

- xSAMPLES Japan seminar. Yokohama (2007. 5)
- 18) Saijo M: Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression, protects monkeys from monkeypox: The 1st US-Japan Biodefence Meeting, Washington (2007. 6)
- 19) 西條政幸: 国立感染症研究所における新興ウイルス感染症対策と感染動物実験: 第4回北海道実験動物研究会, 札幌 (2007, 7)
- 20) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Therapeutic vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox: 41st annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science, Baltimore (2007. 7)
- 21) 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂: 高病原性コンゴ盆地型サル痘ウイルス(MPXV)と低病原性西アフリカ型 MPXV の鑑別可能な定量的 PCR 法による MPXV 感染症の診断: 第55回日本ウイルス学会・学術集会, 札幌 (2007.10)
- 22) 佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、見明史雄、牛島廣治、高崎智彦、小滝徹、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂、水谷哲也: タイで採集されたネッタイシマカからの RDV 法による RNA ウイルスの検出: 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌 (2007.10)
- 23) 水谷哲也、西村秀一、酒井宏治、前田健、清水博之、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂: 新興ウイルス感染症の網羅的検出方法の確立と応用: 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌 (2007.10)
- 24) 酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、遠藤大二、倉根一郎、森川茂: 網羅的ウイルスゲノム検出方法を用いたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) の同定: 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌 (2007.10)
- 25) 福士秀悦、前田健、平井明香、新倉綾、山田靖子、横山勝、吉川泰弘、水谷哲也、酒井宏治、西條政幸、倉根一郎、森川茂: コウモリ由来 ACE2 を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析: 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌 (2007.10)
- 26) 西條政幸、網康至、永田典代、長谷川秀樹、福士秀悦、水谷哲也、飯塚愛恵、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂: 高度弱毒化天然痘ワクチン LC16m8 の暴露後使用時の天然痘予防効果: 霊長類におけるサル痘モデルによる検討: 第11回日本ワクチン学会学術集会、横浜 (2007.12)
- 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

なし

3. その他

表 1. 本実験で使用されたカニクイザルの臨床症状(水疱性皮膚病変数、臨床症状程度、転機)およびサル痘ウイルス接種から検体(末梢血液、咽頭ぬぐい液)採取までの日数

ID	接種ウイルス	臨床症状			ウイルス接種から検体採取までの日数
		水疱性病変数	症状の程度	転機	
Naïve-Zr-599	Zr-599	388	重症	安楽殺	0、3、6、10、13(死亡)
D0-Zr-599	Zr-599	691	重症	生存	0、3、7、10、14、17、21
D3-Zr-599	Zr-599	286	軽症	生存	0、3、7、10、14、17
D7-Z599	Zr-599	0	無症状	生存	0、3、7、10、14、17
Naïve-Liberia	Liberia	196	軽症	生存	0、3、7、10、14、17、21

表 2. 各 LAMP 法に用いたプライマーと標的遺伝子

LAMP	標的遺伝子	プライマー		
	名前	塩基配列		
COM-LAMP	ATI	FIP-COM	5' - TGGAGTCTGCTAATCTCTGTAAGATTAGAGAACTAGAGAAATAAGTTGACC-3'	
		F3-COM	5' - CACAAGAAGTTGATGCACTG -3'	
		BIP-COM	5' - TGAGTGAATGCCGTGGAAATGCCGAGTCGTTCAACTGTA-3'	
		B3-COM	5' - CAGCATTGATTTTCATTATTACGT-3'	
		Loop-F-COM	5' - CGCTCTCGATGCAGTC-3'	
		Loop-B-COM	5' - CAGAGATTACAAATCTAGAATCTCAG-3'	
	C-LAMP	D14L	FIP-C	5' - TGGGAGCATTGTAACCTTATAGTTGC-CCTCCTGAACACACATGACA-3'
			F3-C	5' - TGGGTGGATTGGACCATT-3'
		BIP-C	5' - ATCCTCGTATCCGTTATGTCCTCC-CACCTATTTGCGAATCTGTT-3'	
		B3-C	5' - ATGGTATGGAATCCTGAGG-3'	
		Loop-F-C	5' - GATATTCGTTGATTGGTAACTCTGG-3'	
		Loop-B-C	5' - GTTGGATATAGATGGAGGTGATTGG-3'	
W-LAMP		ATI	FIP-W	5' - CCGTTACCGTTTTTACAATCGTTAATCAATGCTGATATGGAAAAGAGA-3'
			F3-W	5' - TACAGTTGAACGACTGCG-3'
		BIP-W	5' - ATAGGCTAAAGACTAGAATCAGGGA-TTCTGATTTCCTTTGAGAAG-3'	
		B3-W	5' - AGTTCAGTTTTATATGCCGAAT-3'	
		Loop-F-W	5' - GATGTCTATCAAGATCCATGATTCT-3'	
		Loop-B-W	5' - TCTTGAACGATCGCTAGAGA-3'	

表 3. 5 頭のカニクイザル (naïve-Zr-599、D0-Zr-599、D3-Zr-599、D7-Zr-599、naïve-Liberia) から採取された検体の、nested PCR および各 LAMP 法による成績

LAMP 法の 種類	Zr-599 感染サルからの検体				Liberia 感染サルからの検体	
	Nested PCR		Nested PCR		Nested PCR	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
COM-LAMP	陽性	21	0	9	0	
	陰性	3	24	3	2	
C-LAMP	陽性	19	0	0	0	
	陰性	5	24	12	2	
W-LAMP*	陽性	0	0	11	0	
	陰性	7	3	1	2	

(ア) : W-LAMP では、naïve-Zr-599、naïve-Liberia からの検体のみを用いた。

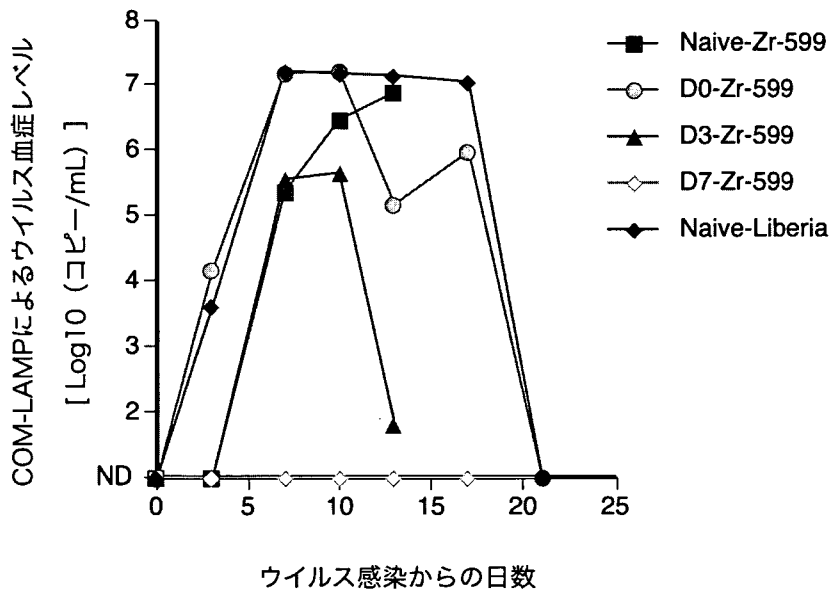


図 1. カニクイザル naïve-Zr599 (赤), D0-Zr599 (緑), D3-Zr599 (青), D7-Zr599 (黄), naïve-Liberia (紫) における COM-LAMP (A) によるサル痘ウイルス血症レベルの推移. ND は検出感度以下であることを示す。

厚生労働科学研究費 新興・再興感染症研究事業

平成 19 年度分担研究報告書

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

げっ歯類媒介性感染症の病理学的検索

分担研究者:長谷川秀樹(国立感染症研究所、感染病理部第二室、室長)

協力研究者:永田典代、小島朝人、原嶋綾子、佐藤由子(同所 感染病理部)

西條政幸、森川 茂(同所 ウイルス第一部)

網 康至、須崎百合子(同所 動物管理室)

**研究要旨:** サル痘の原因となるポックスウイルスの病理学的診断法を確立するために、これまでにわれわれが行った、オルソポックスウイルス感染実験後の動物組織材料を用いて、感染局所におけるウイルス抗原の局在とそれに伴う病変の特徴を病理学的に再検討した。これらのウイルスは感染動物の上皮細胞で増殖し強い壊死性病変を伴うことが病理学的、免疫組織学的あるいは電子顕微鏡学的に明らかとなった。また、ワクチニアウイルス LC16m8 株免疫ウサギ血清の精製 IgG は、サル痘ウイルス、マウス馴化ワクチニアウイルス WR 株感染動物のパラフィン包埋組織切片上のウイルス抗原検出に有用であった。いずれも瀕死期の標本では病変の形成は明らかであるが、封入体の形成は非常に不明瞭であり、免疫組織化学によるウイルス抗原の検出が有用であった。

#### A. 研究目的

2003 年に、アメリカ合衆国においてサル痘が初めて流行した。これは、アフリカからペット用に輸入された齧歯類がサル痘ウイルスに感染しており、これが同一カ所で飼育されていたプレーリードッグに感染し、ここからヒトに感染したことが疫学調査から明らかになっている。このことから、サル痘は輸入感染症の一つとして現在、再認識されている。そこで、我々がすでに行った、実験動物を用いたポックスウイルス感染実験の組織標本の再評価を行い、ウイルス抗原の局在と病変の特徴について病理学的に再検討した。

#### B. 研究方法

以下の研究で作製した組織標本を病理学的、免疫組織化学的、電子顕微鏡学的に再検索した。

1. カニクイザルを用いた痘瘡ワクチン免疫後のサル痘攻撃実験 (Saijo et al., J. Virol. 2006)

2. BALB/cマウスを用いた痘瘡ワクチン免疫後のマウス馴化ワクチニアウイルス Western Reserve 株攻撃実験 (Morikawa et al., J. Virol. 2005)

いずれも非免疫群の病原性強毒株接種後動物の皮膚あるいは鼻腔・肺組織材料を使用した。

## サル痘ウイルス感染実験

サルに対して病原性を発揮する Zr-599 株  $10^6$  PFU を皮下接種したところ、1 週間後から全身に発痘がみられ、14 日目を発痘のピークとして 18 日目には潰瘍、膿瘍、あるいは痂皮の形成が見られた。また、接種後 10 日目以降から体重減少がみられ、18 日目には横臥し摂餌不能となったのでケタール筋肉内接種による過麻酔後、安楽死した。この動物の皮膚を病理検索対象とした。

なお、サル痘感染実験は国立感染症研究所村山分室高度安全実験施設においてバイオセーフティレベル3病原体取り扱い規定と、動物実験委員会規定に従い実施した。

## ワクチニアウイルス感染実験

マウスに対して高病原性のワクチニアウイルス Western Reverse (WR) 株  $10^6$  PFU を  $20 \mu\text{l}$  経鼻接種したところ、接種後 3 日目以降から体重の減少がみられ、7-9 日目に呼吸器症状を呈し、瀕死となった。このうち、9 日目に瀕死となった動物の鼻腔と肺を検索対象とした。感染マウスは発痘を示さない。

## 病理学のおよび免疫組織学的検索

いずれも10%ホルマリン緩衝液による固定後、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、ワクチニアウイルスLC16m8株(ワクチン株)感染ウサギから得た血清の精製IgGをもちいた。脱パラフィンした切片を0.025%トリプシンで37°C 30分間処理し、Labeled StreptAvidin-Biotin (LSAB)法(ダコLSABキット、DakoCytomation)による免疫組織化学染色を行った。

## 電子顕微鏡学的検索

サル痘感染後のサル皮膚痘疱形成部位の電子顕微鏡学的検索を行った。電子顕微鏡用の皮膚材料は、約1mm角に細切し2.5%グルタルアルデヒド1%パラホルムアルデヒド混合リン酸緩衝液で4°C一晩浸漬固定後、0.01Mリン酸緩衝液で洗浄、2%四酸化オスミウムで再固定した。洗浄、脱水処理後、常法どおりエポキシ樹脂包埋超薄切片を作製し、酢酸ウラン-鉛染色を施した。

## C. 研究結果

### サル痘によるサル皮膚組織病変

痘疱部位は、中心部の痂皮あるいはびらん、潰瘍形成と真皮層への組織球、リンパ球、好中球の浸潤とその周囲の表皮層の増生からなる。増生した表皮の有棘層には配列が乱れ、大小不同となり淡明化、膨化した扁平上皮細胞が見られた(図 1A)。この表皮の病変部と正常部の境界周辺の上皮にウイルス抗原陽性細胞がみとめられ、特に核周囲に強陽性部位がみられる細胞が存在した(図 1B)。抗原陽性細胞は、有棘層、毛根の上皮細胞、まれに汗腺上皮細胞、表皮直下に浸潤した組織球であった。病変中心の壊死部はウイルス抗原陰性であった。HE 染色で封入体は不明瞭であった。電子顕微鏡学的にこの部位を検索したところ、扁平上皮の細胞質全体に様々な粒子形成段階のウイルス粒子が存在した(図 1C)。

### WR 株によるマウス気道組織病変

鼻腔嗅部の嗅上皮と肺の細気管支へ肺胞道の上皮において限局的にウイルス抗原陽性細胞とこれに伴う急性壊死所見が認められた。この病変部を

中心として周囲の肺胞においても強い水腫が認められた(図 2A,B)。このほか、肺胞マクロファージにおいてウイルス抗原が陽性であった。

#### D. 考察

いずれの動物においてもポックスウイルス抗原陽性細胞は上皮系細胞とマクロファージあるいは組織球であったが、電子顕微鏡学的にウイルス増殖が確認されている細胞は現在のところ上皮系細胞である。マクロファージはウイルス粒子あるいは感染し壊死、剥離した上皮を貪食しているためウイルス抗原が陽性となっている可能性がある。いずれの動物も感染局所の壊死が強く進んだ部位では抗原は陰性であり、正常部との境界部位が陽性であった。これは電子顕微鏡像と一致しており、核小体の明瞭な生細胞内で粒子形成を観察できるが、壊死細胞内で粒子を見つけることは非常に困難である。

WR 株感染マウスにおける肺病変は非常に限局的で、細気管支上皮を中心とした感染・増殖によって上皮が急性壊死し、この周囲の肺胞を巻き込んだ構造破綻が起きた結果、水腫が引き起こされたと考えられた。このウイルスは、サル痘や天然痘で特徴的な痘疱を BALB/c マウスにおいて形成しない。

#### E. 結論

今回使用したワクチニアウイルス LC16m8 株に対する抗体は、サル痘ウイルス、マウス馴化ワクチニアウイルス WR 株感染動物のパラフィン包埋組織切片でのウイルス抗原検出に使用可能であった。いずれのウイルスも感染動物の上皮細胞で増殖し、強い壊死性病変を伴った。いずれも封入体の形成は

HE 染色において不明瞭であり、免疫組織化学によるウイルス抗原の検出が有用であった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Saijo, M., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Therapeutic vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox: 41st annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science, Baltimore (2007. 7)

2) 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂: 高病原性コンゴ盆地型サル痘ウイルス(MPXV)と低病原性西アフリカ型 MPXV の鑑別可能な定量的 PCR 法による MPXV 感染症の診断: 第 55 回日本ウイルス学会・学術集会, 札幌(2007.10)

3) 西條政幸、網康至、永田典代、長谷川秀樹、福士秀悦、水谷哲也、飯塚愛恵、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂: 高度弱毒化天然痘ワクチン LC16m8 の暴露後使用時の天然痘予防効果: 霊長類におけるサル痘モデルによる検討: 第 11 回日本ワクチン学会学術集会, 横浜(2007.12)

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。





図1 サル痘ウイルスZr-559株接種後18日目の顔面皮膚ポック形成部位の組織病変。A:表皮層は増生し、一部痂皮、びらん、炎症性細胞浸潤を認める(HE染色)。B:有棘細胞層は増生し、一部に膨化あるいは萎縮した上皮細胞が存在する。膨化した上皮細胞の細胞質は磨りガラス状を呈し、封入体は不明瞭である。(HE染色、撮影倍率x50)。膨化した細胞とその周囲の細胞の細胞質の一部にポックスウイルス抗原が検出された。核周囲の一部に顆粒状に強陽性部位がみられ、細胞質全体は比較的弱い発色であった(挿入図、LSAB法、撮影倍率x100)。C:透過型電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察。扁平上皮細胞の細胞質に種々の粒子形成過程を示す、ポックスウイルス粒子が存在した。感染細胞の核小体は明瞭で、クロマチンが核周囲に偏在している。成熟粒子は長径およそ300nmのポックスウイルスに特徴的な形状を示した(挿入図)。

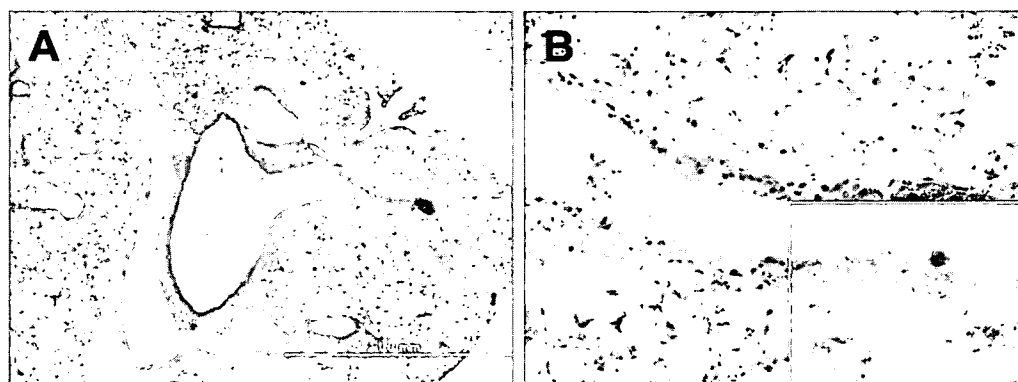


図2 ワクチニアウイルスWestern Reserve株経鼻接種14日目のBALB/cマウス肺。A:細気管支から肺胞道を中心とした壊死性炎症所見を認める(HE染色)。B:細気管支—肺胞道上皮の核は萎縮し、細胞質は好酸性の急性壊死所見を示した(HE染色x50)。これらの細胞質はウイルス抗原陽性であった(LSAB法x100)。気道直下の固有層と肺胞腔内には好酸性の滲出物が認められ、一部の肺胞壁は急性壊死像を呈した。

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

ダニ媒介性脳炎ウイルスのマウスモデルにおける接種量と致死性の解析

分担研究者 早坂大輔 (財)東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 主任研究員

研究要旨:ダニ媒介性脳炎ウイルスの致死性に関わる病原性発現機序についてマウスモデルを用いた解析を行った。Oshima 株はマウスに皮下接種後、接種量に依存しない致死性を示した。特に  $10^2$ - $10^6$  PFU 接種ではすべてのマウスでウイルスの神経侵入、発症がみられたが、致死率は接種量に関係なく 40-60%となった。致死性には異なる2つのパターンがみられ、 $10^2$ - $10^6$  PFU 接種では12日目以降の遅い時期に死にはじめるパターンを示した。この時期は脳でのウイルス増殖のピーク後であったため、ウイルスの神経細胞への直接の傷害というよりは、宿主側の要因が致死性に関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎ウイルスは日本脳炎ウイルスやウエストナイルウイルスとともにフラビウイルス科に分類され、人に致死性の重篤な急性脳炎疾患を起こす。ダニ媒介性脳炎ウイルスはヨーロッパから極東地区の広い範囲にわたって分布し、人にはマダニの媒介により感染し、末梢臓器での増殖後、神経組織へ侵襲、脳炎の原因となると考えられている。ダニ媒介性脳炎ウイルスを含む脳炎性フラビウイルスの毒力、病原性、致死性を解析するうえでマウスモデルが1930年代から用いられてきた。ところが、ウイルスによってはマウスに末梢からウイルスを接種しても致死性が接種量に依存せず、その理由はこれまで明確に説明されていない。そこで本研究ではダニ媒介性脳炎ウイルスのマウスモデルにおける感染後の死

に至る機序を解析し、致死性が接種量に依存しない理由を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

TBEV Oshima 株を接種量を変えて雌5週齢 C57BL/6j マウスに皮下および脳内接種し、神経症状、体温、体重、生死を経日観察した。また、 $10^3$ と $10^7$  PFU 接種後の末梢、神経組織でのウイルス増殖を調べた。動物実験は東京都神経科学総合研究所における動物実験指針に沿って行った。

C. 研究結果

TBEV Oshima 株はマウスに皮下接種後、接種量に依存しない致死性を示した。特に  $10^2$ - $10^6$  PFU 接種においては接種量に関係なく致死率が

40-60%となった。10<sup>7</sup>以上の皮下接種および脳内接種ではほぼすべてのマウスが死に至った。ウイルス接種後のマウスにおいて元気消失、活性低下、運動低下、前後肢弛緩性麻痺、瀕死状態などの症状のほか、体重減少が顕著にみられた。体温については人での症状のような発熱はみられず、逆に症状が進むにつれ体温低下がみられた。これらの症状がみられたマウスを発症したとみなし発症率を調べたところ、10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> PFU 接種のすべてのマウスで発症していることがわかった。また、これらの症状が確認されたマウスすべての脳でウイルス増殖が確認された。マウスの致死時の体重と感染後日数から、致死性には少なくとも2つの異なるパターンがみられた。ひとつは感染後7日目から死にはじめ、体重減少が20%前後のうちに死ぬパターンで10<sup>7</sup>以上の皮下接種および脳内接種でみられた。もうひとつは感染後12日目以降で死に、体重減少が40%前後まで進んで死ぬパターンで10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> PFUの皮下接種でみられた。10<sup>3</sup>と10<sup>7</sup> PFU皮下接種後のウイルス増殖を比較したところ、10<sup>3</sup> PFUに比べ10<sup>7</sup> PFUは末梢臓器で2日ほど早い増殖を示し、それに伴い脳でのウイルス増殖も2日ほど早くみられ、ピーク時でのウイルスタイターも高かった。両者とも末梢臓器では10日目までにウイルスは排除され、脳でのウイルス増殖も7-9日目をピークに減少しはじめた。

#### D. 考察

10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> PFU 接種ではウイルスは神経組織に侵入しすべてのマウスで発症するが、致死率は40-60%で残りは回復する。すなわちこのときの致死性は神経侵入性に関係なく、神経組織でのウ

イルス増殖とそれに伴う炎症以降の機序が関係しているものと考えられた。感染後7日目から死ぬパターンではウイルス増殖のピークで感染マウスが死にはじめたことから、ウイルス感染による直接の神経細胞死が原因と考えられた。一方、12日目以降で死ぬパターンではウイルスの増殖ピーク後、脳からウイルスが排除されているところで死ぬことから別の機序が致死性に関係していることが考えられた。

#### E. 結論

ダニ媒介性脳炎ウイルスのマウスモデルにおいて皮下接種後にみられる致死性の接種量非依存性は、10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> PFU 接種後の致死性の機序が関係していると考えられる。その機序は、本来考えられていたウイルスの神経進入、神経細胞への感染による直接の傷害が主たる要因ではなく、それ以降すなわち宿主側の炎症反応もしくはその他の要因が大きく関わっていると思われる。今後、接種量非依存性をおこす致死性の機序について詳細な解析を進める。

#### P. 健康危険情報

なし

#### Q. 研究発表

##### 1.論文発表

- 14) Terajima, M., Hayasaka, D., Maeda, K. and Ennis, FA.: Immunopathogenesis of hantavirus pulmonary syndrome and hemorrhagic fever with renal syndrome: Do CD8+ T cells trigger capillary leakage in viral

- hemorrhagic fevers? Immunol. Lett. 113 : 117-120, 2007
- 15) Hayasaka, D., Terajima, M. and Ennis, FA.: Pathogenesis of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses. Virol. J. 27 : 4-22, 2007
- 16) Hayasaka, D., Maeda, K. and Ennis, FA. and Terajima, M.: Increased permeability of human endothelial cell line EA.hy926 induced by hantavirus-specific cytotoxic T lymphocytes. Virus Res. 123 : 120-127, 2007
- 現機序の解析:第144回日本獣医学会学術集会、江別(2007, 9)
- 29) 早坂大輔:脳炎性フラビウウイルスのマウスモデルにおいて致死性=病原性=神経侵入性?:第14回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会、札幌(2007, 10)
- 30) 早坂大輔、小池智:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)をマウスに皮下感染させた際の接の違いによる病原性発現機序の解析:第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌(2007, 10)

## 2.学会発表

- 27) 早坂大輔:向神経ウイルスのマウス経鼻感染モデルを用いた病原性発現機序の解析:第4回ウイルス学キャンプ in 湯河原、湯河原(2007, 6)
- 28) 早坂大輔、寺嶋正教、小池智:向神経ウイルスのマウス経鼻感染モデルを用いた病原性発
- 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

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Bin Abu Daud, N.H., Kariwa, H., Tanikawa Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I	Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus Hantavirus) among Grey Red-Backed Voles, <i>Myodes rufocanus</i> , in Hokkaido, Japan.	Microbiol Immunol	51(11)	1081-1090	2007
Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L.I., Iwasaki, T., Takashima, I	A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia	Jpn J Vet Res	54(4)	145-161	2007
Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Arikawa J	Hantavirus infection in East Asia.	Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis	30	341-356	2007
Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., Arikawa, J	Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8+ T cells in mice.	Virology	365(2)	292-301	2007
Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Truong, U.T., Truong, U.N	Hantavirus Infection-typical rodent-borne viral zoonosis	Tropical Medicine and health	35(2)	55-59	2007
Chandy S, Yoshimatsu K, Ulrich RG, Mertens M, Okumura M, Rajendran P, John GT, Balraj V, Muliylil J, Mammen J, Abraham P, Arikawa J, Sridharan G.	Seroepidemiological study on hantavirus infections in India	Trans R Soc Trop Med Hyg	102(1)	70-74	2008
有川二郎	ハンタウイルス肺症候群	日本臨床	65巻, 増刊号3	126-130	2007
有川二郎	腎症候性出血熱	日本臨床	65巻, 増刊号3	112-116	2007
Kosoy, M., Morway, C., Sheff, K. W., Ying Bai, Colborn, J., Chalcraft, L., Dowell, S. F., Peruski, L. F., Maloney, S. A., Baggett, H., Sutthirattana, S., Sidhirat, A., Maruyama, S., Kabeya, H., Chomel, B. B., Kasten, R., Popov, V. Robinson, J., Kruglov, A., and Petersen, L. R.	<i>Bartonella tamiae</i> sp. nov., a Newly Recognized Pathogen Isolated from Three Human Patients from Thailand.	J. Clin. Microbiol.	46(2)	772-775	2008
丸山総一	吸血昆虫と新興感染症	ダニと新興再興感染症		267-276	2007
Iwata, T., Une, U., Okatani, A. T., Kato, Y., Nakadai, A., Lee, K., Watanabe, M., Taniguchi, T., Elhelaly, A. E., Hirota, Y., Hayashidani, H.	Virulence characteristics of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> isolated from breeding monkeys in Japan	Vet. Microbiol	In Press		2008
中臺文, 塩谷亮, 加藤行男, 黒木敏郎, 岩田剛敏, 廣田好和, 林谷秀樹	硬いで飼育されている爬虫類におけるサルモネラの保有状況	獣医畜産新報	60(5)	386-387	2007
Ike, F., Bourqade, B., Sato, H., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Yamada, Y., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., Montagutelli, X.	LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer	Comp. Med.	53(3)	272-281	2007
Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, K., Kurane, I., Morikawa, S.	Recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever	Clin. Vac. Immunol.	14(9)	1182-1189	2007
Hayasaka D, Maeda K, Ennis FA, Terajima M	Increased permeability of human endothelial cell line EA.hy926 induced by hantavirus-specific cytotoxic T lymphocytes	Virus Res	123(2)	120-127	2007
Terajima M, Hayasaka D, Maeda K, Ennis FA	Immunopathogenesis of hantavirus pulmonary syndrome and hemorrhagic fever with renal syndrome: Do CD8+ T cells trigger capillary leakage in viral hemorrhagic fevers?	Immunol Lett	113(2)	117-120	2007

## IV. 研究成果の刊行物・印刷

# Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus *Hantavirus*) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan

Nur Hardy Abu Daud<sup>1</sup>, Hiroaki Kariwa<sup>\*1</sup>, Yoich Tanikawa<sup>1</sup>, Ichiro Nakamura<sup>1</sup>, Takahiro Seto<sup>1</sup>, Daisuke Miyashita<sup>1</sup>, Kentaro Yoshii<sup>1</sup>, Mina Nakauchi<sup>1</sup>, Kumiko Yoshimatsu<sup>2</sup>, Jiro Arikawa<sup>2</sup>, and Ikuo Takashima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060–0818, Japan, and <sup>2</sup>Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060–8638, Japan

Received May 31, 2007; in revised form, August 6, 2007. Accepted August 8, 2007

**Abstract:** Hokkaido virus (HOKV) is a member of the genus *Hantavirus*, in the family *Bunyaviridae*. To investigate HOKV infection in the host *Myodes rufocanus*, the grey red-backed vole, 199 animals were captured at Tobetsu (October 2004 and July 2005) and Nakagawa (October 2004) in Hokkaido, Japan, for detection of antibody, antigen, and viral RNA. In the surveys in Tobetsu (2004) and Nakagawa (2004), seropositive animals were detected at a frequency of 6.0% (5/84) and 10.4% (5/48), respectively. No seropositive animals were detected in Tobetsu in 2005. Seroprevalence in males in Tobetsu and Nakagawa in 2004 was 25% (1/4) and 45.5% (5/11), respectively, which was higher than in females, at 5.0% (4/80) and 0% (0/37), respectively ( $P < 0.01$ ). These results suggest that male animals play an important role in the maintenance of HOKV in *M. rufocanus*. Two females were seronegative but viral RNA-positive, indicating that these animals had acute infections before antibody was produced. Another five infected animals in Nakagawa were all male and had high levels of antibodies and viral RNA, suggesting that they had persistent infections. Viral RNA copies in organs of infected animals in Nakagawa were quantified by real-time polymerase chain reaction. Two acutely infected animals had  $\geq 10$  times the number of RNA copies in their lungs compared to those of persistently infected animals. In most cases, lungs or spleen had the highest RNA copy number, regardless of infection status.

**Key words:** Hantavirus, Rodent, Epidemiology

Hantaviruses are the causative agents of rodent-borne zoonotic diseases called hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Eurasian countries, and hantavirus pulmonary syndrome (HPS) in American countries (12, 41). Viruses in the genus *Hantavirus* within the family *Bunyaviridae* are maintained in rodents and are transmitted to humans via excreta of infected rodents (48, 56). The virus genome is tripartite, single, and negative-stranded RNA consisting of small (S), medium (M), and large (L) segments, which encode nucleocapsid protein (NP), glycoproteins (G1 and G2), and viral RNA polymerase, respectively (2, 52). Humans are considered a “dead-end” host for hantaviruses, but there is the one exceptional case of Andes virus (ANDV) infection that is transmitted from human to human (13, 47). Hantavirus infection among rodents occurs by

*Abbreviations:* Ab, antibody; Ag, antigen; ANDV, Andes virus; BAYV, Bayou virus; BCCV, Black Creek Canal virus; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; DDW, deionized distilled water; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; DOBV, Dobrava virus; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine tetraacetate acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FAM, carboxyfluorescein; FITC, fluorescein isothiocyanate; G, glycoprotein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HFRS, hemorrhagic fever with renal syndrome; HOKV, Hokkaido virus; HPS, hantavirus pulmonary syndrome; HTNV, Hantaan virus; IFA, immunofluorescent antibody assay; KCl, potassium chloride; L, large; LECV, Lechiguanas virus; LNV, Laguna Negra virus; M, medium; MGB, minor groove binder; NaCl, sodium chloride; NP, nucleocapsid protein; NYV, New York virus; OD, optical density; OPD, *o*-phenylenediamine; PBS, phosphate buffered saline; PBST, PBS with Tween 20; PCR, polymerase chain reaction; PMSF, phenylmethylsulphonyl fluoride; PO, peroxidase; PUUV, Puumala virus; RMV, Rio Mamore virus; RNA, ribonucleic acid; rNP, recombinant NP; RT, reverse transcription; S, small; SD, standard deviation; SEOV, Seoul virus; SNV, Sin Nombre virus; Tris-HCl, Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride.

\*Address correspondence to Dr. Hiroaki Kariwa, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita-18, Nishi-9, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060–0818, Japan. Fax: +81–11–706–5212. E-mail: kariwa@vetmed.hokudai.ac.jp

direct physical contact (46) or through saliva, feces, and urine (59).

Each hantavirus is associated predominantly with one host rodent, and more than 30 different viruses have been identified in the genus *Hantavirus* (61). The host-virus relationships related to HFRS are *Apodemus agrarius*-Hantaan virus (HTNV) (32), *Rattus norvegicus*-Seoul virus (SEOV) (10), *Apodemus flavicollis*-Dobrava virus (DOBV) (4), and *Myodes glareolus*-Puumala virus (PUUV) (44, 60). The host-virus relationships in HPS are *Peromyscus maniculatus*-Sin Nombre virus (SNV) (43), *Peromyscus leucopus*-New York virus (NYV) (53), *Sigmondon hispidus*-Black Creek Canal virus (BCCV) (50, 51), *Oryzomys palustris*-Bayou virus (BAYV) (29, 55), *Oligoryzomys longicaudatus*-ANDV (8), *Oligoryzomys flavescens*-Lechiguanas virus (LECV) (8), *Oligoryzomys microtis*-Rio Mamore virus (RMV) (6), and *Calomys laucha*-Laguna Negra virus (LNV) (21).

In Japan, all HFRS cases have been reported in relation to urban rats (33, 54) and laboratory rats (27, 57). However, no HFRS cases have been officially reported in the past 20 years (3, 24), although antibody to SEOV was detected in one person from the Japan Ground Self-defense Forces in Hokkaido (35), and seropositive individuals have been reported among patients with unknown hepatic disorders (24).

Seroepizootiological surveys on Hokkaido Island, the northern-most major island of Japan, have revealed that *M. rufocanus* is a predominant host for Hokkaido virus (HOKV), which is serologically related to PUUV, but has a genetically distinct lineage from the European PUUV (25). Although HOKV is widely distributed in Hokkaido (26, 35), little is understood about the mode of infection of HOKV in *M. rufocanus*. Recently, Iwasa et al. (20) reported that horizontal infection may be the main means of maintaining HOKV in the *M. rufocanus* population, as shown by microsatellite analysis. In this study, we analyzed HOKV infection in *M. rufocanus* populations from various areas, by detection of anti-HOKV antibody, viral antigen and viral RNA, to reveal the mode of HOKV infection in *M. rufocanus*. This should enable us to understand the mechanism of hantavirus maintenance in nature.

## Materials and Methods

**Epizootiological surveys.** In 2004 and 2005, a total of 199 indigenous wild voles (*M. rufocanus*) were captured in the forests of Tobetsu, Ishikari District, and Nakagawa, Rumoi District, Hokkaido, Japan, by using live traps (Fig. 1). The traps were baited with oatmeal and left overnight. Blood samples were collected from

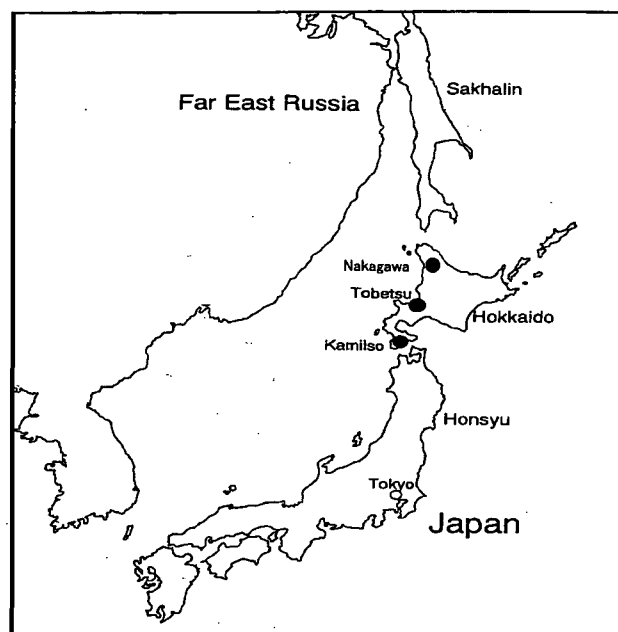


Fig. 1. Geographic location of survey points in Hokkaido at which *M. rufocanus* were captured. Filled circles indicate survey points in 2004 and 2005.

live animals via cardiac puncture under anesthesia, followed by collection of lungs, kidney, and spleen. Filter paper was used to collect blood samples from dead animals.

**Sample preparation.** Serum samples were heat-inactivated at 56 C for 30 min and stored at -40 C until use. Lungs, kidney, spleen, and blood clots were mixed with ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo) and homogenated by shaking with a zirconium bead at 3 frequency/sec for 3 min, using Qiagen M300 (Retsch, Haan, Germany) for total RNA extraction. After being kept at room temperature for 5 min, the homogenate samples were stored at -80 C until used for RNA extraction.

Lungs were also mixed with a lysis buffer [0.01 M Tris-HCl pH 7.8 (Kanto Chemical, Tokyo), 2% Triton X-100 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan); 0.15 M NaCl, 0.6 M KCl, 5 mM EDTA (Kanto Chemical); Aprotinin 2 µg/ml, Pepstatin 2 µg/ml, Leupeptin 5 µg/ml (Wako, Osaka, Japan), and 1 mM PMSF (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.)] (37) for viral NP detection. The homogenates were kept on ice for 30 min and centrifuged at 6,000–7,000 rpm for 10 min. Supernatants were collected and stored at -80 C until used for viral-antigen detection. Sample preparation was performed in a biosafety level 3 containment room, except for sample collections from animals that were carried out in the field.

**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** (i) **ELISA for antibody detection (Ab-ELISA):** Recombi-



nant NP (rNP) of HOKV was expressed as a fusion protein with N-utilization substance A (NusA). The rNP was diluted to 1.6 µg/ml with 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.8; Sigma). *Escherichia coli*-expressed NusA was also diluted to 1.6 µg/ml. These recombinant proteins were added to 96-well plates (100 µl/well) and kept at 4 C overnight. The plates were washed six times with phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBST), blocked with Block Ace (Dai Nippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) at a dilution of 1:5 in deionized distilled water (DDW), and incubated at 37 C for 1 hr. After washing, 1:100 dilutions of wild-rodent sera were applied to the plates (50 µl/well) and incubated at 37 C for 1 hr. The plates were washed and incubated with protein G/peroxidase (PO) conjugate (Zymed, San Francisco, Calif., U.S.A.; 50 µl/well) at 37 C for 1 hr. After washing, 200 µl *o*-phenylenediamine tablets (OPD; Sigma) with hydrogen peroxide were added to each well, and the plate was left at room temperature for 30 min. Finally, optical density (OD) values were measured at 450 nm using a Labsystem Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finland). The OD value of the rNP well minus that of the NusA well with the same serum was calculated and regarded as the ELISA value.

(ii) *ELISA for antigen detection (Ag-ELISA)*: Ninety-six-well flat-bottom microtiter plates (Coaster, Corning, N.Y., U.S.A.) were coated with anti-rNP rabbit IgG, diluted 1:100 with carbonate/bicarbonate buffer (Sigma), at 4 C overnight. The well coated with anti-NusA rabbit IgG at the same dilution was used as a control and kept at 4 C overnight. After washing, diluted Block Ace (1:5) was added to the plate and incubated at 37 C for 1 hr. Lung homogenates were diluted with PBST (1:40) and added to the plates, followed by incubation and washing. Diluted anti-PUUV mouse serum with PBST (dilution 1:1,000) was added to the plates, and incubated as described above. After washing, anti-mouse IgG PO (1:10,000 dilution) was added to the plates, which were further incubated. After washing, 200 µl OPD (Sigma) with hydrogen peroxide were added to each well, and the plate was left at room temperature for 30 min. The OD value of the anti-rNP rabbit IgG well minus that of the anti-NusA rabbit IgG well with the same serum was calculated and regarded as the ELISA value.

*Indirect immunofluorescent antibody assay (IFA)*. Vero E6 cells were infected with PUUV Sotkamo strain and cultured for 21 days in a CO<sub>2</sub> incubator. The infected cells were collected by trypsinization, seeded onto 24-well slides, and incubated for 4 hr in a CO<sub>2</sub> incubator. The cells were washed twice with PBS and fixed with cold acetone at -20 C for 20 min. After fixation,

the slides with the fixed cells were washed with distilled water, air dried, and stored at -30 C until use as the antigen slide. The sera from wild rodents were tested for anti-hantavirus antibodies by using the antigen slide and FITC-conjugated protein G (Zymed) (34, 39).

*RNA isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*. (i) *RNA extraction*: RNA was isolated from tissues (lungs, kidneys, spleen, and blood clots) using ISOGEN (Nippon Gene), according to the manufacturer's protocol.

(ii) *Reverse transcription*: Preparation for the first-strand synthesis of complementary DNA (cDNA) was done by mixing 11 µl extracted RNA (5 µg), 1 µl Random Primer (3 µg/µl) (Invitrogen, Carlsbad, Calif., U.S.A.), and 1 µl 10 mM dNTP (TaKaRa, Otsu, Japan). The RNA mixtures were heated at 70 C for 10 min, cooled to 25 C for 10 min, and chilled on ice for 3 min. The samples were further mixed with 4 µl 5× first-strand buffer (Invitrogen), 2 µl 0.1 mM DTT, and 1 µl SuperScript II (200 U/µl) (Invitrogen). cDNA synthesis was carried out at 42 C for 50 min and heated at 70 C for 15 min.

(iii) *PCR*: The reaction mixture for PCR was prepared by mixing with 1 µl cDNA sample, 18.75 µl DDW, 2.5 µl 10× HiFi buffer (Invitrogen), 1 µl 50 mM MgSO<sub>4</sub> (Invitrogen), 0.5 µl 10 mM dNTP (TaKaRa), 0.5 µl forward primer (10 µM), Hokkaido S172Fw (5'-CTGCAAGCACGGCAACAACAGTGTCTCAGCA-3'), 0.5 µl reverse primer (10 µM), Hokkaido S894Rv (5'-GTCGGGGACATGATTCTTATCAAGCACATC-3'), and 0.25 µl Platinum *Taq* DNA polymerase High Fidelity 5 U/µl (Invitrogen). Partial S segment was amplified according to a thermal cycling program with 40 cycles of denaturation at 94 C for 30 sec, annealing at 60 C for 30 sec, and extension at 68 C for 2 min. The PCR product was further amplified by a nested PCR with inner primer pairs, PUUV S269Fw (5'-CTAAGCCTGCTGACCCGACTGG-3') and PUUV S707Rv (5'-ACCCCATGACAGGACTCAT-3'). The PCR program consisted of 40 cycles of denaturing at 94 C for 30 sec, annealing at 57.5 C for 30 sec, and extension at 68 C for 2 min.

*Real-time PCR*. (i) *DNase treatment*: The mixture of total RNA for DNase treatment was prepared in a tube by adding 15 µg sample RNA, 5 µl 10× DNase buffer (TaKaRa), 2 µl DNase I (5 U/µl, RNase free; TaKaRa), 0.5 µl RNase Out Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl; Invitrogen), and DDW to make 50 µl. The sample was incubated at 37 C for 30 min, precipitated with Lithium Chloride Precipitation Solution (Ambion, Austin, Tex., U.S.A.), and dissolved in 30 µl DDW. The DNase-treated RNA was used for cDNA synthesis as described above.

(ii) *Real-time PCR*: The primers and minor groove binder (MGB) probes targeting HOKV S segment were designed using the software package Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, Calif., U.S.A.). Probe was labeled with the 5'-reporter dye FAM and a 3'-MGB/non-fluorescent quencher, respectively. After optimization of primer and probe concentrations, samples were assayed in quadruplicate in a 25- $\mu$ l reaction mixture. Each well of the sample plate for real-time PCR consisted of 2.25  $\mu$ l cDNA, 12.5  $\mu$ l 2 $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.225  $\mu$ l forward primer (100  $\mu$ M), Hokkaido 91Fw (5'-ATGGACCCAGATGACGTTAACA-3'), 0.225  $\mu$ l reverse primer (100  $\mu$ M), Hokkaido 231Rv (5'-TCAGCAGGCTTAGTATCCATCTT-3'), 0.46  $\mu$ l fluorescent probe (10.9  $\mu$ M), Hokkaido S (5'-ACAGT-GTCAGCATTGG-3'), and 9.34  $\mu$ l DDW. The sample was kept at 50 C for 2 min and 95 C for 10 min, followed by 60 thermal cycles at 95 C for 15 sec and 60 C for 1 min, with real-time data collection using the 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). For standardization, the same amount of cDNA was applied for rodent GADPH control with 12.5  $\mu$ l 2 $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.25  $\mu$ l 10  $\mu$ M Rodent GADPH Forward Primer, 0.25  $\mu$ l 10  $\mu$ M Rodent GADPH Reverse Primer, and 0.25  $\mu$ l 20  $\mu$ M Rodent GADPH Probe (VIC Probe). All primers and probes for real-time PCR were purchased from Applied Biosystems.

*Statistical analyses.* Viral RNA and antibody preva-

lence (i.e., the number of animals with detectable viral RNA or antibody, respectively) were compared between males and females using Chi-square analyses. The difference was considered statistically significant if  $P < 0.01$ .

## Results

### *Evaluation of Ab-ELISA by Comparison with IFA and RT-PCR in M. rufocanus Samples*

To efficiently detect antibodies to HOKV in *M. rufocanus* for analyzing the mode of infection in a rodent population, we expressed rNP in bacterial cells and tried to establish an Ab-ELISA by using rNP as the antigen. A total of 199 serum samples collected in three different surveys (Tobetsu, 2004 and 2005, and Nakagawa, 2005) were tested by IFA and Ab-ELISA. In IFA, eight sera had 1:32 or higher titers, ranging from 1:32 to 1:512, and were determined as positive (Fig. 2). In Ab-ELISA, the OD values ranged from -0.229 to 1.273. All IFA positive sera were also positive by Ab-ELISA (Fig. 2, Group A), if the cutoff value was set at OD 0.3. Above this value, two IFA negative sera (Tobetsu, 2004, #79 and #85) were considered positive by ELISA (Fig. 2, Group B). Since viral RNA was detected by RT-PCR from lung samples of these two voles in Group B and seven of eight voles in Group A (Fig. 2), ten rodents in Groups A and B were infected with HOKV. Ab-ELISA gave a sensitivity of 100% (8/8) and a specificity of 99.0% (189/191) to IFA in 199 *M. rufocanus* sera (Table 1). In the same way, Ab-

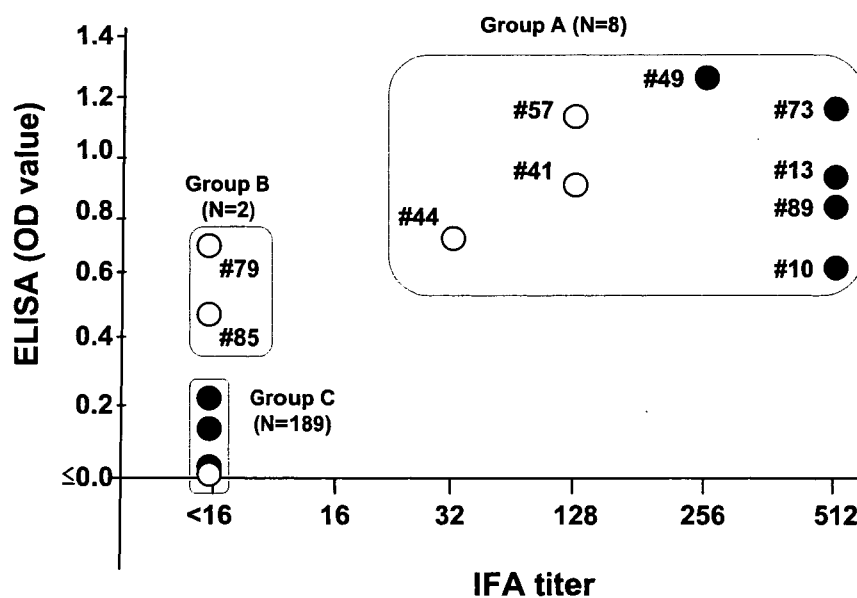


Fig. 2. Correlation of IFA titers and ELISA. The filled and open circles indicate samples from Nakagawa and Tobetsu, respectively. Group A, eight samples positive for ELISA and IFA; Group B, two samples positive for ELISA but negative for IFA; Group C, 189 samples negative for both tests. Cutoff points were 0.3 and  $\geq 16$  for ELISA and IFA, respectively.

ELISA gave a sensitivity of 81.8% (9/11) and 99.5% (187/188) specificity to RT-PCR.

Table 1. Ab-ELISA evaluation by comparison of IFA and RT-PCR

		ELISA		Total
		Positive (≥0.3)	Negative (<0.3)	
IFA	Positive (≥16)	8	8	0
	Negative (<16)	2	189	191
	Total	10	189	199
RTP-CR	Positive	9	2	11
	Negative	1	187	188
	Total	10	189	199

*Detection of HOKV NP by Ag-ELISA*

Ag-ELISA was used for detection of HOKV NP in *M. rufocanus*. OD values ranged from -0.092 to 0.566, with a mean of 0.005 and a standard deviation (SD) of 0.056. The cutoff value was set as the mean+5 SD, which was 0.286. Only two out of 199 (1.0%) *M. rufocanus* had detectable OD values but were negative for antibody. These two samples, #40 (OD 0.566) and #55 (OD 0.455) captured in Nakagawa (Fig. 3), were also positive for viral RNA, and the OD values of Ag-ELISA were significantly higher than the cutoff point. All other samples were negative for NP by Ag-ELISA.

*Prevalence of HOKV Infection in M. rufocanus Populations*

In a survey conducted at Tobetsu in October 2004,

Table 2. Prevalence of Puumala-related virus infection in *M. rufocanus* captured in Hokkaido

Place of survey	Date of survey	Prevalence (%)					
		Antibody <sup>a)</sup>			Viral RNA <sup>b)</sup>		
		Male	Female	Total	Male	Female	Total
Tobetsu	Oct, 2004	1/4	4/80	5/84	1/4	3/80	4/84
		(25.0)	(5.0)	(6.0)	(25.0)	(3.8)	(4.8)
Tobetsu	July, 2005	0/37	0/30	0/67	0/37	0/30	0/67
		(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
Nakagawa	Oct, 2004	5/11	0/37	5/48	5/11	2/37	7/48
		(45.5)	(0.0)	(10.4)	(45.5)	(5.4)	(14.6)
Total		6/52	4/147	10/199	6/52	5/147	11/199
		(11.5)	(2.7)	(5.0)	(11.5)	(3.4)	(5.5)

<sup>a)</sup> Antibody to HOKV was tested by Ab-ELISA.  
<sup>b)</sup> Viral RNA was detected by RT-PCR targeting for S RNA.

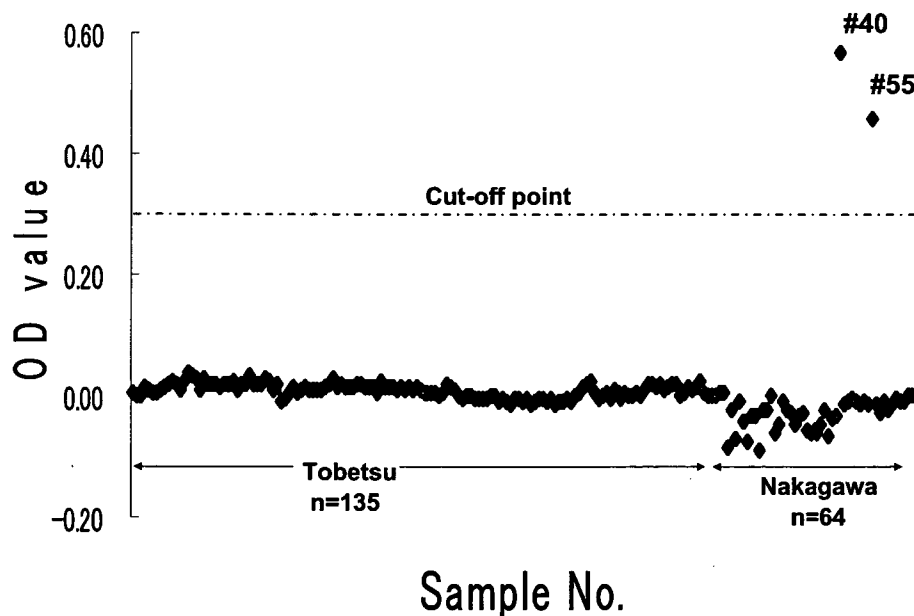


Fig. 3. Detection of NP of HOKV in *M. rufocanus* by Ag-ELISA (n=199). Cutoff point at 0.3 was set at the mean+5 SD.

five of 84 animals (6%) were positive by Ab-ELISA, with a seroprevalence of 25.0% (1/4) in male and 5.0% (4/80) in females (Table 2). Prevalence of viral RNA in males and females was 25% (1/4) and 3.8% (3/80), respectively. In a survey at Tobetsu in July 2005, no antibodies or RNA were detected in 67 voles captured. In a survey at Nakagawa in October 2004, 10.4% (5/48) and 14.6% (7/48) of animals were positive for antibodies and RNA, respectively. All seropositive animals were male and had viral RNA with a high prevalence of 45.5% (5/11).

#### Quantitative Detection of Viral RNA in Infected *M. rufocanus* by Real-Time PCR

Viral RNA-positive samples from Nakagawa were further tested by real-time PCR (Fig. 4). All seven rodents positive by RT-PCR also had positive results by real-time PCR, with varying RNA copy numbers in different voles and organs. Five (#13, #40, #55, #49, and #73) out of seven animals had the highest viral RNA copy number in the lungs or spleen, and a lower number in the kidneys or blood clots. Voles #40 and #55, which were antibody negative in both IFA and ELISA, had higher RNA copies than did the other animals. The RNA copies in lungs of voles #40 and #55 were 123,856 and 17,534, respectively, which were at least 10 times higher than those in other infected animals. Vole #89 had a unique pattern of viral RNA distribution, with lower RNA copy numbers in the lungs and higher

numbers in the spleen and kidneys. No viral RNA was detected in any of the organs and blood clots of vole #1, which was an antibody- and viral-RNA-negative animal.

#### Discussion

Hantaviruses are maintained in a variety of rodent species throughout the world. It is widely believed that hantaviruses and rodents have been co-evolving on a geological time scale, according to phylogenetic analyses of hantaviruses and rodents (40, 49). The infection dynamics among rodent populations may greatly influence the evolutionary process of hantaviruses. Therefore, studies on the transmission and maintenance of viruses in the rodent population are important for understanding the evolution of hantaviruses. Our repeated surveys in Kamiiso and Tobetsu revealed that SEOV and HOKV have been maintained stably for years in *R. norvegicus* and *M. rufocanus*, respectively (22, 26). In both SEOV and HOKV, transmission appears to occur mainly by horizontal infection. However, it is still unclear how the virus is maintained and transmitted in the rodent population, due to the lack of useful tools for monitoring infections among rodents.

To elucidate the mechanism of hantavirus maintenance in more detail, we tried to establish Ab-ELISA, Ag-ELISA, and real-time PCR for HOKV infection. Compared to IFA, Ab-ELISA had high sensitivity and

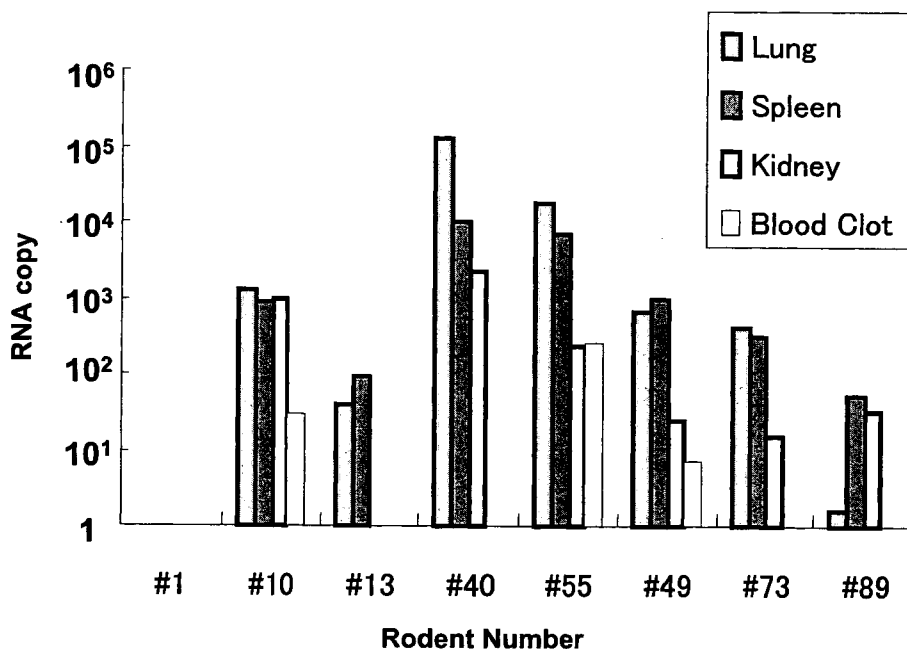


Fig. 4. Quantitative detection of HOKV RNA by real-time PCR in *M. rufocanus* captured at Nakagawa. Bars show RNA copy numbers. Ab-ELISA and viral-RNA-negative rodent #1; Ab-ELISA and RT-PCR-positive rodents #10, #13, #49, #73, #89; and Ag-ELISA and RT-PCR positive rodents #40 and #55.