

- 1) Saijo M., Suzutani T. Mizuta K. Kurane I. Morikawa S.: Characterization and susceptibility to antiviral agents of herpes simplex virus type 1 that codes a unique thymidine kinase gene with an amber codon between the first and the second initiation codons. Arch Virol 153:303-314 2008
- 2) Saijo M., Ami Y. Suzaki Y. Nagata N. Iwata N. Hasegawa H. Ogata M. Fukushi S. Mizutani T. Iizuka I. Sakai K. Sata T. Kurata T. Kurane I. Morikawa S.: Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. Jpn J Infect Dis 61:140-142 2008
- 3) Nagata N. Iwata N. Hasegawa H. Fukushi S. Harashima A. Sato Y. Saijo M. Taguchi F. Morikawa S. Sata T.: Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. Am J Pathol 172:1625-1637 2008
- 4) Ami Y. Nagata N. Shirato K. Watanabe R. Iwata N. Nakagaki K. Fukushi S. Saijo M. Morikawa S. Taguchi F.: Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. Infect Microbiol 52:118-127 2008
- 5) 福士秀悦平井明香新倉綾山田靖子前田健吉川泰弘横山勝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発現細胞を用いたSARSコロナウイルスの感染性の解析. 獣医畜産新報 61:199-201 2008
- 6) 北本憲利森川茂西條政幸加藤陽二田中智之: 抗ワクシニアウイルス単クローン抗体のサル痘ウイルスに対する反応性とその有用性. 感染症学雑誌82:224-225 2008
- 7) Watanabe S. Mizutani T. Sakai K. Kato K. Tohya Y. Fukushi S. Saijo M. Yoshikawa Y. Kurane I. Morikawa S. Akashi H.: Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). J Clin Virol 43:56-59 2008
- 8) Saijo M. Morikawa S. Kurane I.: Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. Exp Opin Med Diagnost 2:1155-1171 2008
- 2.学会発表
- 1) 西條政幸塩田智之錫谷達夫倉根一郎森川茂: 293T細胞におけるHSV-1組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用: 第18回抗ウイルス療法研究会 鹿児島(2008. 5)
- 2) Saijo M.: Virological insight into Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Xinjiang China: Third AREVA-Pasteur Forum Shanghai China (2008. 6)
- 3) Saijo M. Ami Y. Suzaki Y. Nagata N. Hasegawa H. Iwata N. Ogata M. Fukushi S. Mizutani T. Kurane I. Kurata T. Morikawa S.: Post-exposure vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine LC16m8 for protection of nonhuman primates from monkeypox: 13th International Conference on Infectious Diseases KL Malaysia (2008. 6)

- 4) Izuka I. Saijo M. Ami Y. Suzaki Y. Nagata N. Hasegawa H. Ogata M. Sakai K. Fukushi S. Mizutani T. Kurane I. Morikawa S.: The loop-mediated isothermal amplification-based diagnostics for monkeypox virus infection: 13th International Conference on Infectious Diseases KL Malaysia (2008. 6)
- 5) 西條政幸: 1類感染症: 第3回輸入感染症講習会 逗子市(2008. 9)
- 6) 水谷哲也山尾卓也江下優樹片野晴隆黒田誠 関塚剛史渡辺俊平明石博臣竹原一明木原悠希佐藤朝光西村美保酒井宏治福士秀悦 西條政幸緒方もも子中内美名倉根一郎森川茂: ウイルスの網羅的検出法(RDV法)と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見: 第56回日本ウイルス学会学術集会 岡山市 (2008. 10)
- 7) 酒井宏治網康至水谷哲也岩切章山本正悟平井明香須崎百合子滝本一弘田原口元子飯塚愛恵福士秀悦西條政幸永田典代長谷川秀樹山田靖子倉根一郎森川茂: 急性呼吸器疾患患者から分離された新型レオウイルスの性状解析及びマウスでの感染実験: 第56回日本ウイルス学会学術集会 岡山市 (2008. 10)
- 8) 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: SARS-CoV感染動物モデルを用いたSARS発症機序の解明と治療法の検討: 第56回日本ウイルス学会学術集会 岡山市 (2008. 10)
- 9) 石岡賢佐藤友香金子久俊西條政幸錫谷達夫: HSV-1に対するアシクロビルとインターフェロンが相乗効果を示す機構について: 第56回日本ウイルス学会学術集会 岡山市 (2008. 10)
- 10) 西條政幸網康至須崎百合子永田典代長谷川秀樹飯塚愛恵塩田智之緒方もも子酒井宏治中内美名福士秀悦水谷哲也. 倉根一郎森川茂: 劇症型サル痘に関する解析: 性状ウイルス学的所見病理: 第56回日本ウイルス学会学術集会 岡山市 (2008. 10)
- 11) 飯塚愛恵西條政幸網康至須崎百合子永田典代長谷川秀樹塩田智之緒方もも子酒井宏治中内美名福士秀悦水谷哲也. 倉根一郎森川茂: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法によるサル痘迅速診断: 第56回日本ウイルス学会学術集会 岡山市 (2008. 10)
- 12) 福士秀悦中内美名酒井宏治西條政幸水谷哲也緒方もも子. 倉根一郎森川茂: リフトバレー熱ウイルスのNPIに対する単クローン抗体の作製と抗原検出ELISA法への応用: 第56回日本ウイルス学会学術集会 岡山市 (2008. 10)
- 13) 中内美名福士秀悦酒井宏治水谷哲也緒方もも子倉根一郎西條政幸森川茂: 南米出血熱の実験室診断法の開発: 第56回日本ウイルス学会学術集会 岡山市 (2008. 10)
- 14) 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塩田智之佐多徹太郎倉田毅倉根一郎森川茂: 高度弱毒痘そうワクチンLC16m8の霊長類におけるサル痘発症予防: 長期予防効果に関する検討: 第12回日本ワクチン学会学術集会 熊本市 (2008. 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

3. その他

なし

なし

2. 実用新案登録

感染 18 日目の皮膚病変



図 1. サル痘ウイルス感染症皮膚病変(左から順に顔手掌陰囊).

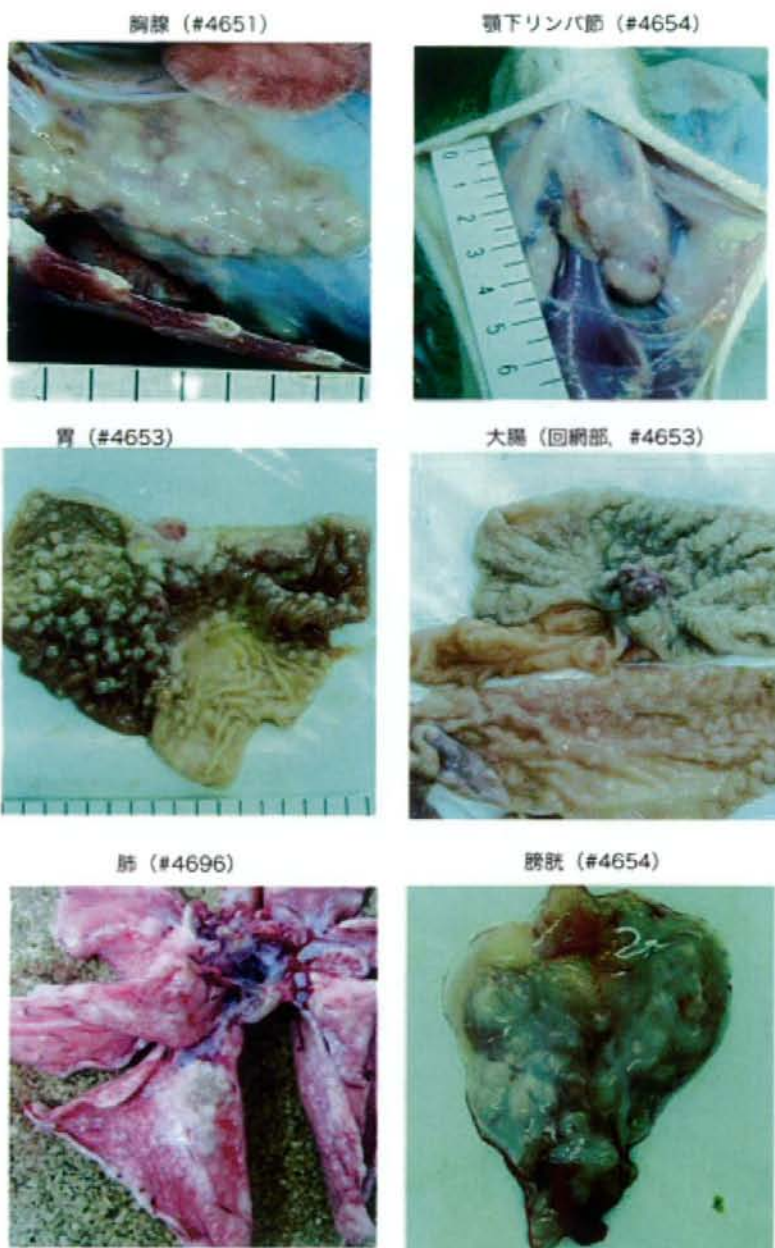


図 2. サル痘ウイルス感染カニクイザルでの内臓臓器における肉眼的病変。胸腺リンパ節胃(左中)回盲部肺膀胱に特徴的な顆粒状・乳頭状の病変が認められた。これらの臓器には組織化学免疫法によりサル痘ウイルス抗原の存在が確認された。

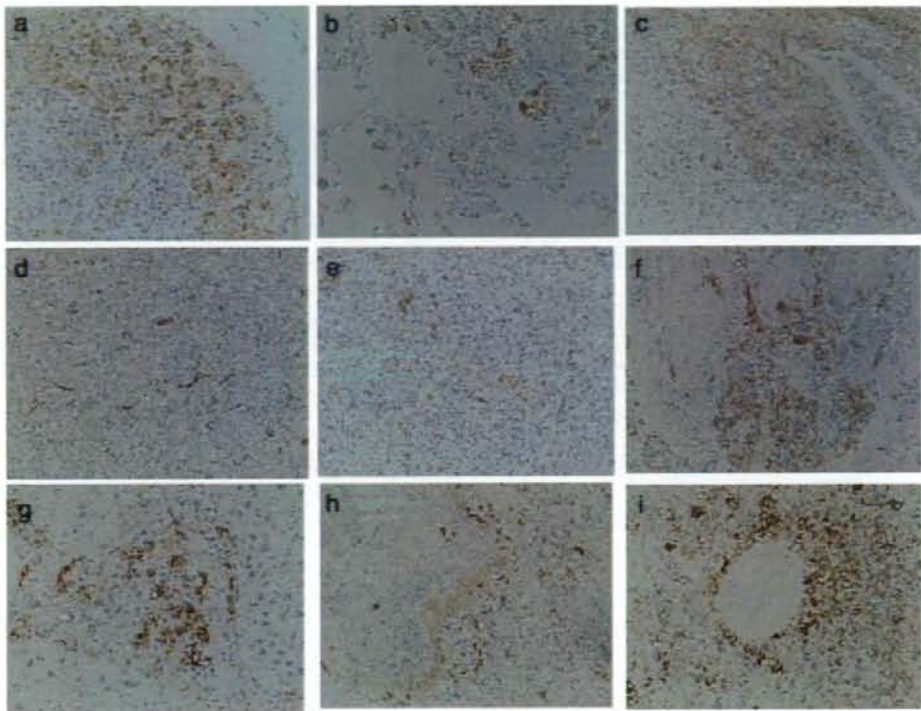


図 3. 組織化学免疫法による各臓器[頸部リンパ節(A #4683)肺(B#4683)口腔内粘膜(C #4683)肝臓(D#4683)脾臓(E#4683)直腸(F#4683) 辜丸(G#4683)子宮(H #4651) 卵巣(I #4651)]におけるウイルス抗原の検出.

図 1. サル痘ウイルス感染カニクイザルの各臓器における組織化学免疫法によるサル痘ウイルス抗原検出.

臓器	各臓器におけるサル痘ウイルス抗原陽性個体数			
	Zr-599/SC (4 個体)	Zr-599/IN (2 個体)	Liberia/SC (3 個体)	Liberia/IN (2 個体)
呼吸器臓器				
気管支	3	0	0	1
肺臓	3	0	0	2
循環器				
心臓	0	0	0	0
消化管臓器				
肝臓	4	1	1	0
脾臓	3	1	0	0
食道	0	0	0	0
胃	3	0	0	0
小腸	2	1	0	0
大腸	1	0	0	0
直腸	4	1	0	0
内分泌臓器				
甲状腺	2	0	0	0
副腎	1	0	0	0
リンパ系臓器				
顎下リンパ節	4	2	1	2
鼠径リンパ節	4	1	2	1
腋窩リンパ節	4	1	2	2
扁桃	4	1	2	2
胸腺	4	1	2	2
脾臓	3	1	0	2
咽頭	4	1	1	1
泌尿生殖器系臓器				
腎臓	0	0	0	0
膀胱	1	0	0	0
前立腺/子宮	2	0	1	1
睾丸/卵巢	3	1	0	0
皮膚				
皮膚	4	2	3	2
中枢神経組織				
大脳基底核側頭葉	0	0	0	0
前頭葉視床脊髄等				

「野生齧歯類および節足動物に由来する感染症の診断、疫学および予防に関する研究」

フラビウイルス感染組織の免疫組織化学法

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、原嶋綾子、佐藤由子(同所 感染病理部)

早坂大輔(東京都神経科学総合研究所)

研究要旨: 本年度は、フラビウイルス感染症のうち、当部で使用している日本脳炎、ウエストナイル熱・脳炎、および分与されたダニ媒介性脳炎の病理組織学的診断に使用する抗体の検討を行った。分与された抗ダニ媒介性脳炎ウイルス抗体はパラフィン切片を用いた免疫組織化学染色に有用であった。また、ダニ媒介性脳炎ウイルス陽性対照切片を準備した。

A. 研究目的

本年度は、フラビウイルス感染症のうち、日本脳炎、ウエストナイル熱・脳炎、ダニ媒介性脳炎の病理組織学的診断に使用する抗体の検討を行った。日本脳炎ウイルス(JEV)、ウエストナイルウイルス(WNV)、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)はいずれもフラビウイルス属で前者二つは、主にアジアではコガタアカイエカが媒介し、相同性が高く抗原的に交差反応を示す日本脳炎血清型群(Japanese encephalitis serocomplex)に分類される。ダニ媒介性脳炎はマダニ科に属する各種のマダニによって媒介される。いずれも終末宿主であるヒトに急性脳炎を引き起こすことが知られている。ダニ媒介性脳炎の疾患としてロシア春夏脳炎、中央ヨーロッパ型ダニ媒介性脳炎、跳躍病、キャサヌール森林熱、オムスク出血熱、ポアサン脳炎等があり、ともに高い致死率で回復後も神経性の後遺症が知られている。

中央ヨーロッパ型ダニ媒介性脳炎ではワクチンが開発され、市販されている。

予防・治療効果をしらべるための動物モデルとしてはいずれのウイルスにおいてもマウスモデルが用いられている。野外から分離された株の毒力の評価にも有用とされている。

B. 研究方法

これまで本研究室で使用しているJEV、WNV、およびTBEV抗体(苅和代表研究者より分与)を用いてTBEV感染マウス組織材料(早坂協力研究者より供与)での免疫組織化学染色をおこなった。

病理学および免疫組織学的検索

TBEV感染マウスの組織材料は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、一次抗体として抗JEVウサギポリクローナル抗体、抗WNVモノクローナル抗体（当部で作製したWNV10および8151 Chemicon International Incの2種、抗WNV10あるいは抗WNV8151）、あるいはTBEVのEタンパクを免疫したウサギから得た血清の精製IgGを用いた。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、あるいはクエン酸緩衝液pH6.0または1mmol/L EDTA含有10mmol/L トリス緩衝液pH9.0（TE緩衝液）中で121°C15分オートクレーブ処理による抗原賦活化を行った。その後、過酸化水素水・メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの阻止を室温30分で処理し、1次抗体を加え4°C一晩インキュベートした。その後、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。WNVに関してはGen pointシステムを用いた。

C. 研究結果

TBEV 感染マウスを用いた免疫組織化学染色の結果、われわれが用いている JEV、WNV 抗体に交差反応性は無かった。また、供与されたダニ媒介性脳炎ウイルス E タンパクに対する特異的抗体はパラフィン切片を用いた免疫組織化学染色に有用であった。ただし、抗原の賦活化処理にはトリプシン処理は不十分であり、クエン酸緩衝液 pH6.0 を用いたオートクレーブ法が有効であった（図 1）。この方法を用いてウイルス脳内接種後 8 日目のマウスにおけるウイルス抗原の検索を行ったところ、大脳、小脳、脊髄の中樞神経系に加え、下顎や腸管の神経叢の神経細胞にウイルス陽性細胞が認められ、これらに一致して神経細胞の強い変性、壊死、脱落とそれに伴う炎症性細胞のわずかな浸潤がみと

められた（図 2）。

D. 考察

TBEV と、JEV および WNV は免疫組織化学染色法において区別が可能であった。なお、当部で用いている抗 JEV および抗 WNV 抗体はいずれもパラフィン切片で使用可能であり、JEV ポリクローナル抗体は WNV に交差反応性があり、WNV モノクローナル抗体 2 種は JEV には交差反応性を示さないことをすでに確認している（厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 ウエストナイルウイルスの侵入に備えての診断、予防対策への基盤的研究 H17-H19 年度にて報告）。

また、感染動物の免疫組織化学染色によって、HE 染色所見では判別し難かった腸管神経叢を元とする諸臓器の神経叢におけるウイルス増殖の所見が明らかとなった。本抗体を用いた組織切片上での抗原検出はウイルスの病原性発揮機構を検索する上でも有用であると考えられた。

E. 結論

分与された抗ダニ媒介性脳炎ウイルス抗体はパラフィン切片を用いた免疫組織化学染色に有用であった。また、ダニ媒介性脳炎ウイルス陽性対照切片を準備した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Saijo M Ami Y Suzaki Y Nagata N Iwata N
Hasegawa H Ogata M Fukushi S Mizutani T
Iizuka I Sakai K Sata T Kurata T Kurane I

Morikawa S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay : differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. Jpn J Infect Dis. 2008 Mar;61(2) : 140-2

2. 学会発表

早坂大輔、永田典代、藤井克樹、長谷川秀樹、佐多徹太郎、鈴木隆二、小池智。ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)の皮下接種マウスモデルにみられる早い時期と遅い時期の致死性。第56回日本ウイルス学会学術集会(2008年10月岡山)

飛梅実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、徹太郎、狂犬病ウイルス抗原の細胞内局在に関する解析 第97回日本病理学会総会(2008年5月金沢)

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

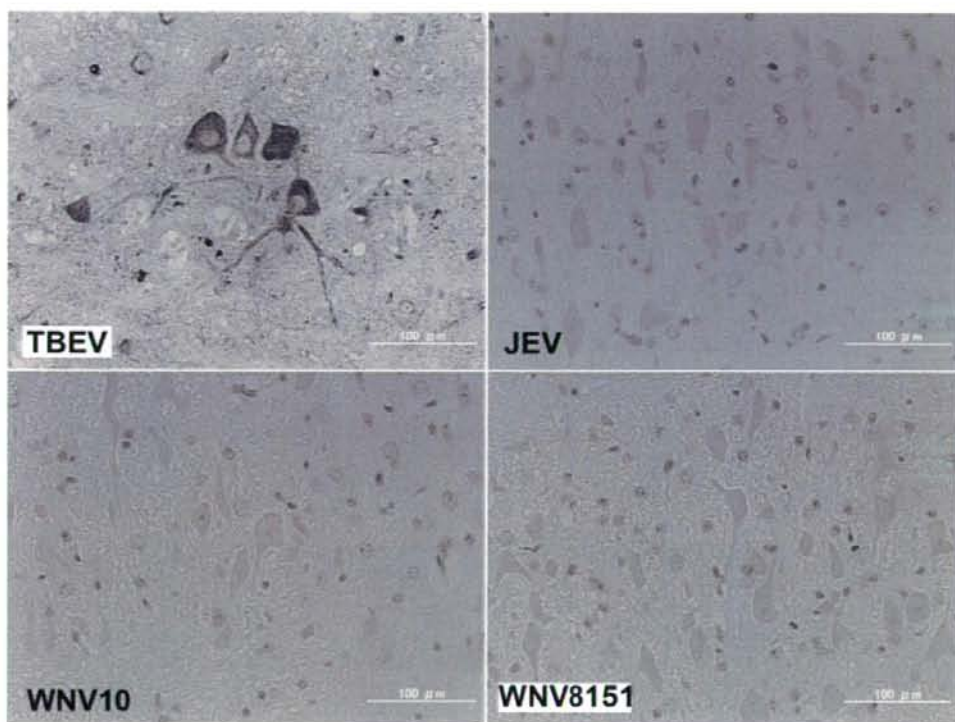


図 1 ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスの組織における各種フラビウイルス抗体の交差反応性。抗 TBEV 抗体を用いた場合のみ(クエン酸緩衝液 pH6.0 オートクレーブ 120°C15 分処理による抗原賦活化処理済)、神経細胞の細胞質内に陽性所見を得た。抗日本脳炎ウイルス、抗ウエストナイルウイルス抗体では陰性であった。図内のバーは 100 μ m を示す。免疫組織化学染色法。核染色はヘマトキシリンを用いた。

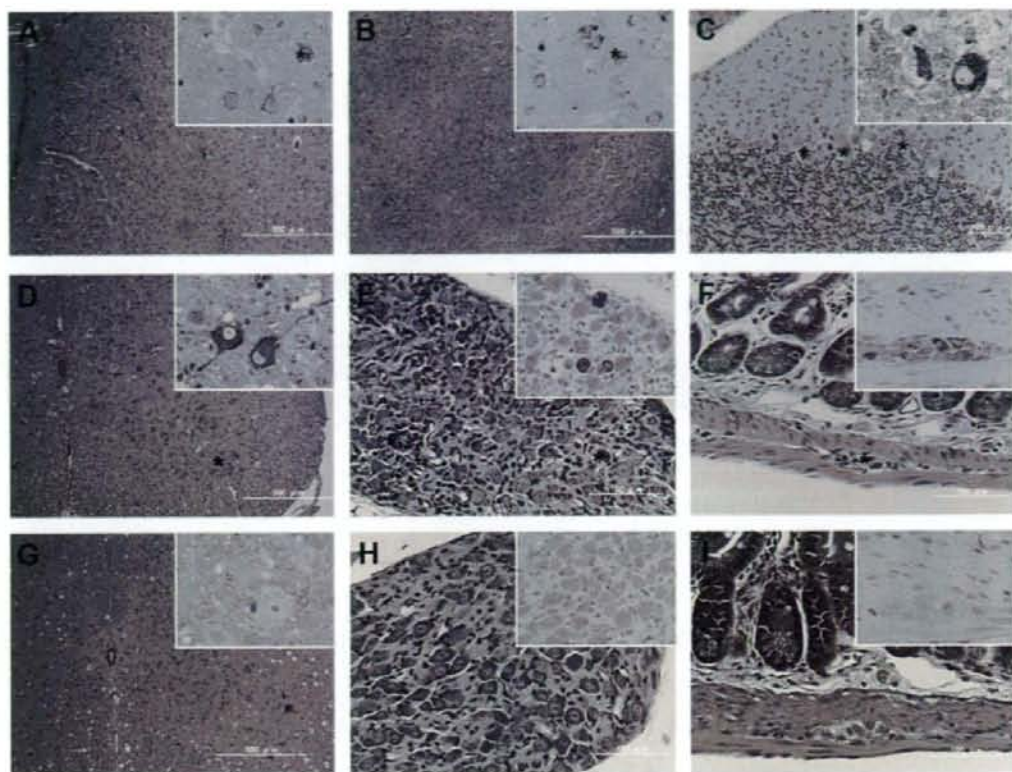


図 2 抗 TBEV 抗体を用いたダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスにおけるウイルス抗原検索結果。
 A-F: TBEV-Oshima 株脳内接種後8日目に解剖を行ったマウス(C57BL/6j, 5 週齢雌)の組織像。大脳
 皮質(A)、視床(B)、小脳皮質(C)、脊髓(D)、下顎部の神経節(E)、小腸筋層内の神経節(F)のいず
 れも神経細胞の細胞質内にウイルス抗原が検出された。これらに一致して神経細胞の変性、壊死、神
 経細胞の脱落像が認められた。G-I: 細胞培養液を脳内接種したマウスの脊髓(G)、下顎部の神経節
 (H)、小腸(I)。陰性コントロールとして使用した。A-I HE 染色、挿入図、免疫組織化学染色法。図内
 のバーは A B D G が 500 μ m、その他は 100 μ m。

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での病原性発現機序の解析とリアルタイム PCR 法による
TBEV ウイルス遺伝子検出系の確立

研究分担者 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: 1)ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)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 株をマウスに高接種量(10^7 PFU)で皮下感染させると、すべての個体で中枢神経系へのウイルス侵襲とそれに伴う炎症反応、臨床症状がみられ、致死率は 90%であった。マウスは感染後 7 日目から死にはじめ、中枢神経組織全体にわたる神経細胞へのウイルス感染が直接の致死性の原因であると考えられた。一方、低接種量(10^3 PFU)でもすべての個体で中枢神経系へのウイルス侵襲がみられたが、マウスが死ぬのは感染後 12 日目以降で、致死率は 40%であった。中枢神経系でのウイルス感染は早い時期では大脳皮質、遅い時期では小脳で多くみられたが、致死個体だけでなく回復個体でも同程度のウイルス感染がみられた。脳内の浸潤炎症性細胞数、主な炎症性サイトカインの発現量は致死個体と回復個体で有意な差はなかった。一方、致死個体では全身性のストレス応答と TNF α の発現量が有意に上昇していた。これらの結果から、致死性には脳炎に加えて全身性の特異的な反応が要因となっていると考えられた。2) TBEV 感染マウスの脳からエンベロープ蛋白、NS1 領域遺伝子をリアルタイム PCR 法で検出する系を構築した。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)はフラビウイルス科に分類され、人に重篤な急性中枢神経疾患を起こす。TBEV 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する。TBEV の病原性発現機序の解析にはマウスモデルが一般的に用いられている。特に、ウイルス感染後の病原性の指標として致死性が観察されるが、実際の死に至る機序

については不明な点が多い。また、TBEV の流行巣は北海道においても確認されているが、日本の他の地域における情報は十分ではないため、そのウイルス感染状況を知る必要がある。そこで本研究では以下の 2 つの項目を目的とした研究を行った。1)皮下接種後の致死性の機序について、マウスに皮下感染させたモデルで病原性発現の機序を解析する。2)野生げっ歯類からの TBEV 遺伝子検出法を確立するため、感染マウ

ス臓器サンプルを用いてリアルタイム PCR 法によりウイルス遺伝子を検出できる系を構築する。

B. 研究方法

1) TBEV Oshima 株を高接種量 (10^7 PFU) および低接種量 (10^3 PFU) で雌5週齢 C57BL/6j マウスに皮下接種し、症状、生死を経日観察した。また、中枢神経組織の部位ごとのウイルス量、脳での炎症反応、血清中のホルモンおよびサイトカイン発現量を測定した。

2) Oshima 株のエンベロープ (Env) 蛋白、NS1 領域の遺伝子配列をもとにプライマーをデザインした。 10^3 PFU の Oshima 株を皮下感染させたマウスから 81337 日目の脳から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法によりウイルス遺伝子の検出を行った。感染性ウイルスを用いた実験は BSL3 実験施設で行い、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

1) Oshima 株をマウスに 10^7 PFU で皮下感染させると、感染後 6-7 日目からすべての個体で体重減少がみられた。感染後 7 日目から死ぬ個体が見られ、致死率は 90% に達し致死個体の平均生存日数は 12.8 日であった。脳でのウイルス増殖のピークが 7-8 日目であったため、このときの中枢神経系の部位ごとのウイルス量を調べたところ、大脳皮質、視床、脳幹、小脳、脊髄の全体にわたって 10^6 PFU/g 脳以上の高いウイルス量が見られた。一方、 10^3 PFU で皮下感染させても感染後 8-9 日目からすべての個体で体重減少が見られた。しかしながら、致死個体は感染後 12 日目以降にみられ、最終的な致死率は 40%、致

死個体の平均生存日数は 15.8 日であった。脳でのウイルス増殖のピークは感染後 8-9 日目であったが、このときのウイルス量は大脳皮質では 10^6 PFU/g 脳と高かったのにくらべ、その他の部位では 10^4 PFU/g 脳以下と低かった。一方、マウスが死ぬ時期の感染後 13 日目では、小脳で 10^6 PFU/g 脳と高かったのにくらべ、その他の部位では 10^4 PFU/g 脳以下と低かった。ところが、ウイルス感染量とパターンは回復個体でも致死個体と同様にみられた。感染後 13 日目の脳内の浸潤炎症性細胞数、IFN γ IL-2 5 10 の発現量は致死個体と回復個体で有意な差はなかったが、TNF α の発現量は致死個体が高かった。全身性の反応において、致死個体では脾臓と胸腺の著しい萎縮がみられ、血清中のコルチコステロン量が回復個体にくらべ有意に高かった。また、血清中の IFN γ IL-1b IL-2 IL-4 IL-6 IL-10 IL-12 MIP-1a の量は致死個体と回復個体で差はなかったが、TNF α の量は致死個体が高かった。

2) 10^3 PFU の Oshima 株接種後のマウス脳から抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR 法によりウイルス Env 遺伝子の検出を試みた結果、Env、NS1 遺伝子はそれぞれ $10^{9.7}$ 、 $10^{8.2}$ コピー (8 日)、 $10^{7.8}$ 、 $10^{7.3}$ コピー (13 日)、 $10^{6.1}$ 、 $10^{5.6}$ コピー (37 日) であった。また比較のために 13 日目の同じサンプルについてプラーク法によるタイトレーションをしたところ、脳 (g) あたり $10^{5.4}$ PFU であった。

D. 考察

1) 高接種量 (10^7 PFU) では、急性かつ広範囲のウイルス感染による神経細胞死が起こり、結果として生命に関わる中枢神経系の機能障害のために個体が早い時期に死に至ったと考えられた。一

方、低接種量(10^3 PFU)では中枢神経組織でのウイルス感染および炎症反応に加えて、全身性のストレス反応およびTNF α の上昇が関与した反応が要因となって個体は遅い時期に死に至ったと考えられた。また回復する個体でも実際には脳炎は起こっていたことがわかった。

2)感染マウス脳サンプルからのリアルタイムPCR法では、Env 遺伝子の方がNS1 遺伝子より $10^{0.5}$ コピー数程度高く出る傾向があったが有意な差ではなかった。8日目の結果にくらべて1337日目と徐々に遺伝子コピー数が減少していることはブランク法によるタイトレーションの結果と同じ傾向であったため、ウイルスの量と相関していると考えられた。また、同じサンプルでの比較より、リアルタイムPCR法では遺伝子コピー数としては $10^{1.9-2.4}$ コピー数程度PFUの値より高くなっていたため、ブランク法によるタイトレーションより感度の高い検出法であると期待される。

E. 結論

1)これまで TBEV 感染マウスモデルにおいては一般的に致死性が病原性の指標としてみられてきた。特にウイルスが一旦中枢神経系に侵入してしまうとそのまま死に至ると考えられていたため、末梢感染後の致死性は神経侵入性の指標ととらえられてきた。ところが、本研究により実際には皮下感染後の致死性には脳炎以外の複数の要因も関与していることが示唆されたため、今後はマウスモデルにおいて致死性を見る際にはそのパターンを併せて観察する必要がある。また、本研究において感染後遅い時期では小脳に特異的にウイルスが感染していることが示された。今後はこの病態が人での病態にも関与しているか

を検討することにより、ダニ媒介性脳炎の治療法の開発に重要であると考えられる。

2)リアルタイム PCR 法により感染マウス脳から TBEV Oshima 株の Env および NS1 遺伝子が検出できる系がたてられた。今後は末梢臓器からも検出可能かどうかを検討したうえで、実際の野生げっ歯類の臓器からのサンプルを用いて調査を行う予定である。

Q. 健康危険情報

なし

R. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

- 5) 早坂大輔、小池智:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)の接種量、接種ルートの違いによる2種類の病原性発現機序の解析:第6回感染症沖縄フォーラム、沖縄(2008 2)
- 6) Daisuke Hayasaka Noriyo Nagata Hideki Hasegawa Tetsutaro Sata Satoshi Koike : Mortality determinants of subcutaneous infection with Tick-borne encephalitis virus in mice model : 42nd Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program Nagasaki (2008 5)
- 7) 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、小池 智:ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性発現機序の解析:第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会、観音寺(2008 5)
- 8) 早坂大輔:脳炎フラビウイルスの病原性発現機序の解析:第5回ウイルス学キャンプ in 湯

- 河原 湯河原 (2008 7)
- 9) 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、小池 智: マウスモデルにおいてダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)皮下接種後にみられる早い時期と遅い時期の致死性: 第 146 回日本獣医学会学術集会、宮崎 (2008 9)
- 10) 早坂大輔: 脳炎性フラビウイルスはどこから神経組織に侵入するのか: 第 15 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、岡山 (2008 10)
- 11) 早坂大輔、永田典代、藤井克樹、長谷川秀樹、佐多徹太郎、鈴木隆二、小池 智: ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)の皮下接種マウスモデルにみられる早い時期と遅い時期の致死性: 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山 (2008 10)
- 12) 藤井克樹、早坂大輔、小池 智、北浦一考、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎: フラビウイルス脳炎における脳内の生体反応の解析: 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山(2008 10)
- 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
Yoshii, K., Goto, A., Kawakami, K., Kariwa, H., Takashima, I.	Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus.	J. Gen Virol.	89 (1)	200-211	2008
Nakamura, I., Yoshimatsu, K., Lee, B.H., Okumura, M., Taruishi, M., Araki, K., Kariwa, H., Takashima, I., Arikawa, J.	Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection.	Arch. Virol.	153 (8)	1537-1542	2008
Abu Daud, N.H., Kariwa, H., Tkachenko, E., Dzagurnova, T., Medvedkin, a O., Tkachenko, P., Ishizuka, M., Seto, T., Miyashita, D., Sanada, T., Nakauchi, M., Yoshii, K., Maeda, A., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.	Genetic and antigenic analyses of a Puumala virus isolate as a potential vaccine strain.	Jpn J Vet Res. 56:	56 (3)	151-165	2008
Takashima I. Kariwa H. Shirato K.	Epidemiology and diagnosis of West Nile virus infection.	Glo Env Res	12(1)	21-25	2008
Chandy S, Yoshimatsu K., Ulrich R.G, Mertes M, Okumura M, JohnT, Balraj V, Muliyl J, Mammen J, Abraham P, Arikawa J, Sridharan G	Seropidemiological study on hantavirus infections in India.	Trans Royal Soc Trop Med Hyg. .	102(1)	70-74	2008
Taruishi M, Yoshimatsu K, Hatsuse R, Okumura M, Nakamura I, Arikawa J	Lack of vertical transmission of Hantaan virus from persistently infected dam to progeny in laboratory mice.	Arch Virol	153(8)	1605-1609	2008
Arai S, Ohdachi DS, Asakawa M, Kang HJ, Mocz G, Arikawa J, Okabe N, Yanagihara R	Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (<i>Urotrichus talpodeis</i>).	Proc Natl Acad Sci U.S.A.	105(42)	16296-16301	2008
Inoue K., Maruyama S, Kabeya H, Yamada N, Ohashi N, Sato Y, Yukawa M, Masuzawa T, Kawamori F, Kadosaka T, Takada N, Fujita H, Kawabata H	Prevalence and genetic diversity of Bartonella species isolated from wild rodents in Japan.	Appl Environ Microbiol	74(16)	5086-5092	2008
Ogasawara N, Tran TP, Ly TLK., Nguyen TT, Iwata T, Watanabe M, Taniguchi T, Hirota Y, Hayashidani H	Antimicrobial susceptibilities of Salmonella from domestic animals, food and human in the Mekong Delta, Vietnam.	J Vet Med Sci	70(11)	1159-1164	2008
Saijo M., Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Iizuka I, Sakai K, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S	Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains.	Jpn J Infect Dis	61(2)	140-142	2008
Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushi S, Saijo M, Yoshikawa Y, Kurane I, Morikawa S, Akashi H	Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV).	J Clin Virol	43(1)	56-59	2008
Saijo M. Morikawa S. Kurane I	Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics.	Exp Opin Med Diagnost	2(11)	1-17	2008

IV. 研究成果の刊行物・印刷

Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus

Kentaro Yoshii, Akiko Goto, Kazue Kawakami, Hiroaki Kariwa and Ikuo Takashima

Laboratory of Public Health, Department of Environmental Veterinary Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

Correspondence

Kentaro Yoshii
kyoshii@vetmed.hokudai.ac.jp

We have previously reported a system for packaging tick-borne encephalitis (TBE) virus subgenomic replicon RNAs into single-round infectious virus-like particles (VLPs) by using *in trans* expression of viral C/prM/E structural proteins. In this study, the *trans*-packaging system was applied to the generation of chimeric VLPs with mosquito-borne Japanese encephalitis (JE) virus. Although *trans*-expression of TBE virus C and JE virus prM/E proteins resulted in the secretion of VLPs, the expression of JE virus C/prM/E proteins did not lead to the secretion of VLPs, suggesting that homologous interaction between C and non-structural proteins or the genomic RNA is important for efficient assembly of infectious particles. Neutralization testing showed that the antigenic characteristics of the VLPs were similar to those of the native virus. Furthermore, the infectivities of the TBE virus- and JE virus-enveloped VLPs for the ISE6 tick cell line and C6/36 mosquito cell line were investigated. The VLPs were able to enter only those cells that were derived from the natural vectors for the respective viruses. TBE virus replicon RNA packaged in VLPs produced TBE virus non-structural proteins in tick cells, but could neither replicate nor produce viral proteins in mosquito cells. These findings indicate the importance of specific cellular factors for virus entry and replication during flavivirus infection of arthropods. These results demonstrate that chimeric VLPs are useful tools for the study of viral genome packaging and cellular factors involved in vector specificity, with the additional safety aspect that these chimeric VLPs can be used instead of full-length chimeric viruses.

Received 28 December 2006

Accepted 28 August 2007

INTRODUCTION

The genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*) contains important human pathogens, including tick-borne encephalitis (TBE) virus, Japanese encephalitis (JE) virus, yellow fever virus, dengue virus and West Nile (WN) virus. Flaviviruses can be divided into three phylogenetic and ecological groups: the tick-borne group, the mosquito-borne group and the no-known-vector group (Gaunt *et al.*, 2001; Gould *et al.*, 2003; Kuno *et al.*, 1998). The extent of transmission of arthropod-borne viruses depends on both ecological and physiological parameters, of which vector competence is the most important factor. Vector competence is determined by extrinsic and intrinsic factors, such as the physiological ability of vector tissue to become infected and to maintain a particular infectious agent (Hardy *et al.*, 1983; Kramer & Ebel, 2003; Nuttall & Labuda, 2003). The involvement of these factors in flavivirus infection is not well understood.

The flavivirus genome consists of a positive-polarity, single-stranded RNA of approximately 11 kb, which encodes three structural proteins, i.e. the core (C), pre-membrane (prM) and envelope (E) proteins, and seven non-structural (NS) proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5), within a single long open reading frame (Chambers *et al.*, 1990). The 5'- and 3'-untranslated regions (UTRs) have predicted secondary structures that are implicated in viral replication, translation and packaging of the genomes (Gritsun *et al.*, 1997; Proutski *et al.*, 1997; Rauscher *et al.*, 1997). In the process of assembly of virus particles, viral structural proteins are inserted co-translationally into the endoplasmic reticulum (ER) and processed by the NS2B–NS3 protease complex and signal peptidase, and the C proteins and genomic RNA, which form the icosahedral nucleocapsid, are encapsidated by budding into the luminal side of the ER (Mackenzie & Westaway, 2001). However, little is known about the details of the molecular mechanism of packaging.

The development of stable, infectious cDNA clones of flaviviruses has enabled the construction of chimeras of

A supplementary table showing primers used in this study is available with the online version of this paper.

different flaviviruses (Caufour *et al.*, 2001; Guirakhoo *et al.*, 2001; Mathenge *et al.*, 2004; Pletnev & Men, 1998; Pletnev *et al.*, 1992, 2002). These chimeric viruses are useful tools for the study of viral replication cycles and for vaccine development. Moreover, they can be applied to the study of host factors that are involved in vector competence for flavivirus transmission in cases where chimeric viruses are generated from flaviviruses borne by different arthropods.

For several flaviviruses, such as TBE virus (Gehrke *et al.*, 2003; Hayasaka *et al.*, 2004), Kunjin (KUN) virus (Khromykh & Westaway, 1997), WN virus (Scholle *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2002), dengue virus (Pang *et al.*, 2001) and yellow fever virus (Molenkamp *et al.*, 2003), subgenomic replicons have recently been constructed by deleting genes for viral structural proteins. These replicons can replicate in cultured cells by virtue of functioning NS proteins, but they cannot produce progeny infectious viruses owing to the lack of viral structural proteins. In recent studies, the expression of viral structural proteins in cells harbouring replicon RNA has resulted in the secretion of particles, which have been designated virus-like particles (VLPs). VLPs are infectious and the replicon RNAs packaged in VLPs replicate in infected cells. However, as viral structural proteins are not encoded by the replicon, progeny viruses cannot be produced. Thus, this single-round infectivity feature of VLPs enables safe handling under biosafety level 2 (BSL-2) conditions. VLP systems were developed for TBE virus (Gehrke *et al.*, 2003; Yoshii *et al.*, 2005), KUN virus (Harvey *et al.*, 2004; Khromykh *et al.*, 1998) and WN virus (Scholle *et al.*, 2004). The VLPs of flaviviruses are similar to the native virus in terms of their physical features and functional characteristics for infection. Therefore, VLPs can be substituted for native virions in investigations into the biological properties of flaviviruses.

Previously, we constructed a subgenomic replicon of Far-Eastern subtype TBE virus and developed the *trans*-packaging system for VLPs further (Hayasaka *et al.*, 2004; Yoshii *et al.*, 2005). In this study, the *trans*-packaging system was applied to the generation of chimeric VLPs between TBE virus and JE virus (tick- and mosquito-borne flaviviruses, respectively), to investigate the molecular mechanism of flavivirus packaging and the specificity of the competence of the natural host vectors for flavivirus infection.

METHODS

Cells and viruses. The baby hamster kidney (BHK)-21 cell line was grown at 37 °C in Eagle's minimal essential medium (MEM) that was supplemented with 8% fetal calf serum (FCS) and L-glutamine. C6/36 cells, which are derived from the mosquito *Aedes albopictus*, were grown at 28 °C in MEM with 10% FCS (Igarashi, 1978). The ISE6 cell line from the tick *Ixodes scapularis* (kindly donated by Dr U. G. Munderloh, University of Minnesota, MN, USA) was grown at 34 °C in L-15B medium with 10% FCS, as described by Munderloh *et al.* (1994).

TBE virus strain Oshima 5-10 and JE virus strain Nakayama were used in this study (Mason *et al.*, 1991; Takashima *et al.*, 1997).

Antibodies. Rabbit polyclonal anti-prM, anti-E and anti-NS3 antibodies were generated by immunization with the recombinant prM, E and NS3 proteins, as described in our previous study (Yoshii *et al.*, 2004). For the neutralization tests, we used the mouse anti-E monoclonal antibodies (mAbs) 1H4 and 4H8, which were prepared in our laboratory (Komoro *et al.*, 2000). Mouse mAbs 10B4 (anti-JE virus E) and 13E7 (anti-JE virus prM), which were provided by Dr E. Konishi (Department of Health Sciences, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan), were used in Western blotting. The anti-TBE virus, anti-Langat virus and anti-JE virus mouse polyclonal antibodies were prepared from the sera of mice infected with TBE virus strain Oshima 5-10, Langat virus strain TP-21 and JE virus strain Nakayama, respectively.

Plasmid construction. Derivation of the recombinant plasmid pcTBECME, which expresses all of the viral structural proteins derived from the Oshima 5-10 strain of TBE virus, has been described previously (Yoshii *et al.*, 2005). pcJEME, which is a pcDNA3-based plasmid that encodes the JE virus (Nakayama strain) genes for the signal sequence of prM and the prM and E proteins, was provided by Dr E. Konishi and Dr P. W. Mason (Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA) (Konishi *et al.*, 1998). For the construction of pcJECME, which encodes all of the viral structural proteins of the JE virus, viral RNA was extracted from a JE virus-inoculated suckling mouse brain, and RT-PCR was performed by using the primers *Bam*HIE5'f (forward) and pcJEME1200r (reverse) (see Supplementary Table S1, available in JGV Online) as described previously (Takashima *et al.*, 1997). The PCR products were digested with *Bam*HI and *Bsi*WI and inserted into the pcJEME plasmid.

For the construction of pcTBEC-JEME, which encodes TBE virus C and the JE virus signal sequence of prM and the prM and E genes, these fragments were amplified by fusion PCR. First, the DNA fragment that encodes the region of the TBE virus gene from the 5'-UTR to the NS2B-NS3 cleavage site of protein C was amplified by using pcTBECME as template with the *Bam*HITBE5'f and CrGGN primers, and the JE virus signal sequence of prM and the prM and E genes were amplified by using pcJEME as the template with primers CfGGN and pcJEME1200r. The CfGGN and CrGGN primers contain a complementary sequence that encodes the 3' end of the TBE virus C gene and the signal sequence of the JE virus prM. These two PCR fragments were subsequently used as templates in a second round of PCR with the *Bam*HITBE5'f and pcJEME1200r primers. The PCR products were digested with *Bam*HI and *Bsi*WI and inserted into the pcJEME plasmid.

For the construction of pcTBENS2B/3, which expresses the TBE virus NS2B-NS3 polyprotein, PCR was carried out using the *Xho*INS2Bf and *Eco*RINS3r primers. The PCR products were digested with *Xho*I and *Eco*RI and inserted into the pcCAGGS plasmid (Niwa *et al.*, 1991).

The TBE replicon RNA transcripts were prepared from the Oshima REPpt plasmid, as described previously (Hayasaka *et al.*, 2004).

Preparation of VLPs. TBE replicon RNA was transcribed from the Oshima REPpt plasmid and electroporated into BHK-21 cells, as described previously (Hayasaka *et al.*, 2004). After 24 h culture, the cells were transfected with the plasmid that expressed the flavivirus structural proteins, which was complexed with the *TransIT*-LT1 reagent (PanVera Corporation), as described previously (Yoshii *et al.*, 2004). At 36 h post-transfection, the supernatant was harvested and cleared by centrifugation at 1000 g for 10 min. The particles in the supernatant were precipitated with 10% PEG ($M_w=8000$) and 1.9% NaCl for 2 h at 4 °C, and pelleted at 10 000 g for 20 min. The pellets were resuspended in PBS supplemented with RNase A (20 µg ml⁻¹).

Infectivity assays. Titration of the VLPs was carried out as described previously (Yoshii *et al.*, 2005). Briefly, BHK-21 cells grown on

chamber slides were infected with serially diluted VLP solutions and incubated for 24 h at 37 °C. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100. After blocking with 2% BSA, the cells were incubated with anti-TBE virus NS3 rabbit IgG antibodies for 1 h and then treated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch). The images were viewed and recorded by using confocal microscopy.

In the particle neutralization test, 100 IU (infectious units) of VLPs were incubated with a serial dilution of the antibodies (described above) prior to infection of BHK-21 cells for 1.5 h. Particle-infected cells were visualized as described above.

In the case of experimental infections of ISE6 or C6/36 cells, cells grown on 16-well chamber slides were infected with VLPs at an m.o.i. of 1 and incubated for 48 h. Infected cells were visualized as described above.

SDS-PAGE and Western blotting. Transfected cells and supernatants were electrophoresed in SDS/polyacrylamide gels. The protein bands on the gels after SDS-PAGE were transferred onto PVDF membranes and incubated with 1% gelatin in 25 mM TBS that contained 0.01% Tween 20 (TBST). After washing with TBST, the membranes were reacted with the anti-E and/or anti-prM antibodies and then treated with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (Promega).

Infectivity to arthropod cells. ISE6 or C6/36 cells were infected with infectious VLPs at an m.o.i. of 1. Following VLP absorption for 1 h, the supernatants were harvested and remaining VLPs in the supernatant were titrated. The cells were treated with 0.1 mg Pronase ml⁻¹ (Roche) for 40 min to prevent non-specific binding of VLPs to the cell surface, as described previously (Mizutani *et al.*, 2003). The cell samples were harvested at 1, 2, 4 and 8 h post-infection. RNA was extracted from the cell and reverse transcription was carried out as described previously (Takashima *et al.*, 1997). PCR was carried out by using the following primers: for the region between the 5'-UTR and NS1 of TBE virus, TBES5'f and TBENS1r; for the *I. scapularis* β -actin gene, I-actin-F and I-actin-R; and for the *A. albopictus* β -actin gene, A-actin-F and A-actin-R (see Supplementary Table S1, available in JGV Online). The actin gene expression levels were used in control RT-PCR experiments to normalize the amount of cDNA used in each reaction.

RESULTS

Packaging of TBE virus replicon RNA into single-round infectious particles that contain the JE virus envelope

For expression of the flavivirus structural proteins used to package the TBE virus replicon RNA, the following four plasmid vectors, in which TBE virus and/or JE virus structural protein genes were cloned, were prepared (Fig. 1): pcTBECME, which encodes the TBE virus C/prM/E; pcJECME, which encodes the JE virus signal sequence of prM and the prM and E regions; pcJEME, which encodes the JE virus C/prM/E; and pcTBEC-JEME, which encodes the TBE virus C gene and the JE virus signal sequence of the prM-prM-E region.

For the RNA-packaging experiment, TBE virus replicon RNA was prepared from the Oshima REPpt plasmid, which

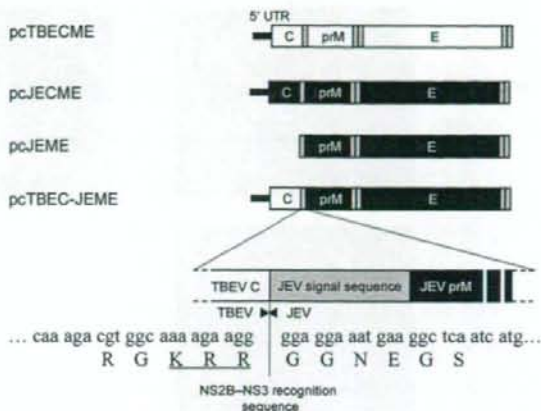


Fig. 1. Schematic representation of the plasmids used for expression of the flavivirus structural proteins. White regions are derived from TBE virus and black regions from JE virus. The signal sequence of prM of pcTBEC-JEME is derived from JE virus.

was constructed from the TBE virus infectious cDNA O-IC plasmid (Hayasaka *et al.*, 2004). In the BHK-21 cells that were infected with PEG-precipitated supernatant from pcTBEC-JEME- or pcTBECME- and replicon-transfected cells, the production of TBE virus NS3 proteins was detected by immunofluorescence assay (IFA) (Fig. 2a, d), which contrasted with the lack of viral protein production observed for cells that were infected with the supernatant of pcJEME- and replicon-transfected cells or that were transfected with replicon RNA alone (Fig. 2b, e). In the case of the supernatant from pcJECME- and replicon-transfected cells, IFA-positive cells were rarely seen (Fig. 2c; representative field). A second passage, in which the supernatants of the infected BHK-21 cell cultures were transferred to fresh BHK-21 cells, resulted in infection in the case of the RNA transfection from full-length infectious cDNA O-IC (authentic virus particles; Fig. 2i), but not in the case of transfection with replicon Oshima REPpt and pcTBEC-JEME or pcTBECME (Fig. 2g, h). These data demonstrate that the particles (VLPs) secreted by pcTBEC-JEME- or pcTBECME- and TBE virus replicon Oshima REPpt-transfected cells have only single-round infectivity potential.

C RNA homology requirement for the secretion of VLPs

To analyse the secretion of VLPs from cells transfected with plasmids that express flavivirus structural proteins and the replicon, transfected cells and supernatant were subjected to Western blot analysis (Fig. 3a). In cells that were transfected with pcTBECME and Oshima REPpt, TBE virus prM and E protein bands were detected by the TBE virus prM- and E-specific antibodies. Moreover, similar intensities were detected by the JE virus prM- and