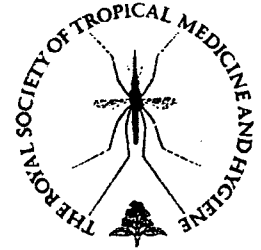




available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/trst



CASE REPORT

Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma

Y. Mizuno^{a,*}, A. Kotaki^b, F. Harada^b, S. Tajima^b,
I. Kurane^b, T. Takasaki^b

^a *Disease Control and Prevention Centre, International Medical Centre of Japan, 1-21-1, Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan*

^b *Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan*

Received 7 November 2006; received in revised form 5 February 2007; accepted 5 February 2007

Available online 5 April 2007

KEYWORDS

Dengue fever;
Dengue hemorrhagic
fever;
Diagnosis;
PCR;
Urine;
Saliva

Summary We successfully detected dengue virus (DENV) genome in urine and saliva but not in plasma samples from a Japanese dengue fever patient. The results of the present study suggest that detection of DENV genome in urine and saliva can be an effective diagnostic method, particularly for children with viral hemorrhage.

© 2007 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Case report

A 28-year-old Japanese woman visited Vietnam from June 29 to July 4 2006 and China from 4 to 10 July 2006. On 6 July, she developed a high fever with arthralgia. Six days later, maculopapular rashes appeared on her limbs. She visited our clinic (International Medical Centre of Japan) on 11 July. Although no fever or sign of hemorrhage was observed, laboratory tests showed thrombocytopenia (39 000 platelets/ μ l) and leukopenia (1730 white blood cells/ μ l). A diagnosis of

dengue fever was considered, and RT-PCR, IgM-capture ELISA and IgG ELISA were carried out (Nawa et al., 2001).

Anti-dengue virus (DENV) IgM and IgG were identified in plasma samples on days 7, 14 and 25 after the onset of symptoms (Table 1). These samples were examined for virus genome by real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) (Ito et al., 2004). DENV genome was not detected in plasma or peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples on day 7, 14 or 21. However, DENV-type 1 (DENV-1) genome was detected in urine samples on days 7, 8 and 14, and in a saliva sample on day 7.

Nucleotide sequences of PCR products from urine samples were determined with BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and PCR primers. Sequence analysis with a PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) confirmed that the detected genome

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3202 7181;
fax: +81 3 3202 1012.

E-mail addresses: yamizuno@imcj.hosp.go.jp,
mizunomd@hotmail.com (Y. Mizuno).

Table 1 Laboratory test results of plasma, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), urine and saliva specimens from a patient with suspected dengue fever

Days after onset	7	8	14	25
RT-PCR				
Plasma	—	NT	—	—
PBMC	—	NT	—	—
Urine	D1	D1	D1	—
Saliva	D1	NT	NT	—
ELISA ^a				
IgM plasma	8.97	NT	6.05	4.12
IgG plasma	2.04	NT	2.29	2.36

D1: dengue virus type 1 detected; —: virus not detected; NT: not tested.

^a IgM and IgG antibodies were considered positive when the index value was >1.1.

was that of DENV-1. The FASTA search of the GenBank database showed the two DENV-1 strains with the highest levels of homology to our isolate to be AY732479 and AY376738. The DENV-1 sequence of 446 bp of the E region showed 98.0% homology to AY732479, isolated in Thailand and 98.4% homology to AY376738, isolated in Guangdong, China (data not shown). There was very little chance of contamination because no other samples positive for DENV were processed in our laboratory at the same time. Virus isolation from the day 7 urine sample was carried out with C6/36 cells and Vero cells, but infectious virus was not isolated. Although the patient's liver enzyme levels were increased (glutamic oxaloacetic transaminase, 56 U/l; glutamic pyruvic transaminase, 76 U/l), no complications occurred during follow-up.

2. Discussion

DENV infection is usually confirmed by detection of virus genome by RT-PCR and detection of dengue-specific IgM by IgM-capture ELISA in serum or plasma samples. RT-PCR testing is sensitive only in the very early stages of the disease (Rigau-Perez et al., 1998) whereas IgM-capture ELISA testing is negative early in the course of the disease and gives only a probable diagnosis (Schwartz et al., 2000). Therefore a combination of laboratory methods is needed in order to make highly predictive diagnosis of DENV infection.

Specific antibodies in saliva have been reported to be useful alternative methods for diagnosis of DENV infection (Balmaseda et al., 2003); however, there is no reported study of detection of DENV genome in saliva to our knowledge. In the present case, we successfully detected DENV-1 genome in saliva and urine samples but not in plasma or PBMC samples. Detection of IgM provided serologic evidence of DENV infection in this case, and detection of DENV

genome confirmed infection. It is very interesting that DENV genome was detectable longer in urine and saliva than in plasma; unfortunately we are not able to explain this phenomenon. Further study is currently ongoing.

Urine and saliva samples are easy to collect without invasive procedures, and a large volume of urine can be collected. Although further study is needed, results of the present study suggest that detection of DENV genome in urine and saliva can be an effective and supportive alternative diagnostic method, particularly for children with viral hemorrhage.

Authors' contributions: TT and IK designed the study protocol and analysed the data; YM carried out the clinical assessment and drafted the manuscript; AK and ST carried out the pathological examination; FH carried out the serological examination. All authors read and approved the final manuscript. TT is guarantor of the paper.

Acknowledgements: The authors wish to thank Dr Koichiro Kudo, Director, Disease Control and Prevention Centre, International Medical Centre of Japan for critical review of this manuscript.

Funding: This study was supported in part by the grant for the Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H18-Shinkou-ippan-009).

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: Ethical Committee of the International Medical Centre of Japan, Tokyo, Japan.

References

- Balmaseda, A., Guzman, M.G., Hammond, S., Robleto, G., Flores, C., Tellez, Y., Videz, E., Saborio, S., Perez, L., Sandoval, E., Rodriguez, Y., Harris, E., 2003. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 317–322.
- Ito, M., Takasaki, T., Yamada, K.I., Nerome, R., Tajima, S., Kurane, I., 2004. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5935–5937.
- Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K.I., Akatsuka, T., Kurane, I., 2001. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J. Virol. Methods* 92, 65–70.
- Rigau-Perez, J.G., Clark, G.G., Gubler, D.J., Reiter, P., Sanders, E.J., Vorndam, A.V., 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 352, 971–977.
- Schwartz, E., Mileguir, F., Grossman, Z., Mendelson, E., 2000. Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers. *J. Clin. Virol.* 19, 169–173.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

デングウイルス感染の抗体検査に関する研究：台湾でのデング感染診断における
IgA 抗体捕捉 ELISA の評価

分担研究者 名和 優 （埼玉医科大学・講師）

研究協力者 町田早苗 （埼玉医科大学・助教）

高崎智彦 （国立感染症研究所・室長）

田島 茂 （国立感染症研究所）

原田文植 （国立感染症研究所）

Ming-Rong Harn （台湾、高雄市疾病管理センター）

倉根一郎 （国立感染症研究所・部長）

研究要旨 日本に最も近いデング流行地で熱帯に位置する台湾・高雄市のデング患者（PCR 陽性）とデング疑い患者（IgM 抗体陽性）の血清を用いて IgA 補足 ELISA 法での IgA 抗体検出を行った。PCR 陽性 34 例では、18 例が IgA 抗体陽性となった。IgA 抗体が検出されなかった例では 6 病日以前の検体がほとんどであった。判定保留 1 例を含む PCR 陰性 8 例では、ペア血清を解析できた 6 例が IgA 抗体陽性であり、残りの 1 例は IgM 抗体のみ陽性であった。IgM 抗体陽性のデング疑い 39 例では、33 例が IgA 抗体陽性となった。IgA 抗体陽性となった検体の病日を見ると 10 病日から 20 病日の検体が多かった。これは、日本人の初感染例と比較すると IgA 抗体検出病日が遅れる傾向にあった。

A. 研究目的

デング診断は、発熱後 5 日間程度の急性期では、血清中のウイルス RNA を検出して確定診断するが、それ以後の回復期では主に血清中の IgM 抗体保有で診断される。我々は、これまでに急性期を過ぎた日本人海外渡航者のデング感染例を対象に IgM 補足 ELISA 法および IgA 補足 ELISA 法を組み合わせることで、ペア血清でなくても確定診断が可能であることを示唆した。今回、日本に最も近い流行地で熱帯に位置する台湾・高雄市のデング感染患者

および感染疑い例の血清を用いて IgA 捕捉 ELISA 法での IgA 抗体保有意義について解析したので報告する。

B. 研究方法

1. 対象

台湾 高雄市の病院と医院においてデング感染の症状を認めた 87 患者（男 42：女 45、年齢 7 歳から 71 歳、平均年齢 44.6 歳）から採血した 151 血清を用いた。患者が、初感染例か再感染例かの区別は判明していない。病日については発熱などのデング感染徴候

を示した日を1病日と考え、それを基に病日を示した。

2. 方法

(1) IgA 補足 ELISA 法での IgA 抗体測定

IgA 抗体測定法は、平成16年新興・再興感染症研究事業「デング血清診断における血清中 IgA 抗体検出と有用性の検討」に報告した方法を応用した。

簡単に方法を示すと ELISA プレートに抗ヒト IgA 抗体をコーティングし、ブロッキングを行った。400倍希釈した検体を加え、検体中の IgA を捕捉した。プレートを洗浄後デングウイルス抗原および非感染コントロール抗原と一晚反応させた。再びプレートを洗浄後、酵素標識したフラビウイルス特異的モノクローナル抗体と反応させた。酵素発色後、吸光度を測定した。抗体陽性と陰性の判定は、ウイルス抗原と反応した吸光度(P)と非感染コントロール抗原の吸光度(N)との比(P/N比, rasio)が2.0以上を抗体陽性とした。

(2) IgM 補足 ELISA 法での IgM 抗体測定

IgM 抗体測定は、ELISA プレートに抗ヒト IgM 抗体をコーティングし、100倍希釈した検体を加え、その後の操作は IgA 抗体捕捉 ELISA 法に準じた。抗体陽性の判定は、P/N比が2.0以上とした。

C. 研究結果

1. PCR 陽性 34 例での IgA 抗体保有状況

発熱などのデング感染を疑わせる症状を示し、1病日から6病日に採血された患者血清中でPCR陽性となったサンプルは34例であった。PCR陽性となった時の34検体では、7検体がIgA抗体陽性と判断された。中でも1病日で検出された検体が1検体であった。また、IgA抗体陽性の7検体のうち、5検体がIgA抗体とIgM抗体共に陽性であった。

PCR陽性34例のうち、1回目の採血後7

病日から36病日までに2回目に採血できた19検体では、16検体がIgA抗体陽性となった。

1回目と2回目の検体での成績で判断すると、34例中、18例がIgA抗体陽性となった。

次にこのPCR陽性34例のIgA抗体価とIgM抗体価とその検出された病日を図1に示した。IgA抗体が検出された病日は、10病日から20病日に集中していたが、中には39病日で陽性となる検体もあった。IgMが検出された病日は、IgA抗体が検出された同時期に集中していた。

2. PCR 陰性 7 例と判定保留 1 例の IgA 抗体保有状況

1病日から5病日に採血された患者血清の中でPCR陰性7検体と判定保留1検体では、IgA抗体陽性が2検体あり、この2検体は共にIgM抗体陰性であった。また、判定保留例の血清ではIgM抗体陽性、IgA抗体陰性であった。PCR陰性の7検体では全てIgG抗体は陰性であった。その後(4病日から19病日)のサンプルが採取できた7検体を解析すると6検体が、IgA抗体とIgM抗体共に陽性であったが、1検体は、IgM抗体のみ陽性であった。1回目の採血でPCR陰性かつIgA抗体陽性だった2検体では2回目の検体でIgM抗体陽性、IgA抗体陽性であった。

3. IgM 抗体陽性 39 例における IgA 抗体保有状況

発熱や紫斑などの出血傾向を示したデング感染を疑わせる症状を示し、1病日から22病日に採血された患者血清中でIgM陽性となったデング疑い例は39例であった。39例、56検体を解析すると6例がIgA抗体陰性と判定された。この6例は、2病日から5病日の1検体だけの採血であり、その後の採血ができなかった。また、6例の患者年齢は32歳から54歳であった(表1)。

4. IgA 抗体価と病日

今回解析した 150 検体と採血病日を図 2 に示した。10 病日から 20 病日以前に採血された検体で IgA 抗体が多く検出され、4 日から 20 病日の検体で抗体価が高かった。

D. 考察

日本に最も近いデング流行地で熱帯に位置する台湾・高雄市のデング患者（PCR 陽性）とデング疑い患者（IgM 抗体陽性）の血清を用いて IgA 抗体検出を行った。PCR 陽性となった 1 病日から 6 病日に採血された患者血清 34 検体では、7 検体が IgA 抗体陽性と判断された。それ以後に採血された血清を含め 54 検体を検出すると IgA 抗体陽性例は 34 例中 18 例が IgA 抗体陽性となった。IgA 抗体が検出されなかった例では 6 病日以前の検体が多かった。また、IgA 抗体陽性と抗体価の分布をみると 4 病日から 20 病日までに抗体価の高い検体が多く、10 病日～20 病日に IgA 抗体が検出される検体が多かった。日本人の海外でデングに罹患した初感染例では発熱後 5～6 病日位で IgA 抗体が検出でき、IgM 抗体の検出病日より 1 日程度早く検出される傾向であったと我々は解析しているが、台湾でのデング患者ではその IgA 抗体検出病日は遅くなるのは、日本人ではデングウイルスと同じフラビウイルス科である日本脳炎ワクチン接種しているので抗体産生が早まる可能性があるかもしれないと考えている。今後、台湾での多くの検体を検討して IgA 抗体検出病日を決定し、台湾の日本脳炎ワクチン接種暦とデング感染時の抗体産生との関連性について詳細な解析をして解明したい。

判定保留 1 例を含む PCR 陰性 8 例では PCR 陰性時でも 2 例の IgA 抗体が陽性となり、2 例は IgM 抗体陰性であった。その後の採血が可能であった 7 例中で 6 例が IgA 陽性であり、残りの 1 例は IgM 抗体のみ陽性であった。急性期の PCR 陰性血清でもその後の

ペア血清の IgA 抗体を検出すると抗体陽性率が高かった。これは発疹その他のデング感染を疑う例ではペア血清を採血し、IgA 抗体と IgM 抗体解析すると診断可能となった例を示す結果となった。

IgM 抗体陽性 39 例における IgA 抗体陽性例は 33 例であった。IgA 抗体陰性例では、32 歳から 61 歳までの年齢で他の基礎疾患の影響で IgM 抗体陽性となった可能性もあり、その点を再調査すると結果が明確になると考えられた。

流行地での解析で IgM 抗体は、感染後 8 ヶ月まで検出される例もあるとの報告があるが、今回検討した例では、16 病日で IgM 抗体 IgA 抗体共に陽性、40 病日 IgA 抗体陰性となった例があり、IgM 抗体は長期間陽性となり、IgA 抗体は陰性となった例である。この例を考えると我々が日本人患者で示唆してきた IgA 抗体は IgM 抗体のように長く続かないということが、流行地での検体でも示されたが、更に多くのサンプル数を検討し、解析したい。

E. 結論

1. PCR 陽性 34 例では、18 例が IgA 抗体陽性となった。IgA 抗体が検出されなかった例では 6 病日以前の検体がほとんどであった。

2. 判定保留 1 例を含む PCR 陰性 8 例では、ペア血清を解析できた 6 例が IgA 抗体陽性であり、残りの 1 例は IgM 抗体のみ陽性であった。PCR 陰性でも疑いが強い例ではペア血清で解析すると診断できる可能性が示唆された。

3. IgM 抗体陽性のデング疑い 39 例では、33 例が IgA 抗体陽性となった。

4. IgA 抗体陽性となった検体の病日を見ると 10 病日から 20 病日の検体が多かった。これは、日本人の初感染例と比較すると IgA 抗体検出病日が遅れる傾向にあるが、多数

の検体を解析し結論を出したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nawa M, Pan C-Y, Tsai W-H, Chan C-D, Machida S, Takasaki T, Lim CK, Harn M-R, Kurane I. Evaluation of immunoglobulin A-capture enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of dengue virus infection. Dengue Bulletin, 30: 157-161, 2006.

2. 学会発表

町田早苗, 名和 優, 高崎智彦, Ming-Rong Harn, 倉根一郎. 台湾でのデング感染診断における IgA 抗体捕捉 ELISA の評価. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 19 年 5 月 18-19 日, 白山市.

H. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1

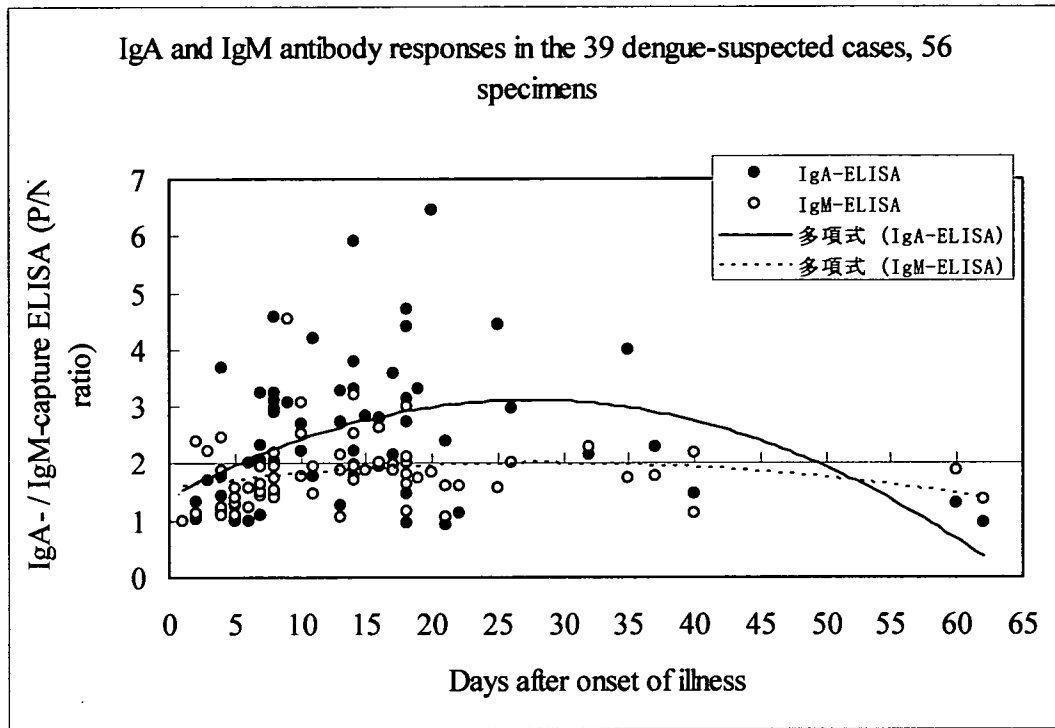
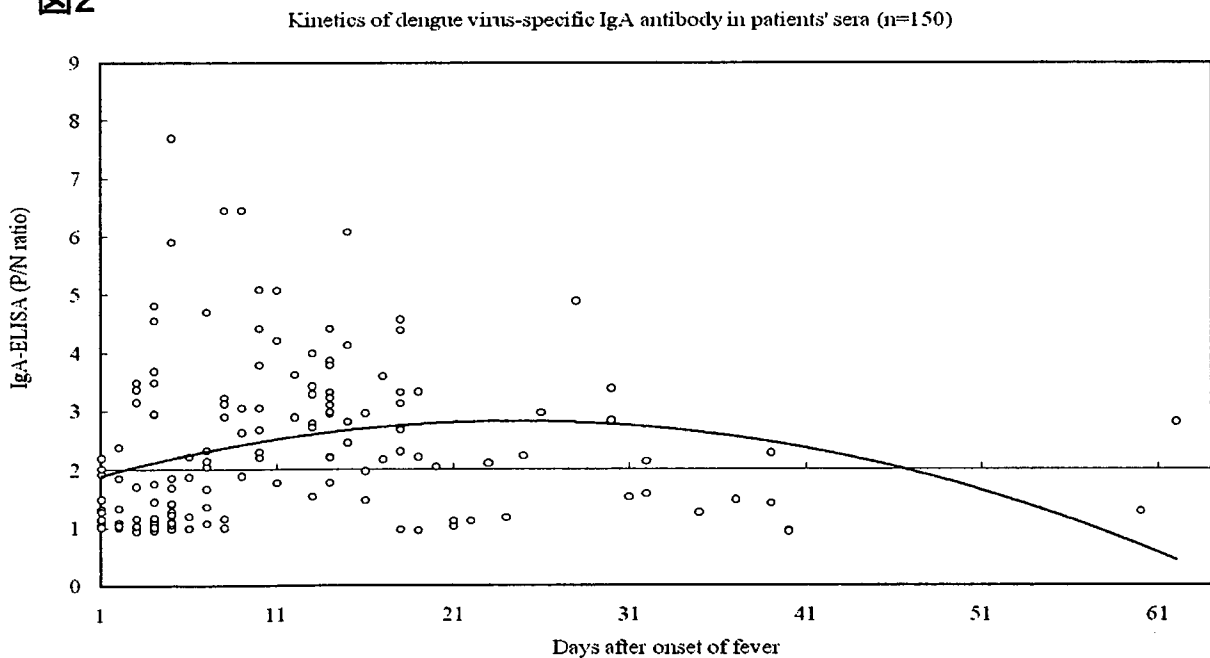


表1 IgM抗体陽性・IgA抗体陰性

	年齢・性別	IgM 抗体	IgA 抗体	病日
1	54 F	+	-	2
2	55 F	+	-	3
3	32 M	+	-	4
4	61 F	+	-	4
5	44 M	+	-	5
6	46 F	+	-	5

図2



日本脳炎の病原性を規定するウイルス因子の同定

分担研究者 高崎 智彦（国立感染症研究所ウイルス一部二室 室長）
研究協力者 倉根 一郎（国立感染症研究所ウイルス一部 部長）
田島 茂（国立感染症研究所ウイルス一部二室 主任研究官）
貫井 陽子（国立感染症研究所ウイルス一部二室 流動研究員）

研究要旨 日本脳炎ウイルス(JEV)は遺伝子配列より5つの genotype に分類される。国内で検出される JEV は1990年代初頭にゲノタイプが3型から1型へと変化した。これまでの検討で、3型の Beijing-1 株と比し1型の Mie41 株は Vero 細胞上のプラークサイズが大きい一方で、病原性が低いことが明らかとなっている。そこで今回 JEV の増殖性及び病原性を規定するウイルス因子の同定を試みた。昨年度までの解析で JEV の E 蛋白質がウイルスの増殖性や病原性に関与することが明らかとなった。そこで Beijing-1 株と Mie41 株における E 蛋白質の配列を比較したところ、8 アミノ酸の相違が認められた。さらに領域を絞り込むため点変異体を作成し解析を行ったところ123番目のアミノ酸が JEV の増殖性、病原性を規定する主要な因子であることが明らかとなった。またこのアミノ酸変異はウイルスの接着効率に大きく影響を与える可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス(JEV)は遺伝子配列より5つの genotype に分類される。日本では1990年以前の分離株は genotype 3型が主流であったが、近年の分離株は genotype 1型へと変化しており、同様の現象はベトナム、韓国などでも観察される。我々のこれまでの検討で3型の Beijing-1株と比し1型の Mie41株は Vero 細胞上のプラークサイズが大きい一方で、病原性が低いことが明らかとなっている。そこで今回 JEV の増殖性や病原性を規定するウイルス因子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

昨年度構築した JEV genotype1 型完全長 cDNA クローン及びウイルス産生系を使用し、genotype 3型 Beijing-1 株との点変異体を作成した。哺乳類由来 Vero 細胞、神経系由来 N18 細胞内での増殖能や DDY マウスでの病原性につき解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究における動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会により承認された。

C. 研究結果

昨年までの解析結果より JEV の E 蛋白質がウイルスの増殖性、病原性を規定することが明らかとなった。そこで Beijing-1 株と Mie41 株における E 蛋白質の配列を比較したところ、8 アミノ酸の相違が認められた (図 1)。さらに領域を絞り込むため前半 4 アミノ酸を Beijing-1 株に置換したキメラウイルス (nE)、後半 4 アミノ酸を置換したキメラウイルス (cE) を作成し細胞内での増殖や病原性を解析したところ、前半 4 アミノ酸が重要であることが判明した。そこで前半 4 アミノ酸相違部位 (123、129、222、227 番目のアミノ酸) を Beijing-1 株と置換した点変異体を作成し解析を行った。Vero 細胞、N18 細胞での増殖能は 123 番目のアミノ酸を置換した (S→R) 変異体 (123m) でのみ Beijing-1 株と類似した性質を示した。またマウスの病原性解析では図 2 に示したように 123m のみ Beijing-1 株や nE 同様高い死亡率を呈した。感染マウスの神経症状も大きく異なっており、Mie41 株では後肢の弛緩性麻痺を呈するものの大多数のマウスが生存したが、一方 Beijing-1 株や E 蛋白質キメラ、nE、123m のマウスは異常行動や体重減少などの明らかな脳炎症状を呈し死亡した。このような神経症状の差異を明らかにするため病理学的検討を国立感染症研究所感染病理部の協力の下行った。Mie41 株では大脳皮質、腰髄に軽度の細胞浸潤やウイルス抗原陽性を認めるのみであったが、Beijing-1 株や上記キメラ群では大脳、脊髄全般に強い細胞浸潤やウイルス抗原陽性を認め、このアミノ酸変異は中枢神経内でのウイルス増殖にも深く関与していることが示唆された。またこのアミノ酸変異がウイルスの感染サイクルのどのステップに影響を与えるのかを検討したと

ころ図 3 に示したように Beijing-1 株、nE、123m でヘパリンへの高い吸着能を呈し、ウイルスの細胞への接着効率に大きく影響を与える可能性が示唆された。

D. 考 察

今回の検討より JEV E 蛋白質の 123 番目のアミノ酸がウイルスの哺乳類細胞内での増殖や病原性を規定する主要な因子であることが明らかとなった。またこのアミノ酸変異によりウイルスの接着能に大きな影響を与える可能性が示唆された。今後 JEV の細胞への接着に重要と考えられるグリコサミノグリカンとの結合能を詳細に評価する予定であり、これらの糖鎖結合部位は新たな治療の標的因子になりうることも考えられる。また近年分離されている genotype1 型の低病原性はマウス脳内でのウイルスの低増殖性に起因する可能性が示唆された。今後も日本脳炎患者数やブタの JEV 抗体保有率、豚、蚊、ヒトよりの JEV 分離などにより更にサーベイランスを進め JEV 病原性の解明につき詳しく解析を行う必要がある。

E. 結 論

JEV の細胞内での増殖性やマウスへの病原性を規定する主要な因子は E 蛋白質の 123 番目のアミノ酸である。

F. 健康危機情報

な し

G. 研究発表

1. 論文発表

Nerome R, Tajima S, Takasaki T, Yoshida T, Kotaki A, Lim CK, Ito M, Sugiyama A, Yamauchi A, Yano T, Kameyama T, Morishita I, Kuwayama M, Ogawa T, Sahara K, Ikegaya A, Kanda M, Hosoya Y, Itokazu K, Onishi H, Chiya S, Yoshida Y, Tabei Y,

Katsuki K, Tabata K, Harada S, Kurane I. Molecular epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus isolates from swine in Japan from 2002 to 2004. *J Gen Virol.* 2007 88:2762-2768.

Y. Mizuno, A. Kotaki, F. Harada, S. Tajima, I. Kurane, T. Takasaki. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Trans. R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(7):738-739.

Nawa M., Machida S, Takasaki T, Kurane I. Plaque formation by Japanese encephalitis virus bound to mosquito C6/36 cells after low pH exposure on the cell surface. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2007 60: 118-120.

Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with downregulation of vascular endothelial cadherin. *J Gen Virol.* 2008 Mar;89, 642-52.

Ito M, Yamada K, Takasaki T, Pandey B, Nerome R, Tajima S, Morita K, Kurane I. Phylogenetic analysis of dengue viruses isolated from imported dengue patients: possible aid for determining the countries where infections occurred. *J Travel Med.* 2007 Jul-Aug;14(4):233-44.

Tajima S, Nukui Y, Takasaki T, Kurane I. Characterization of the variable region in the 3' non-translated region of dengue type 1 virus. *J Gen Virol.* 2007 Aug;88(8):2214-22.

Tajima S, Takasaki T, Kurane I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes.* 2008 Feb 21; [Epub ahead of print]

2. 学会発表

Yoko Nukui, Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Definition on the major determinant responsible for neurovirulence of Japanese encephalitis virus. *American Society of Tropical Medicine and*

Hygiene 56 th Annual Meeting, 2007年11月4-8日 Philadelphia, USA

貫井陽子、田島 茂、林 昌広、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスの Genotype shift の解明. 2007年4月11-12日 第81回 日本感染症学会学術集会 京都市

貫井陽子、田島 茂、林 昌広、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのE遺伝子が病原性を規定する. 2007年10月11-12日 第12回 日本神経感染症学会学術集会 福岡市

貫井陽子、田島 茂、林 昌広、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスの病原性を規定するウイルス因子の同定. 2007年10月21-23日 第55回 日本ウイルス学会学術集会 札幌市

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図 1. Beijing-1 株、 Mie41 株の E 蛋白質アミノ酸の相違部位

Beijing-1	1	FNCLGMGNRDFIEGASGATWVDLVLEGDSCLTIMANDKPTLDVRLNIFASOLAEVRSYCYHASVTDISTVARCPTTGEA	80
Mie41	1	FNCLGMGNRDFIEGASGATWVDLVLEGDSCLTIMANDKPTLDVRLNIFASOLAEVRSYCYHASVTDISTVARCPTTGEA	80
Beijing-1	81	HNEKRADSSYVCKQGFTDRGWNGCGFLFGKGSIDTCAKFSCTSKIRMLQDENIKYEVGIFVHGTTSENHGNYSQVGG	160
Mie41	81	HNEKRADSSYVCKQGFTDRGWNGCGFLFGKGSIDTCAKFSCTSKIRMLQDENIKYEVGIFVHGTTSENHGNYSQVGG	160
Beijing-1	161	ASQAAKFTVTPNAPSITLKLGDYGEVTLDCPEPRSLNTEAFYVMTVGSKSFVHREWFHLSLDPWTSPTSTAWRNRELLM	240
Mie41	161	ASQAAKFTVTPNAPSITLKLGDYGEVTLDCPEPRSLNTEAFYVMTVGSKSFVHREWFHLSLDPWTSPTSTAWRNRELLM	240
Beijing-1	241	EFERAHATKQSVVALGSQEGGLHQALAGAIVVEYSSSVKLTSCHLKCRIMDKLALKGTTYGMCTEKFSFAKNPADTGGC	320
Mie41	241	EFERAHATKQSVVALGSQEGGLHQALAGAIVVEYSSSVKLTSCHLKCRIMDKLALKGTTYGMCTEKFSFAKNPADTGGC	320
Beijing-1	321	TVVIELSNVSGSDGPKIPIVSVASLNDMTPVGRVLTVPVATSSANAKVLVEMEPFGDSYIVVGRGDKQINHHWYKAG	400
Mie41	321	TVVIELSNVSGSDGPKIPIVSVASLNDMTPVGRVLTVPVATSSANAKVLVEMEPFGDSYIVVGRGDKQINHHWYKAG	400
Beijing-1	401	STLGKAFSTTLKGAQRLLAALGDTAWDFSGIGGVFNSIGKAVHQVFGGAFRTLFGGMSWITQGLMGALLLWNGVNRDRSI	480
Mie41	401	STLGKAFSTTLKGAQRLLAALGDTAWDFSGIGGVFNSIGKAVHQVFGGAFRTLFGGMSWITQGLMGALLLWNGVNRDRSI	480
Beijing-1	481	ALAFLATGGVLVFLATNVHA	500
Mie41	481	ALAFLATGGVLVFLATNVHA	500

図 2 マウスでの病原性解析

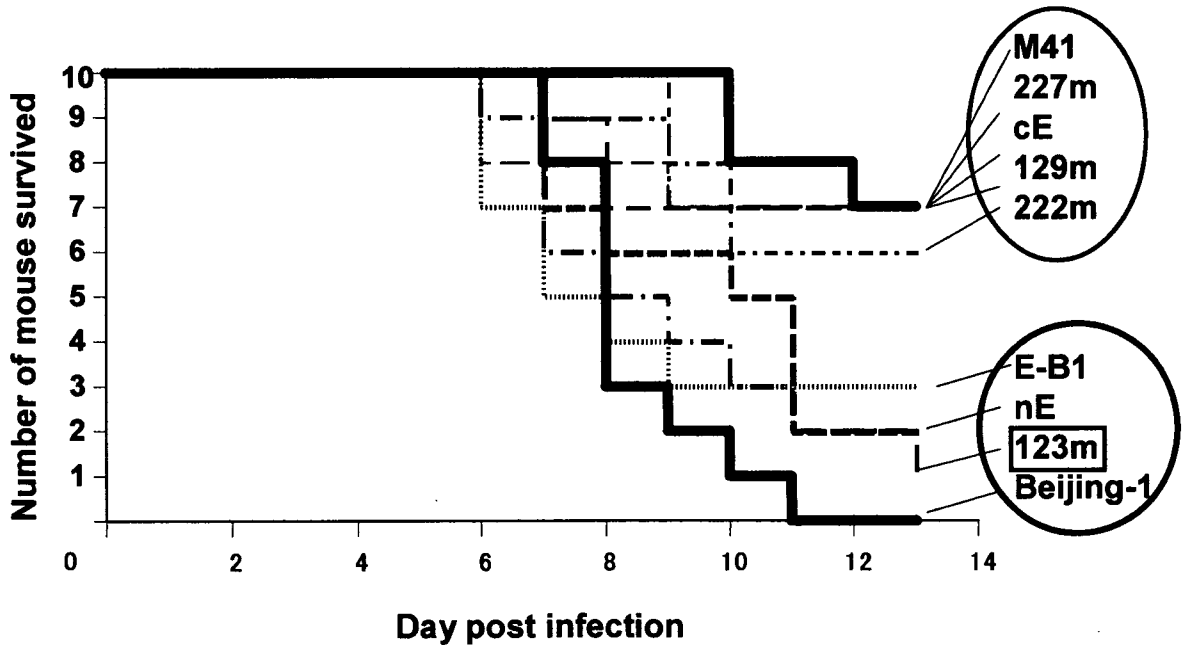
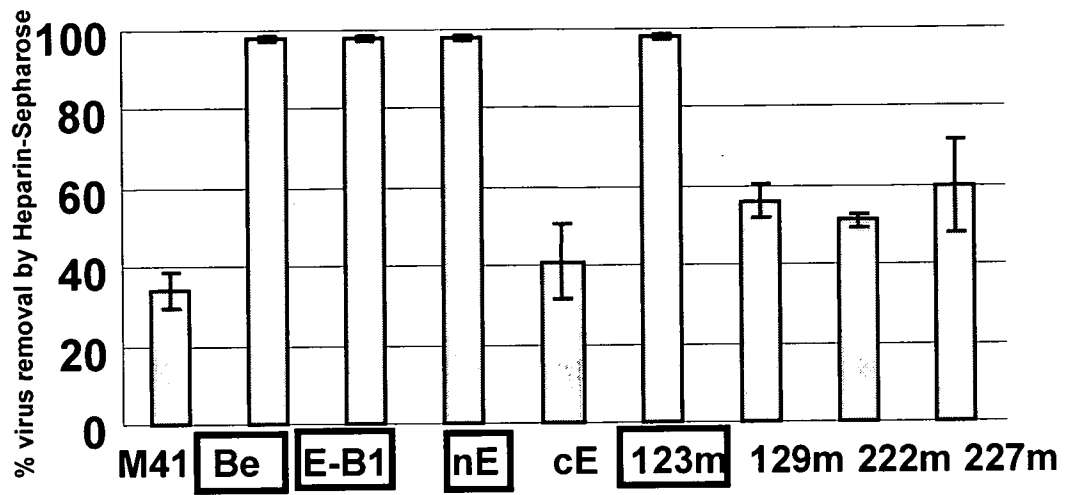


図 3 JEV 接着能の比較



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

デング 1 型ウイルス NS1 糖鎖付加部位変異がウイルス複製におよぼす影響

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部・部長）
研究協力者 田島 茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官）
高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部第 2 室・室長）

研究要旨 フラビウイルスの非構造蛋白質 NS1 は、分子量 45-50kDa の糖蛋白質であり、小胞体や細胞膜上に局在し、また細胞外にも分泌される。ウイルスゲノムの複製や疾患の重症化に NS1 が関与するとの報告があるが、その機能・作用機序は不明である。黄熱ウイルスにおいて NS1 に 2 箇所ある N 型糖鎖付加部位のうち一方（130 番目）を変異させると、ウイルスの複製能および病原性が低下することが報告されている。一方デング 2 型ウイルスにおいても同様の解析が 2 グループでなされたが、一部相反する結果があり、糖鎖付加の意義は明確になっていない。今回我々はデング 1 型ウイルス（DENV-1）の増殖における NS1 糖鎖付加の意義について解析した。DENV-1 感染性分子クローンを用いて、糖鎖付加部位である 130 番目と 207 番目の Asn を、一方および両方を Ala に置換したクローンを作製した。各クローンより合成したゲノム RNA を Vero、ヒトヘパトマ由来 Huh-7 および蚊由来 C6/36 の各細胞に導入しウイルス産生を試みたところ、いずれの細胞においても 130Ala を有するゲノム RNA (130Ala RNA) からのウイルスの増殖は確認できなかった。この 130Ala RNA と、野生型あるいは 130Ala 変異 NS1 発現プラスミドを同時に細胞に導入し、合成されるウイルス RNA 量を比較した。野生型 NS1 を共発現させることで 130Ala RNA 量の増加が観察された。さらにこれらの細胞の培養上清を各 NS1 発現プラスミドを導入した細胞に加えたと、野生型 NS1 発現細胞においてのみ細胞内および培養上清中のウイルス RNA 量の増加が観察された。野生型あるいは 130Ala NS1 発現プラスミドを導入した細胞に野生型 DENV-1 を接種し、各細胞から産生される感染性ウイルス量を比較した。NS1 非発現および野生型発現細胞に比べ 130Ala NS1 発現細胞からのウイルス産生は著しく低下していた。DENV-1 NS1 の糖鎖付加部位である 130 番目の Asn がウイルス増殖に重要な役割を果たすことが明らかとなった。またゲノム外から強制的に発現させた NS1 が、ウイルス複製に対しドミナントに作用できることが明らかとなった。

A. 研究目的

デング熱はデングウイルスの感染によって引き起こされる急性熱性疾患である。デング熱は予後のよい疾患であるが、一部のデングウイルス感染者では重篤で致死的なデ

ング出血熱を発症することがある。デングウイルスは主にネッタイシマカやヒトスジシマカによって媒介されることから、デングウイルス感染症がみられるのはこれらの蚊の存在する地域である東南アジア、南ア

ジア、中南米、カリブ海諸国、アフリカ中央部、オーストラリア北部、南太平洋群島、中国南部、台湾などの世界の熱帯・亜熱帯地域である。デングウイルスはヒトからヒトへの感染はない。同じく蚊によって媒介される日本脳炎ウイルスにおけるブタのような増幅動物も存在しないが、ヒト-蚊-ヒトの感染サイクルにより維持される。さらに、ヒトの生活環境にネッタイシマカが適応していることから、デングウイルス感染症は人口密集地を中心に拡大しつつある。全世界では、年間約1億人がデング熱を、また約25-50万人がデング出血熱を発症し、デング出血熱患者のうち約1-5%が死亡していると推定されていることから、デングウイルス感染症は世界で最も深刻なヒト感染症のひとつに挙げられる。現在日本国内での感染はないが、上記地域への海外渡航者の増加に伴い、帰国後発症する例も増加傾向にある。また近年の地球温暖化等により、本感染症の常在地域は台湾南部にまで北上していることから、本国にとっても脅威となりつつある。デング感染症予防における最も重大な問題は、ワクチンが未だ開発途上にある点である。そのような中、一部の海外製薬会社はデングウイルスに対する抗ウイルス薬の開発を行っている。製薬会社は、構造蛋白質や、非構造蛋白質のなかでもウイルス増殖に関わる酵素蛋白質を標的として開発を進めていると考えられる。

デングウイルスを含むフラビウイルスの非構造蛋白質 NS1 は、分子量 45-50kDa の糖蛋白質であり、小胞体や細胞膜上に局在し、また細胞外にも分泌される。ウイルスゲノムの複製や疾患の重症化に NS1 が関与するとの報告があるが、その機能・作用機序は不明である。黄熱ウイルスにおいて NS1 に

2箇所ある N 型糖鎖付加部位のうち一方 (130 番目) を変異させると、ウイルスの複製能および病原性が低下することが報告されている。一方デング 2 型ウイルスにおいても同様の解析が 2 グループでなされたが、一部相反する結果があり、糖鎖付加の意義は明確になっていない。今回我々はデング 1 型ウイルス (DENV-1) の増殖における NS1 糖鎖付加の意義について解析した。

B. 研究方法

DENV-1 感染性分子クローン rDENV-1(02-20)/pMW119 (Tajima et al., *Virus Research* 116:38-44, 2006) を用いて、糖鎖付加部位である 130 番目と 207 番目の Asn を、一方および両方を Ala に置換したクローン (rDENV-1-130Ala、-207Ala、および-130.207Ala/pMW119) を作製した (図 1)。各クローンより合成したゲノム RNA を Vero、ヒトヘパトマ由来 Huh-7 および蚊由来 C6/36 の各細胞に導入しウイルス産生を試みた。ウイルスの増殖は、プラーク形成法による力価測定ならびにウイルスゲノムに特異的なプライマーを用いた PCR 法により行った。ゲノム外から発現させた野生型および変異型 NS1 がウイルス複製の及ぼす効果を調べるため、rDENV-1-130Ala RNA と、野生型あるいは 130Ala 変異 NS1 発現プラスミドを同時に細胞に導入し、合成されるウイルス RNA 量を PCR 法により比較した。培養上清中の感染性ウイルス粒子の有無を調べるため、これらの細胞の培養上清を、各 NS1 発現プラスミドを導入した細胞に加えたのち、経時的に細胞内および培養上清中のウイルス RNA 量を測定した。野生型あるいは 130Ala 変異 NS1 発現プラスミドを導入した細胞に野生型 DENV-1(02-20) を接種し、各細胞から産生される感染性ウイルス

量を比較した。

C. 研究結果

1) DENV-1 感染性分子クローン rDENV-1(02-20)/pMW119 を用いて、糖鎖付加部位である 130 番目と 207 番目の Asn を、一方および両方を Ala に置換したクローン (rDENV-1-130Ala、-207Ala、および -130.207Ala/pMW119) を作製後、各クローンより合成したゲノム RNA を Vero、ヒトヘパトーマ由来 Huh-7 および蚊由来 C6/36 の各細胞に導入しウイルス産生を試みた (図 2、3、表 1)。するといずれの細胞においても 130Ala を有するゲノム RNA からのウイルスの増殖は確認できなかった。

2) rDENV-1-130Ala RNA と、野生型あるいは 130Ala 変異 NS1 発現プラスミドを同時に細胞に導入し、合成されるウイルス RNA 量を比較した (図 4)。野生型 NS1 を共発現させることで rDENV-1-130Ala RNA 量の増加が観察された。さらにこれらの細胞の培養上清を、各 NS1 発現プラスミドを導入した細胞に加えたところ、野生型 NS1 発現細胞においてのみ細胞内および培養上清中のウイルス RNA 量の増加が観察された (図 5)。

3) 野生型あるいは 130Ala 変異 NS1 発現プラスミドを導入した細胞に野生型 DENV-1(02-20) を接種し、各細胞から産生される感染性ウイルス量を比較した (図 6)。NS1 非発現および野生型発現細胞に比べ 130Ala 発現細胞からのウイルス産生は著しく低下していた。

D. 考察

DENV-1 NS1 の糖鎖付加部位である 130Asn が哺乳動物および蚊由来株化細胞でのウイルス増殖に重要な役割を果たすことが明らかとなった。一方 207Asn は増

殖に必須でないことが明らかとなった。またウイルスゲノム外から強制発現させた NS1 が、ウイルス複製に対しドミナントに作用できることが明らかとなった。これにより NS1-defective DENV-1 ゲノムと野生型 NS1 の共導入により、ウイルス産生が起こることを確認した。一方、NS1130mF は野生株 DENV-1 の増殖に対し、ドミナントネガティブに働くことが明らかとなった。このゲノム外発現法により、比較的容易に NS1 蛋白の機能解析が可能と考えられる。またこの方法は他のウイルス蛋白質にも適用可能と思われる。NS1 はウイルス増殖の上で非常に重要な役割を果たしていることが確実となった。今後 NS1 の機能解析が進めば、本蛋白質を標的とした抗ウイルス薬開発も行われるかもしれない。

E. 結論

DENV-1 NS1 の糖鎖付加部位である 130Asn が哺乳動物および蚊由来株化細胞でのウイルス増殖に重要な役割を果たすことが明らかとなった。ウイルスゲノム外から発現させた野生型および変異型 NS1 がドミナントに作用することが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tajima, S., Takasaki, T. and Kurane, I. (2008) Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes* (in press).

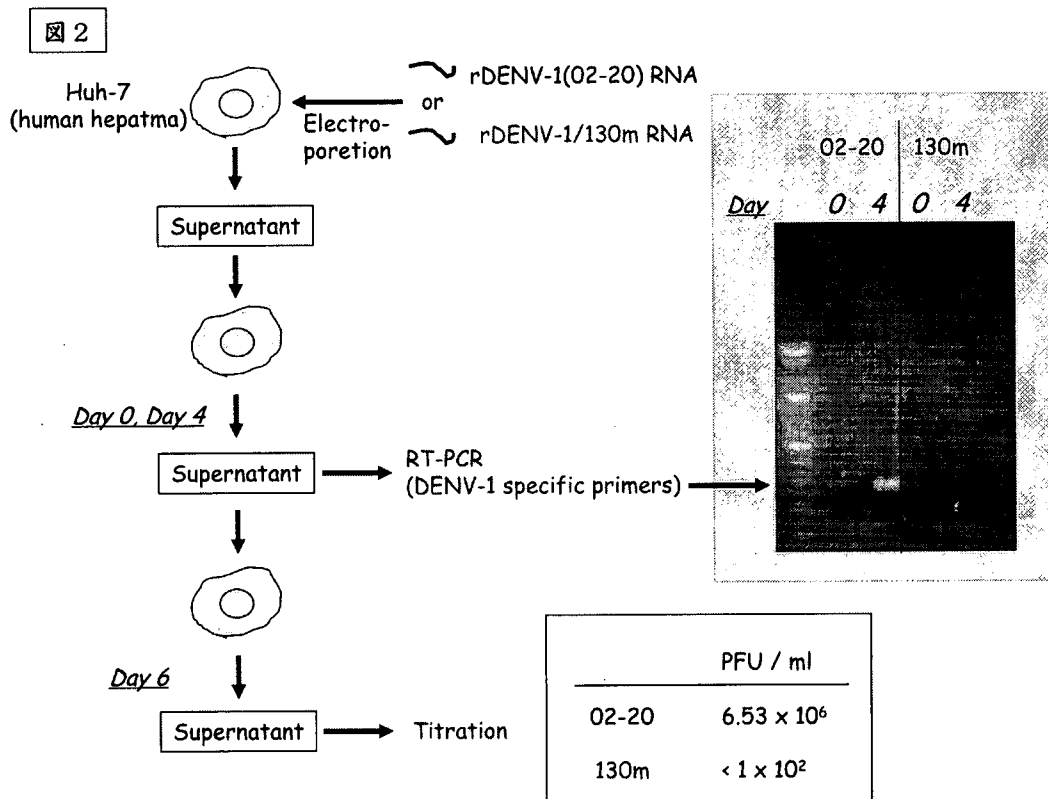
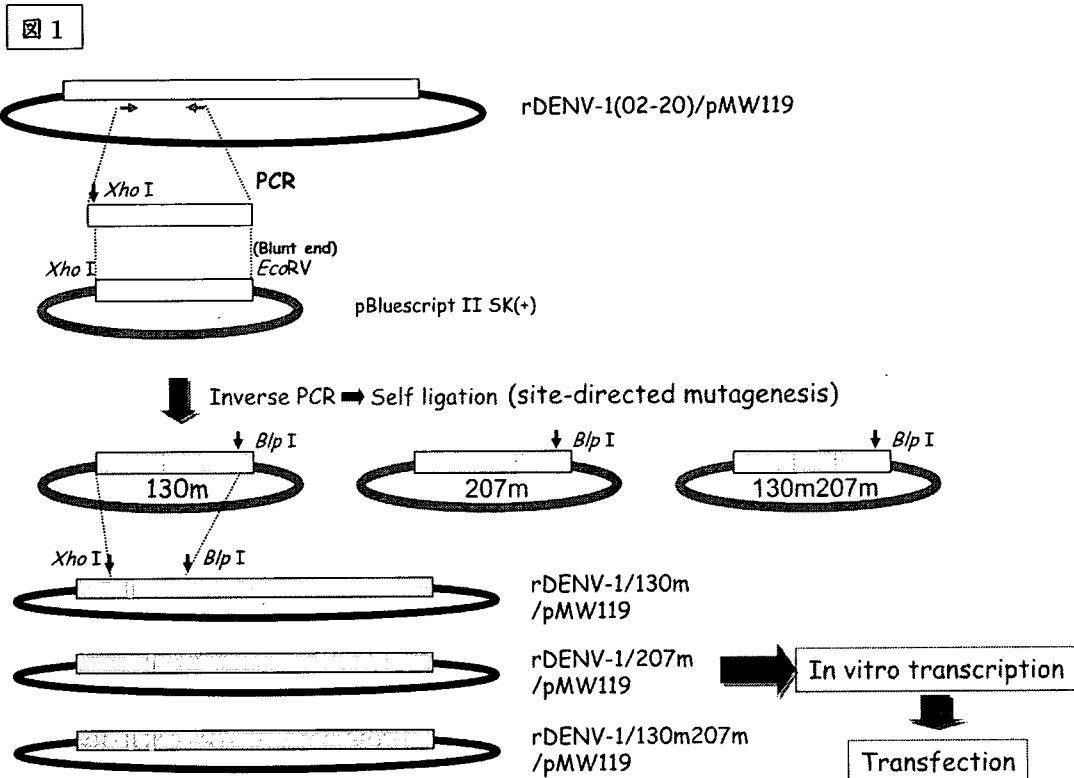
2. 学会発表

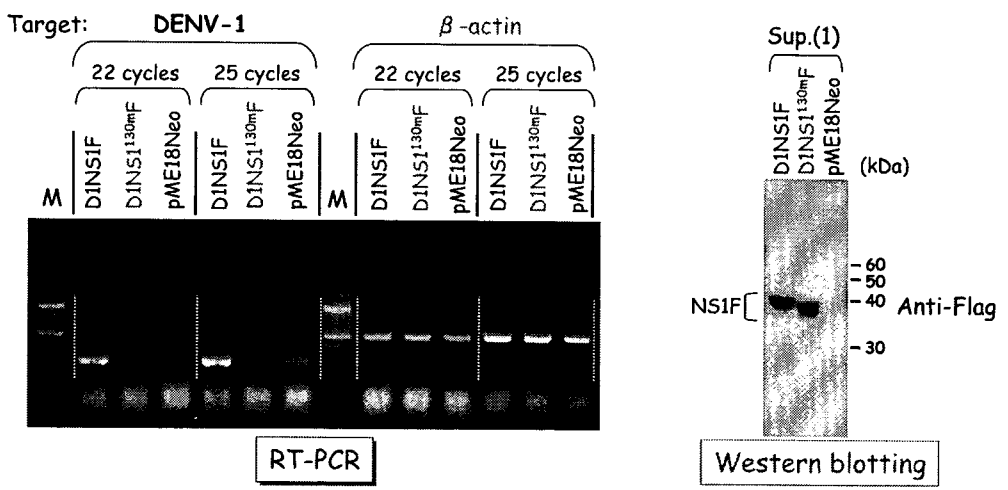
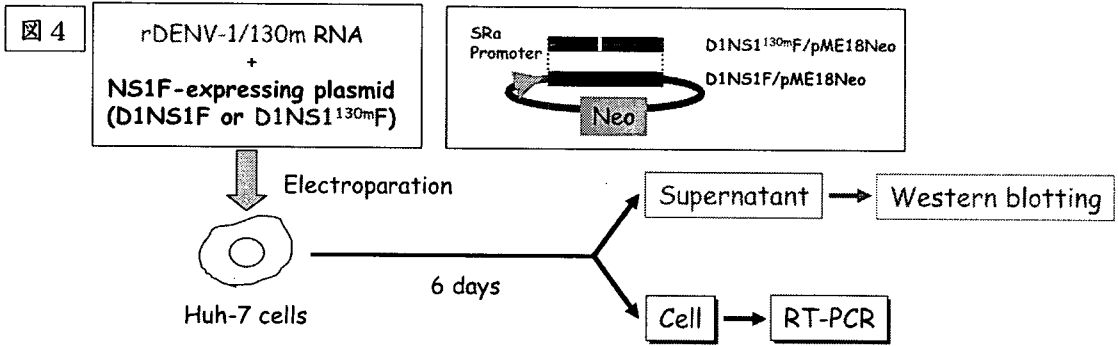
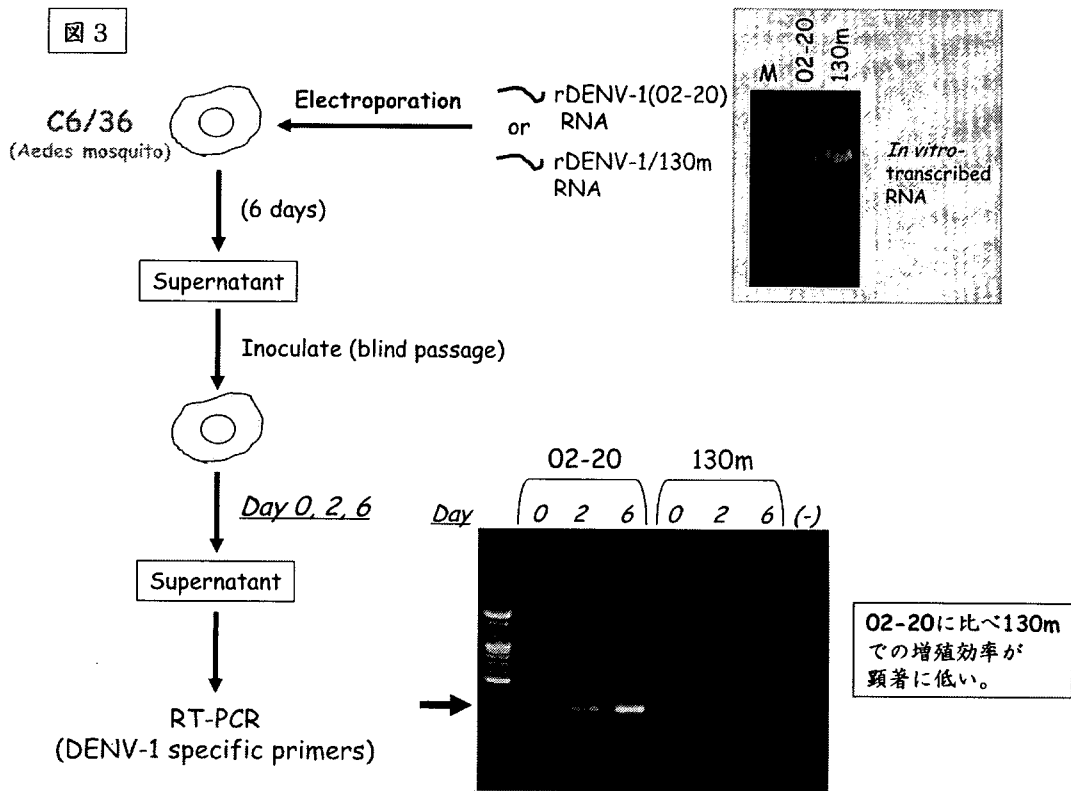
田島 茂、高崎智彦、倉根一郎. デング 1 型ウイルス NS1 糖鎖付加部位変異がウイルス複製に及ぼす影響. 第 55 回日本ウイル

ス学会学術集会. 2007年10月(札幌)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし。





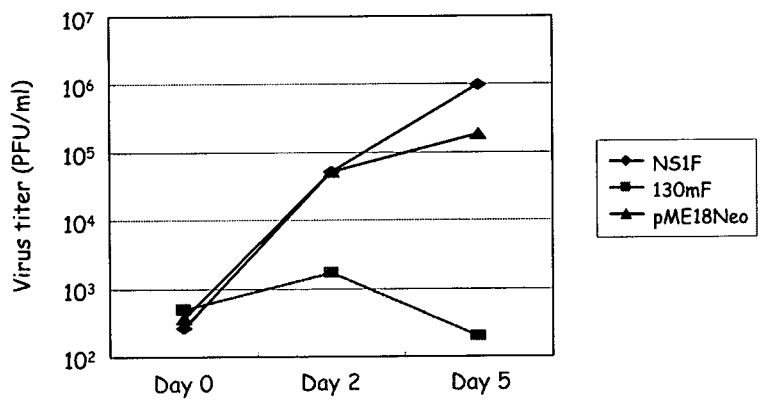
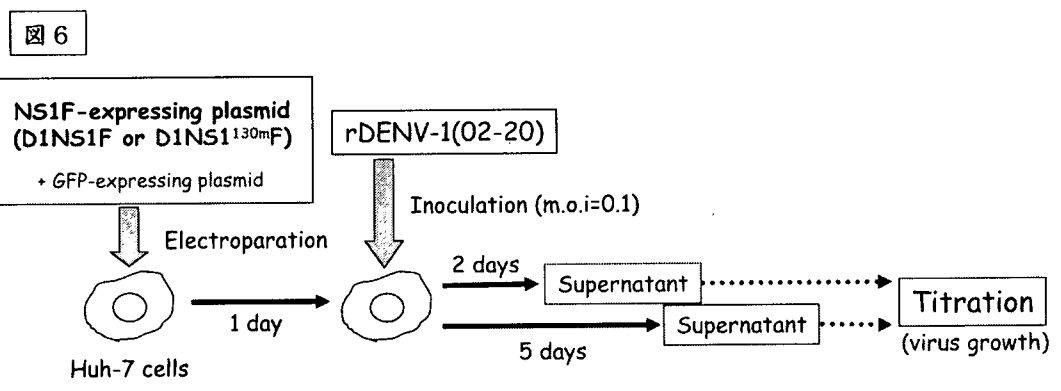
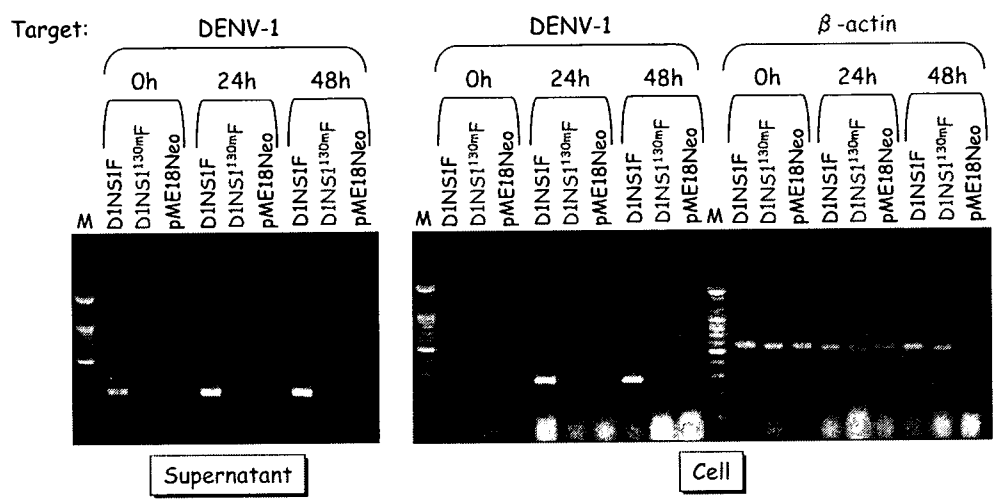
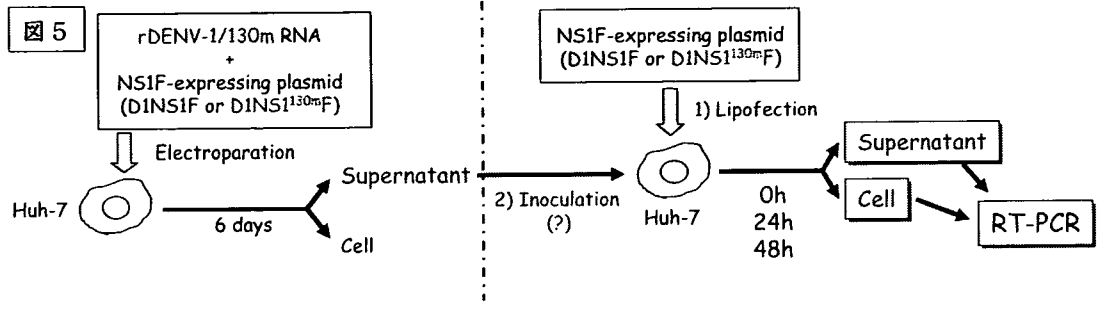


表1 ウイルス産生結果

RNA	Titer (PFU/ml) or Viral RNA		
	Vero	Huh-7	C6/36
rDENV-1/130m	< 10 ² (undetectable)	< 10 ² (undetectable)	< 10 ² (undetectable)
rDENV-1/207m	1.76x10 ⁸	Not tested	Not tested
rDENV-1/130m207m	< 10 ² (undetectable)	Not tested	Not tested