni H, Suderman MT, Wang H, et al. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology.* 2001;281:75-87.
14. Holden KL, Harris E. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology.* 2004;329:119-33.
15. Tiigner M, Deas TS, Shi PY. The flavivirus-conserved pentanucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology.* 2005;331:375-86.
16. Men R, Bray M, Clark D, Chanock RM, Lai CJ. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J Virol.* 1996;70:3930-7.

Address for correspondence: Ichiro Kurane, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shimjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan; fax: 81-3-5285-1188; email: kurane@nih.go.jp

The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Centers for Disease Control and Prevention or the institutions with which the authors are affiliated.

# Inhibitory Effect of RNAi on Japanese Encephalitis Virus Replication *In Vitro* and *In Vivo*

Manabu Murakami<sup>1</sup>, Takahide Ota<sup>1</sup>, Soichi Nukuzuma<sup>2</sup>, and Tsutomu Takegami<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Division of Molecular Oncology and Virology, Medical Research Institute, Kanazawa Medical University, Ishikawa 920–0293, Japan, and <sup>2</sup>Kobe Institute of Health, Kobe, Hyogo 650–0046, Japan

Received May 16, 2005; in revised form, September 9, 2005. Accepted September 21, 2005

**Abstract:** Flaviviruses include many insect-mediated small viruses and still cause serious problems in the world. In humans, JEV can cause acute meningoencephalomyelitis, resulting in fatality rates of 5 to 40%. RNA-interference (RNAi) as an antiviral mechanism was originally discovered in plants and then found in the specific suppression of gene expression of other organisms such as *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and vertebrates. As JEV is an RNA virus, RNAi could be a reasonable approach for therapeutic purposes to use against Japanese encephalitis. In this study, we examined the effect of RNAi on JEV replication. Viral reproduction in Vero cells was decreased to 7.2% and 39.0% of control by the transfection of small interference RNAs, JCR and JN3R at 250 nM, respectively. Under the transfection of 5 µg/ml pJRI which produces stem-loop RNAi, viral reproduction was decreased to about 10% of control. Western blot analysis indicated that RNAi inhibited the translation level. We used pJRI in the animal experiment. After the inoculation of viruses at 5×10<sup>3</sup> PFU, pJRI at 1.0 and 5.0 µg/g was injected into mice i.p. JEV-infected control mice (n=5) died within 15 days. pJRI (1.0 or 5.0 µg/g)-medicated mice survived 40 or 80% at 15 days. The data clearly indicate that pJRI has highly potent inhibitory activity against JEV replication *in vivo*. The results *in vivo* and *in vitro* provide evidence that JEV replication was efficiently inhibited by RNAi and RNAis could be used as an antiviral drug against JEV infection.

**Key words:** JEV, RNAi

Flaviviruses include many insect-mediated small viruses and still cause serious problems in the world. Japanese encephalitis virus (JEV) contains a single positive-stranded RNA genome approximately 11 kb in length. JEV is widespread in southeast Asia, China, Korea and Japan, and is the causative agent for encephalitis (23). The virus has a normal transmission cycle between birds and mosquitoes but also a zoonotic transmission cycle with swine serving as amplifier hosts from which infected mosquitoes transmit the virus to humans. In humans, JEV can cause acute meningoencephalomyelitis, resulting in fatality rates of 5 to 40%. An effective vaccine is available, but multiple doses are required to confer protective immunity and some pathogenic side effects have been reported. JEV is thus a continuing public health threat (2, 9, 16). Accordingly, the development of new remedy and antiviral drugs against JEV is expected.

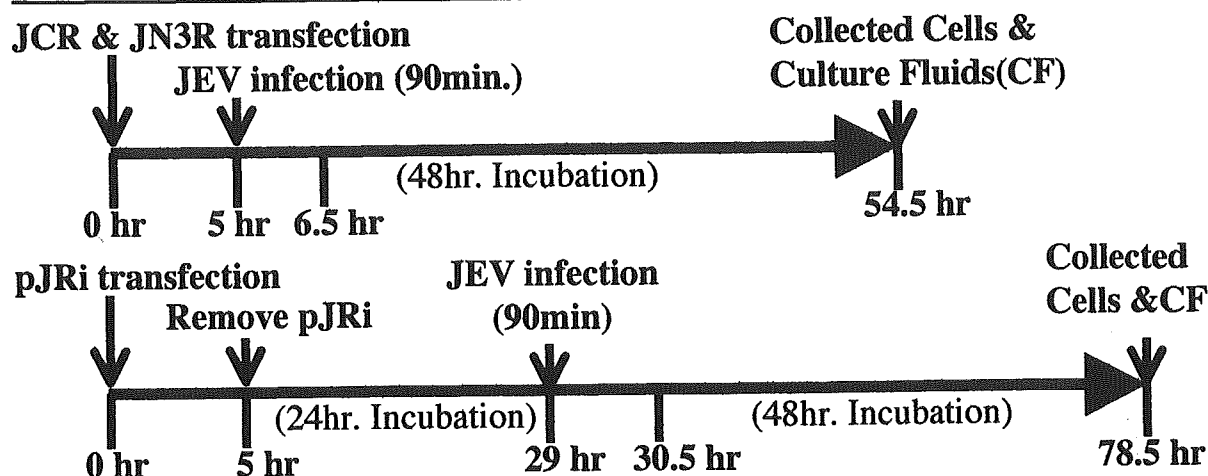
RNA-interference (RNAi) as an antiviral mechanism was originally discovered in plants and then found in other organisms such as *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and vertebrates. It is an evolutionarily conserved process for the specific suppression of gene expression (1, 3, 14). In this process, recognition of double-stranded RNA (dsRNA) leads to the production of small interference RNA (siRNA) of 21 to 23 nucleotides, which associate with a multiprotein complex known as the RNA-induced silencing complex (RISC) and ultimately target homologous mRNA for degradation based on complementary base pairing (3, 5, 6, 12, 13, 19). RNAi has been successfully used in blocking the replication of human immunodeficiency virus and human hepatitis C virus in cells and may provide a new therapeutic approach to certain diseases (7, 10, 11, 21). As JEV is an RNA virus, RNAi could be a reasonable approach for therapeutic purposes to use against Japanese encephalitis. In this study, we provide

\*Address correspondence to Dr. Tsutomu Takegami, Division of Molecular Oncology and Virology, Medical Research Institute, Kanazawa Medical University, Uchinada, Ishikawa 920–0293, Japan. Fax: +81–76–286–0521. E-mail: takegami@kanazawa-med.ac.jp

**Abbreviations:** dsRNA, double-stranded RNA; JEV, Japanese encephalitis virus; NIH, National Institutes of Health; PVDF, polyvinylidene difluoride; RISC, RNA-induced silencing complex; RNAi, RNA-interference; siRNA, small interference RNA.



### • RNAi transfection before JEV infection



### • RNAi transfection after JEV infection

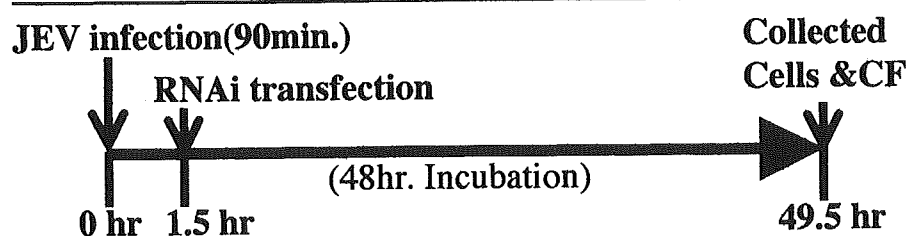


Fig. 2. Experimental design (*in vitro*). RNAi transfection before or after JEV infection: Vero and HepG2 cells were transfected with JCR (50, 100, 200 or 250 nM), JN3R (50, 100, 200 or 250 nM) and pJRi (1.25, 2.5 or 5  $\mu$ g/ml). These cells were incubated for 5 hr at 37 C in 5% CO<sub>2</sub> with 1 ml of medium containing RNAi and DMRIE-C (10  $\mu$ l) reagent complex. pJRi was transfected at 24 hr before virus infection. After virus infection, 2 ml of fresh growth medium was added and cells were placed in the incubator for an additional 48 hr.

PAGE (10% polyacrylamide) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, U.S.A.) by electroblotting. They were reacted with anti-E in the first reaction and then incubated in an anti-rabbit IgG goat serum conjugated with peroxidase (22). Finally, the reacted proteins were visualized by incubation with diaminobenzidine. Relative amounts of JEV-specific E protein were estimated by the NIH image freeware program (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/Default.html>).

**Animal studies.** Pathogen-free female ICR mice, 4 weeks old (body weight average of 22.0 g), were purchased from SANKYO LABOSERVICE, Japan (Tokyo). The mice were housed in animal quarters with controlled temperature (22–26 C), humidity (50–60%), and lighting (12 hr cycle). Five animals were used per experimental condition. ICR mice were i.p. injected with 1.0 or 5.0  $\mu$ g/g of pJRi in 0.2 ml of saline as soon as the mice were infected with JEV ( $5 \times 10^3$  PFU) per 0.2 ml of saline by i.p. Mice were

checked at intervals of 3 days for body weight, and daily for survival.

### Results

#### *Effect of JCR, JN3R and pJRi on JEV Replication in Vero and HepG2 Cells*

To examine the effect of RNAi on JEV replication, we selected the region of C (core), M (membrane) and NS3 (nonstructural protein 3) (Fig. 1). We measured the effect of RNAi on JEV replication in Vero cells at 0, 6, 12, 24 and 48 hr after JEV infection (Fig. 3). An inhibitory effect of RNAi was observed at 24 hr. In case of RNAi transfection before JEV infection, all RNAis, JCR, JN3R and JRi exhibited an inhibitory effect on JEV replication (Figs. 4 and 5). Viral reproduction in Vero cells was decreased to  $7.2 \pm 3\%$  ( $P < 0.05$ ) of control by the transfection of JCR at 250 nM. In the case of JN3R treatment, viral reproduction was  $39.0 \pm 9\%$  ( $P < 0.05$ ) of control. The antiviral activ-