

医薬品 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日 2007年12月25日	新医薬品等の区分 該当なし	総合機構処理欄
一般的名称	別紙のとおり	研究報告の 公表状況	CDC/Travelers' Health, Outbreak Notice. January 8, 2008.	公表国 ウガンダ	
販売名(企業名)	別紙のとおり				
研究報告の概要	<p>問題点：2007年後半にウガンダで発生したエボラ出血熱のアウトブレイクは、既知の4つのエボラウイルス株と異なる新たなウイルス株が原因である可能性がある。</p> <p>米国 CDC とウガンダ保健省は、ウガンダ西部に位置する Bundibugyo 地区におけるエボラ出血熱のアウトブレイクについて報告した。アウトブレイクは早ければ2007年8月から始まった可能性がある。2008年1月3日までに148人が罹患し、37人が死亡した。症例サンプルの遺伝子解析により、既知の4つのエボラウイルス株と異なる、新たなウイルス株であることが示された。しかし、確定するには更なる解析が必要である。</p>				使用上の注意記載状況・ その他参考事項等
	<p>報告企業の意見</p> <p>別紙のとおり</p>				<p>今後の対応</p> <p>今後とも関連情報の収集に努め、本剤の安全性の確保を図っていきたい。</p>

71

9

一 般 的 名 称	①人血清アルブミン、②人血清アルブミン、③人血清アルブミン*、④人免疫グロブリン、⑤乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン、⑥乾燥スルホ化人免疫グロブリン、⑦乾燥スルホ化人免疫グロブリン*、⑧乾燥濃縮人活性化プロテインC、⑨乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子、⑩乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子、⑪乾燥抗破傷風人免疫グロブリン、⑫抗HBs人免疫グロブリン、⑬トロンビン、⑭フィブリノゲン加第ⅩⅢ因子、⑮乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ、⑯ヒスタミン加入免疫グロブリン製剤、⑰人血清アルブミン*、⑱人血清アルブミン*、⑲乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン*、⑳乾燥人血液凝固第Ⅸ因子複合体*、㉑乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ
販 売 名 (企 業 名)	①献血アルブミン20“化血研”、②献血アルブミン25“化血研”、③人血清アルブミン“化血研”*、④“化血研”ガンマーグロブリン、⑤献血静注グロブリン“化血研”、⑥献血ベニロン-I、⑦ベニロン*、⑧注射用アナクトC2,500単位、⑨コンファクトF、⑩ノバクトM、⑪テタノセーラ、⑫ヘパトセーラ、⑬トロンビン“化血研”、⑭ボルヒール、⑮アンスロビンP、⑯ヒスタグロビン、⑰アルブミン20%化血研*、⑱アルブミン5%化血研*、⑲静注グロブリン*、⑳ノバクトF*、㉑アンスロビンP1500注射用
報 告 企 業 の 意 見	<p>エボラ出血熱はエボラウイルスによる急性熱性疾患であり、ラッサ熱、マールブルグ病、クリミア・コンゴ出血熱とともに、ウイルス性出血熱の一疾患である。エボラウイルスは、フィロウイルス科 (<i>Filoviridae</i>) に属し、1本鎖RNAを核酸として持ち、エンペロープを有する。短径が80~100nm、長径が700~1,500nmで、多形性(U字状、ひも状、ぜんまい状等)を示す。</p> <p>エボラ出血熱は、現在までアフリカの中央部でのみ発生している。感染者・患者の血液や体液との接触によりヒトからヒトへ感染が拡大し、多数の死者を出す流行を起こす。ヒトは終末宿主であるが、動物、昆虫などの自然宿主、媒介動物については全く不明である。そのため、自然界からヒトへの感染経路も不明である。</p> <p>発症は突発的で進行も早い。潜伏期は2~21日で、汚染注射器を通じた感染では早く、接触感染では長い。発熱、頭痛、腹痛、咽頭痛、筋肉痛、胸部痛及び出血等の症状がみられ、重篤化する。致死率は患者の53~88%と高い。</p> <p>弊所の血漿分画製剤の製造工程には、冷エタノール分画工程、ウイルス除去膜ろ過工程あるいは加熱工程等の原理の異なるウイルス除去及び不活性化工程が存在しているので、ウイルスクリアランスが期待される。</p> <p>各製造工程のウイルス除去・不活性化効果は、「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン(医薬発第1047号、平成11年8月30日)」に従い、ウシウイルス性下痢ウイルス(BVDV)、仮性狂犬病ウイルス(PRV)、ブタパルボウイルス(PPV)、A型肝炎ウイルス(HAV)または脳心筋炎ウイルス(EMCV)をモデルウイルスとして、ウイルスプロセスバリデーションを実施し、評価を行っている。今回報告したエボラウイルスは、エンペロープの有無、核酸の種類等からモデルウイルスとしてはBVDVが該当すると考えられるが、上記バリデーションの結果から、BVDVの除去・不活性化効果を有することを確認している。</p> <p>また、これまでに当該製剤によるエボラウイルス感染の報告例は無い。</p> <p>以上の点から、当該製剤はエボラウイルスに対する安全性を確保していると考えられる。</p>

*現在製造を行っていない



Outbreak Notice

Updated: Ebola Outbreak in the District of Bundibugyo, Uganda
This information is current as of today, January 24, 2008 at 20:11

Updated: January 08, 2008

The U.S. CDC and the Ministry of Health of Uganda have reported an Ebola hemorrhagic fever outbreak in the Bundibugyo district located in the Western part of the country. The outbreak may have begun as early as August 2007. As of January 3, 2008, 148 people have become ill and 37 people have died. Genetic analysis of samples from case-patients indicated that this is a new virus strain distinct from the four known strains of Ebola virus. However, further studies will be needed before this can be verified.

Ebola hemorrhagic fever is a rare, serious viral disease which develops suddenly, with common symptoms of fever, headache, joint and muscle aches, sore throat, and weakness. Diarrhea, vomiting, and stomach pain start after the first symptoms. A skin rash may develop. By the third or fourth day of illness some people with Ebola hemorrhagic fever may develop internal and external bleeding, shock and organ failure.

Ebola is spread through direct contact with blood or other body fluids (e.g., saliva, urine) of infected persons or objects that have been contaminated with infected body fluids. People who have close contact with a nonhuman primate infected with the virus are also at risk.

Recommendations for U.S. Travelers

The World Health Organization (WHO) has reported that there is no need for any travel restrictions to Uganda. Generally, the risk of contracting Ebola virus is low for travelers. CDC recommends that anyone traveling to Uganda take the following steps to prevent Ebola virus infection:

- Avoid contact with Ebola patients and their body fluids.
- Avoid touching used needles or other medical waste.
- Avoid contact with wild animals and bushmeat, including primates.

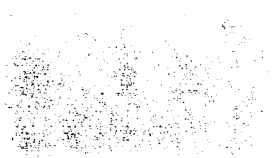
More Information

For information about the current situation, see the WHO report at www.who.int.

For additional information on Ebola hemorrhagic fever, please see <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/ebola.htm>.

To learn more about traveling to areas with hemorrhagic fevers, see the [Viral Hemorrhagic Fevers](#) section of *CDC Health Information for International Travel 2008*.

Page Located on the Web at <http://wwwn.cdc.gov/travel/contentEbolaUganda.aspx>



医薬品 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日 2007. 10. 22	新医薬品等の区分 該当なし	機構処理欄
一般的名称	人赤血球濃厚液	研究報告の公表状況	山田正仁, 篠原もえ子, 野崎一朗, 浜口毅, 中村好一, 北本哲之, 佐藤猛, 水澤英洋, CJDサーベイランス委員会, 2007年プリオン研究会	公表国 日本	
販売名(企業名)	赤血球濃厚液-LR「日赤」(日本赤十字社) 照射赤血球濃厚液-LR「日赤」(日本赤十字社)				
研究報告の概要	<p>○わが国におけるヒトのプリオン病の実態: 最近のサーベイランスデータ 我が国の人口動態統計では、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)による死亡は過去20年以上に渡り右肩上がりに増加傾向を示し、2005年は人口100万対1.23人であった。『プリオン病および遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班』・CJDサーベイランス委員会による現行のプリオン病調査は1999年から始まった。そこでは、プリオン病が疑われる全患者について、画像、脳脊髄液マーカー、プリオン蛋白(PrP)遺伝子型、病理などの検査を含めた実地調査を行うことを原則としている。このシステムにより過去8年間に918例がプリオン病と判定された。病型別では、孤発性CJD716例(78.0%)、遺伝性プリオン病128例(14.0%)、感染性(獲得性)CJD72例(7.8%) [変異型CJD(vCJD)1例/硬膜移植後CJD(dCJD)71例]、および分類不能2例(0.2%)であった。PrP遺伝子に変異がないことを確認した孤発性CJD387例の臨床像をみると、進行が速く(無動性無言まで9ヵ月未満)特徴的な脳波所見を有する典型例は74%、それ以外の非典型例が26%を占めた。進行が遅く特徴的脳波を欠く、最も非典型的な群は、他群と較べて脳脊髄液マーカーやMRI上の高信号の陽性率も低く、Parchi分類でMM2型に属し、特に視床型が臨床診断上問題であった。遺伝性プリオン病128例の分類では、コドン180変異42例(32.9%)、コドン200変異CJD26例(20.4%)、コドン102変異25例(19.6%)、コドン232変異17例(13.3%)他の順であり、欧米ではほとんどないコドン180、232変異が多くみられるなどの特色があった。dCJDは1996年の佐藤班による全国調査以来、硬膜移植歴が判明したものを合計すると129例になった。dCJDの中で、比較的緩徐な進行を示し特徴的脳波を欠き脳にPrP斑を認める非典型例(ブランク型)の割合は剖検例では48%であり、臨床例を含めるとdCJD全体の約1/3を占めると考えられた。2007年7月現在、vCJDは英国短期滞在歴がある1例のみである。</p>				使用上の注意記載状況・ その他参考事項等
報告企業の意見		今後の対応			
CJDサーベイランス委員会による調査では過去8年間に日本国内で918例がプリオン病と判定された。また、人口動態統計ではCJDによる死亡者数は過去20年以上に亘って増加傾向を示し、2005年は人口100万対1.23人であったとの報告である。		日本赤十字社は、vCJDの血液を介する感染防止の目的から、献血時に過去の海外渡航歴(旅行及び居住)を確認し、欧州36ヶ国に一定期間滞在したドナーを無期限に献血延期としている。また、英国滞在歴を有するvCJD患者が国内で発生したことから、平成17年6月1日より1980~96年に1日以上英国滞在歴のある方からの献血を制限している。今後もCJD等プリオン病に関する新たな知見及び情報の収集に努める。			

わが国におけるヒトのプリオン病の実態：最近のサーベイランスデータ

山田正仁^{1,6}、篠原もえ子¹、野崎一朗¹、浜口 毅¹、中村好一^{2,6}、北本哲之^{3,6}、佐藤 猛^{4,6}、水澤英洋^{5,6}、CJD サーベイランス委員会⁶

¹金沢大学大学院 脳老化・神経病態学（神経内科）、²自治医大公衆衛生、³東北大学大学院プリオン蛋白研究部門、⁴東大和病院、⁵東京医科歯科大学大学院脳神経病態学（神経内科）、⁶厚生労働省・難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」・CJD サーベイランス委員会

わが国の人口動態統計では、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) による死亡は過去 20 年以上に渡り右肩上がりに増加傾向を示し、2005 年は人口 100 万対 1.23 人であった。『プリオン病および遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班』・CJD サーベイランス委員会による現行のプリオン病調査は 1999 年から始まった。そこでは、プリオン病が疑われる全患者について、画像、脳脊髄液マーカー、プリオン蛋白 (PrP) 遺伝子型、病理などの検査を含めた実地調査を行うことを原則としている。このシステムにより過去 8 年間に 918 例がプリオン病と判定された。病型別では、孤発性 CJD 716 例 (78.0%)、遺伝性プリオン病 128 例 (14.0%)、感染性 (獲得性) CJD 72 例 (7.8%) [変異型 CJD (vCJD) 1 例 / 硬膜移植後 CJD (dCJD) 71 例]、および分類不能 2 例 (0.2%) であった。PrP 遺伝子に変異がないことを確認した孤発性 CJD 387 例の臨床像をみると、進行が速く (無動性無言まで 9 ヶ月未満) 特徴的な脳波所見を有する典型例は 74%、それ以外の非典型例が 26% を占めた。進行が遅く特徴的脳波を欠く、最も非典型的な群は、他群と較べて脳脊髄液マーカーや MRI 上の高信号の陽性率も低く、Parchi 分類で MM2 型に属し、特に視床型が臨床診断上問題であった (Hamaguchi *et al. Neurology* 64:643, 2005)。遺伝性プリオン病 128 例の分類では、コドン 180 変異 42 例 (32.9%)、コドン 200 変異 CJD 26 例 (20.4%)、コドン 102 変異 25 例 (19.6%)、コドン 232 変異 17 例 (13.3%) 他の順であり、欧米ではほとんどないコドン 180、232 変異が多くみられるなどの特色があった。dCJD は 1996 年の佐藤班による全国調査以来、硬膜移植歴が判明したものを合計すると 129 例になった。dCJD の中で、比較的緩徐な進行を示し特徴的脳波を欠き脳に PrP 斑を認める非典型例 (プラーク型) の割合は剖検例では 48% であり、臨床例を含めると dCJD 全体の約 1/3 を占めると考えられた (Noguchi-Shinohara *et al. Neurology* 69:360, 2007)。2007 年 7 月現在、vCJD は英国短期滞在歴がある 1 例 (Yamada *et al. Lancet* 367:874, 2006) のみである。

医薬品 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日 2007年12月17日	新医薬品等の区分 該当なし	総合機構処理欄				
一般的名称	別紙のとおり	研究報告の 公表状況	PloS Pathogens. 2007;3:1895-1906	公表国 インド洋南 西地域およ びインド					
販売名(企業名)	別紙のとおり								
研究報告の概要	<p>問題点：2005年から2006年にかけてのレユニオン諸島でのチクングニヤウイルス感染のアウトブレイクは、ヒトスジシマカをチクングニヤウイルスのベクターとし、また致命的な感染が報告された流行であるという特徴を持っていた。</p> <p>以前の流行では、チクングニヤウイルス(CHIKV)感染は非致死性の感染症と考えられていた。しかし、レユニオン諸島でアウトブレイクしたCHIKV感染は、266,000人が発症し、260人の死者が出た。CHIKVは、<i>Aedes aegypti</i>(ネッタシマカ)をプライマリーベクターとするが、2005～2006年のレユニオン諸島でのアウトブレイクにおけるベクターは<i>Aedes albopictus</i>(ヒトスジシマカ)であった。</p> <p>研究者らは、CHIKVのエンベロープ蛋白(E1)の226番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変異していることを明らかにした。この変異により、CHIKVはネッタシマカと比較して、ヒトスジシマカへの感染性が増し、その唾液腺でより早く増殖するようになり、また乳のみマウスへもより効率的に感染するようになった。</p> <p>一つのアミノ酸置換がベクターの特異性に影響を与えるという今回の結果は、通常のベクターが存在しない地域で変異ウイルスが流行を起こした理由をうまく説明をしている。これは、ウイルスが新しい地域に入り込んだときにどのように感染サイクルを確立するかに関する重要な仮説となる。ヒトスジシマカは広く分布しているため、この変異はCHIKVの分布が欧州やアメリカ大陸に広がる可能性を増大させることとなる。</p>				使用上の注意記載状況・ その他参考事項等				
	<table border="1"> <tr> <td>報告企業の意見</td> <td>今後の対応</td> </tr> <tr> <td>別紙のとおり</td> <td>今後とも関連情報の収集に努め、本剤の安全性の確保を図っていきたい。</td> </tr> </table>					報告企業の意見	今後の対応	別紙のとおり	今後とも関連情報の収集に努め、本剤の安全性の確保を図っていきたい。
報告企業の意見	今後の対応								
別紙のとおり	今後とも関連情報の収集に努め、本剤の安全性の確保を図っていきたい。								

79



一般的名称	①人血清アルブミン、②人血清アルブミン、③人血清アルブミン*、④人免疫グロブリン、⑤乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン、⑥乾燥スルホ化人免疫グロブリン、⑦乾燥スルホ化人免疫グロブリン*、⑧乾燥濃縮人活性化プロテインC、⑨乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子、⑩乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子、⑪乾燥抗破傷風人免疫グロブリン、⑫抗HBs人免疫グロブリン、⑬トロンビン、⑭フィブリノゲン加第ⅩⅢ因子、⑮乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ、⑯ヒスタミン加人免疫グロブリン製剤、⑰人血清アルブミン*、⑱人血清アルブミン*、⑲乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン*、⑳乾燥人血液凝固第Ⅸ因子複合体*、㉑乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ
販売名(企業名)	①献血アルブミン20“化血研”、②献血アルブミン25“化血研”、③人血清アルブミン“化血研”*、④“化血研”ガンマーグロブリン、⑤献血静注グロブリン“化血研”、⑥献血ベニロン-I、⑦ベニロン*、⑧注射用アナクトC2,500単位、⑨コンファクトF、⑩ノバクトM、⑪テタノセーラ、⑫ヘパトセーラ、⑬トロンビン“化血研”、⑭ボルヒール、⑮アンスロビンP、⑯ヒスタグロビン、⑰アルブミン20%化血研*、⑱アルブミン5%化血研*、⑲静注グロブリン*、⑳ノバクトF*、㉑アンスロビンP1500注射用
報告企業の意見	<p>チクングニヤウイルス (Chikungunya virus) は、トガウイルス科 (<i>Togaviridae</i>) のアルファウイルス属 (<i>Alphavirus</i>) に分類される1本鎖のRNAを核酸として持つ直径70nmのエンベロープを有する球状粒子である。いまままでに日本国内での感染・流行はないが、2006年12月に海外からの輸入症例2例が報告された。チクングニヤウイルスは蚊によって媒介されるが、感染後ウイルス血症を起こすことから、血液を介してウイルス感染する可能性を完全に否定できないため本報告を行った。</p> <p>弊所の血漿分画製剤の製造工程には、冷エタノール分画工程、ウイルス除去膜ろ過工程あるいは加熱工程等の原理の異なるウイルス除去・不活化工程が存在しているため、仮にウイルスが原料血漿に混入していたとしても、ウイルスクリアランスが期待される。各製造工程のウイルス除去・不活化効果は、「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン (医薬発第1047号、平成11年8月30日)」に従い、ウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、仮性狂犬病ウイルス (PRV)、プタパルボウイルス (PPV)、A型肝炎ウイルス (HAV) または脳心筋炎ウイルス (EMCV) をモデルウイルスとして、ウイルスプロセスバリデーションを実施し、評価を行っている。今回報告したチクングニヤウイルスはエンベロープの有無、核酸の種類等からモデルウイルスとしてはBVDVが該当すると考えられるが、上記バリデーションの結果から、BVDVの除去・不活化効果を有することを確認している。</p> <p>また、これまでに弊所の血漿分画製剤によるチクングニヤウイルス感染の報告例は無い。</p> <p>以上の点から、当該製剤はチクングニヤウイルスに対する安全性を確保していると考えられる。</p>

*現在製造を行っていない

A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential

Konstantin A. Tsetsarkin, Dana L. Vanlandingham, Charles E. McGee, Stephen Higgs*

Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States of America

Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging arbovirus associated with several recent large-scale epidemics. The 2005–2006 epidemic on Reunion island that resulted in approximately 266,000 human cases was associated with a strain of CHIKV with a mutation in the envelope protein gene (E1-A226V). To test the hypothesis that this mutation in the epidemic CHIKV (strain LR2006 OPY1) might influence fitness for different vector species, viral infectivity, dissemination, and transmission of CHIKV were compared in *Aedes albopictus*, the species implicated in the epidemic, and the recognized vector *Ae. aegypti*. Using viral infectious clones of the Reunion strain and a West African strain of CHIKV, into which either the E1–226 A or V mutation was engineered, we demonstrated that the E1-A226V mutation was directly responsible for a significant increase in CHIKV infectivity for *Ae. albopictus*, and led to more efficient viral dissemination into mosquito secondary organs and transmission to suckling mice. This mutation caused a marginal decrease in CHIKV *Ae. aegypti* midgut infectivity, had no effect on viral dissemination, and was associated with a slight increase in transmission by *Ae. aegypti* to suckling mice in competition experiments. The effect of the E1-A226V mutation on cholesterol dependence of CHIKV was also analyzed, revealing an association between cholesterol dependence and increased fitness of CHIKV in *Ae. albopictus*. Our observation that a single amino acid substitution can influence vector specificity provides a plausible explanation of how this mutant virus caused an epidemic in a region lacking the typical vector. This has important implications with respect to how viruses may establish a transmission cycle when introduced into a new area. Due to the widespread distribution of *Ae. albopictus*, this mutation increases the potential for CHIKV to permanently extend its range into Europe and the Americas.

Citation: Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S (2007) A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 3(12): e201. doi:10.1371/journal.ppat.0030201

Introduction

The large-scale epidemic of the mosquito-transmitted alphavirus, Chikungunya virus (CHIKV), began in Kenya in 2004 and spread to several Indian Ocean islands including the Comoros, Mauritius, the Seychelles, Madagascar, Mayotte and Reunion. On Reunion island alone there were approximately 266,000 cases (34% of the total island population) [1–6]. In the continuing Indian epidemic there have been at least 1.4M cases reported [7–10] with continued expansion in Sri Lanka and Indonesia. CHIKV had not been reported to cause fatalities in prior outbreaks; however, during the outbreak on Reunion island, CHIKV was associated with at least 260 deaths [11,12]. The strain of CHIKV responsible for the Indian Ocean island epidemic has been well-characterized in cell culture and mosquito models [13–15]; however, the underlying genetic basis of the atypical phenotype of this CHIKV strain remains unknown.

CHIKV is transmitted by *Aedes* species mosquitoes, primarily *Ae. aegypti*. However, the 2005–2006 CHIKV epidemic on Reunion island was unusual because the vector responsible for transmission between humans was apparently the Asian tiger mosquito, *Ae. albopictus* [3,16]. This conclusion is based on several factors. This species is known to be susceptible to CHIKV infection and although infectious virus was not isolated from *Ae. albopictus* during the epidemic, CHIKV RNA was detected (X. de Lamballerie, personal communication). Furthermore, the species is anthropophilic, was abundant during the epidemic, and other potential vectors specifically *Ae. aegypti* were relatively scarce with a very limited distribution (P. Reiter, personal communication). *Ae. albopictus*

is abundant and widely distributed in urban areas of Europe and the United States of America [17–22]. CHIKV infections have been reported in many travelers returning to the US and Europe [12,23–26] causing concern that the virus could be introduced and become established in these areas [1,27,28]. In August and September of 2007, a CHIKV-*Ae. albopictus* transmission cycle was reported for the first time in Europe, with an estimated 254 human cases occurring in Italy [29,30].

Alphaviruses are enveloped single stranded positive sense RNA viruses. Genomic RNA, of $\approx 12,000$ nt, encodes four non-structural (ns1–4) and three main structural proteins (capsid, E2 and E1). At neutral pH, E2 and E1 exist as heterodimers in which E2 forms spikes on the virion surface that interact with cellular receptors. The E1 protein lies below E2 and mediates fusion of the viral and cellular membranes during viral entry [31].

Analysis of CHIKV genome microevolution during the 2005–2006 Indian Ocean epidemic identified an alanine to valine mutation at position 226 in the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V) among viral isolates obtained during the

Editor: Edward C. Holmes, The Pennsylvania State University, United States of America

Received September 20, 2007; Accepted November 12, 2007; Published December 7, 2007

Copyright: © 2007 Tsetsarkin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: sthiggs@utmb.edu

human isolate were used [15], including one clone (LR-GFP-226V) expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP). Clones were further engineered to express E1 protein containing an alanine at position E1-226 (LR-GFP-226A) representing the CHIKV genotype prevalent prior to the outbreak gaining momentum (Figure S1). RNAs produced from both clones (LR-GFP-226V and LR-GFP-226A) have comparable specific infectivity values, produced similar viral titers following transfection into BHK-21 cells (Table S1) and have similar growth kinetics in mosquito (C6/36) and mammalian (BHK-21) cells lines (Figure S2A and S2B).

The relative infectivity of LR-GFP-226V and LR-GFP-226A viruses was analyzed in female *Ae. albopictus* mosquitoes orally exposed to serial 10-fold dilutions of CHIKV (LR-GFP-226V or A). To determine whether infection rates correlate with blood meal titer, midguts dissected from mosquitoes at 7 days post-infection (dpi) were analyzed for foci of eGFP-expressing cells by fluorescence microscopy (Figure 1A; Table 1). In two independent experiments, LR-GFP-226V virus was found to be approximately 100-fold more infectious to *Ae. albopictus* than LR-GFP-226A virus ($p < 0.01$). To test if the infectivity phenotype was directly linked to the mutation, the complementary reverse mutation, E1-A226V, was introduced into an infectious clone of a West African CHIKV strain, 37997-GFP (37997-GFP-226A) (Figure S1). The Reunion and 37997 strains of CHIKV are distantly related, with only 85% nucleotide sequence identity. The parental 37997-GFP-226A and the 37997-GFP-226V viruses were indistinguishable in cell culture experiments (Table S1; Figure S2C and S2D); however, *in vivo* experiments in *Ae. albopictus* mosquitoes revealed that the E1-A226V mutation significantly decreases the oral infectious dose 50 (OID₅₀) value for the 37997-GFP-226V virus ($p < 0.01$) to an extent similar to that observed for LR-GFP-226V virus (Figure 1B; Table 1). These data conclusively demonstrate that the single E1-A226V point mutation is therefore sufficient to significantly reduce the OID₅₀ of the 37997-GFP virus ($p < 0.01$) in *Ae. albopictus* mosquitoes equivalent to that observed for the LR-GFP-226V virus (Figure 1A; Table 1).

To further evaluate viral fitness of the epidemic CHIKV E1-A226V mutation in *Ae. albopictus*, viral competition experiments were performed. Although our CHIKV eGFP-expressing infectious clones, have similar infection properties in mosquitoes as wild-type viruses [15,35], to address potential concerns that eGFP expression might influence OID₅₀ values, we constructed LR-226A and LR-ApaI-226V viruses without eGFP and employed them in viral competition experiments (Figures 2A and S1). LR-ApaI-226V was derived from previously described CHIK-LR ic, by the introduction of a silent marker mutation, A6454C, in order to add an *ApaI* restriction site into the coding sequence. It was shown that the A6454C mutation does not affect the specific infectivity value (Table S1), the viral titer after RNA transfection into BHK-21 cells value (Table S1), the viral growth kinetics in BHK-21 and C6/36 cells (Figure S3), infectivity for and viral titers in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes (Table S2), or viral fitness for growth in BHK-21 and C6/36 cells as determined by competition assay (Figure S4). These data indicate that the introduced mutation is indeed silent and does not affect the fitness of LR-ApaI-226V.

For viral competition experiments LR-ApaI-226V virus (10^7 plaque-forming units (pfu)) was mixed with an equal

outbreak [32]. The reason for this was unclear but it was hypothesized that the E1-A226V mutation might influence infectivity of CHIKV for mosquito vectors [11,32]. Interestingly, earlier studies have identified that a P→S mutation in the same position of the E1 glycoprotein is responsible for the modulation of Semliki Forest virus's (SFV, a member of the alphavirus family) requirements for cholesterol in the target membrane [33]. It also has been shown that the presence of this mutation results in more efficient growth of SFV in *Ae. albopictus* mosquitoes [34]. However, no evidence has been presented to directly correlate the release from the cholesterol dependence, associated with the E1-P226S mutation in SFV, with a growth advantage in *Ae. albopictus*. It is unknown if dependence on cholesterol for growth in mosquito cells is a requirement of all alphaviruses.

To test the hypothesis that the E1-A226V mutation might influence the fitness of CHIKV in mosquito vectors, we compared the effect of this mutation on CHIKV mosquito infectivity, the ability to disseminate into heads and salivary glands, and the relative fitness in competition assays for transmission by *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* to suckling mice. We also analyzed the effect of the E1-A226V mutation on CHIKV cholesterol dependence for growth in mosquito C6/36 (*Ae. albopictus*) cells. Here we report findings that a single nucleotide change, which arose during the epidemic, significantly increases fitness of the virus for *Ae. albopictus* mosquitoes and was associated with CHIKV dependence on cholesterol in the mosquito cell membrane. This change likely enhanced CHIKV transmission by an atypical vector and contributed to the maintenance and scale of the epidemic.

Results

Effect of E1 A226V Mutation on Fitness of CHIKV in *Ae. albopictus* Mosquitoes

To test the hypothesis that the E1-A226V mutation altered CHIKV infectivity for *Ae. albopictus* mosquitoes, CHIKV infectious clones derived from an epidemic Reunion island