

回日本獣医学会学術集会 (2009.9)

- 2) 中村進一、宇根有美、代田欣二、林谷秀樹、ラットにおける *Yersinia pseudotuberculosis* の感染防御抗原の検討、第 148 回日本獣医学会学術集会 (2009.9)
- 3) 林谷秀樹、秋山豊延、岩田剛敏、中村進一、TaqMan Real-Time PCR 法による *Yersinia pseudotuberculosis* の検出法の開発、第 148 回日本獣医学会学術集会 (2009.9)

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

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業)

研究分担者報告書

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

サル痘ウイルス感染症におけるサル痘ウイルスの各種蛋白に対する抗体応答

研究分担者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部第三室室長
研究協力者	網康至	国立感染症研究所動物管理室・主任研究官
	永田典代	国立感染症研究所感染病理部第二室・室長
	長谷川秀樹	国立感染症研究所インフルエンザセンター第六室・室長
	森川茂	国立感染症研究所ウイルス第一部第一室室長

研究要旨：サル痘ウイルスは、ポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される二本鎖 DNA ウイルスで、霊長類において天然痘様の急性発疹性疾患(サル痘、ヒトサル痘)を引き起こす。本研究では、輸入感染症対策として重要な感染症のひとつであるサル痘ウイルスに感染した場合の、サル痘ウイルスの各種蛋白に対する免疫応答を、カニクイザルのサル痘ウイルス感染モデルを用いてプロテオミク解析により明らかにした。全ての EEV 関連蛋白 (F13L, A33R, A34R, A36R, B5R) に対する抗体は感染 10 日目には検出された。IMV 関連蛋白 (L1R, H3L, D8L, A13L, A17L, L5R) に対する抗体応答は、H3L, D8L, A13L, A17L に認められ、L1R と L5R に対する応答は極めて弱かった。コア蛋白 (F17R, E11L, I1L, I3L, L4R, J1R, D2L, D3R, A4L, A10L, A12L) に対する抗体応答は、F17R, I1L, および、A4L に対する応答が強く認められた。病原因子関連蛋白 (C23L, C11R, C3L, N1L, K1L, E3L, A40R, A46R, B14R, B16R) の抗体応答では、C23L, C11R, および、E3L に対するものが比較的強く認められた。トランスクリプション関連蛋白および病原性関連蛋白に対する抗体応答についても解析した。サル痘ウイルス感染時には、全身感染に重要な働きを有する EEV 関連抗体を含め、多くの蛋白に対する抗体が誘導されることが明らかにされた。血清学的診断法の開発において、これらの研究成績は重要な知見を与えるものと考えられる。

A. 研究目的

サル痘は、サルにおける天然痘様疾患として 1958 年に初めて報告され、その病原体はサル痘

ウイルスであることが明らかにされた。サル痘ウイルスは、天然痘の病原体(痘瘡ウイルス)と同様に、ポックスウイルス科オルソポックスウイルス

属に分類される2本鎖DNAウイルスである。1970年には、ヒトのサル痘ウイルス感染症(ヒトサル痘)がコンゴ民主共和国(旧ザイール)において天然痘様疾患としてはじめて報告された。ヒトサル痘は、中央および西アフリカにおいて流行しており、現在でもコンゴ民主共和国などで流行している。2003年に、アメリカ合衆国において、ヒトサル痘がアフリカ大陸以外で初めて流行した。この流行は、サル痘ウイルスの宿主であるげっ歯類がペット用にアフリカからアメリカ合衆国に輸出され、それがサル痘ウイルスに感染していて、そのげっ歯類から、同一個所で飼育されていたプレーリードッグに感染が広がり、感染プレーリードッグからさらにヒトへ感染したことによる。このことは、ヒトサル痘は対策の必要な輸入感染症のひとつであることを示している。また、ヒトサル痘の臨床症状は天然痘と類似しているため、天然痘によるバイオテロの脅威に直面している現在、天然痘との鑑別診断の重要性が指摘されている。

本研究では、サル痘ウイルスに感染した場合の、サル痘ウイルスの各種蛋白に対する免疫応答を、カニクイザルのサル痘ウイルス感染モデルを用いてプロテオミク解析により明らかにした。

B. 研究方法

1. カニクイザル。3頭のカニクイザルにサル痘ウイルス Zr-599 株または Liberia 株を、それぞれ 10^6 PFU の感染価で皮下接種した。感染前、感染後第10日(または13日目)、21日目に末梢血液を採取した。血漿を分離し、熱非働化(56度 30分)処理した後、プロテオミク解析に供した。
2. ワクチニアウイルスの各種蛋白に対する抗体

応答の測定。In vitro translation 法を用いてワクチニアウイルスの各種蛋白[EEV 関連蛋白(F13L, A33R, A34R, A36R, B5R), IMV 関連蛋白(L1R, H3L, D8L, A13L, A17L, L5R), コア蛋白(F17R, E11L, I1L, I3L, L4R, J1R, D2L, D3R, A4L, A10L, A12L), ウイルス病原性因子関連蛋白(C23L, C11R, C3L, N1L, K1L, E3L, A40R, A46R, B14R, B16R), トランスクリプション関連蛋白(E1L, J3R, H5R, D11L, D12L, A29L, B18R), 増殖関連蛋白(F2L, E5R, H6R, D4R, A22R, A32L)]等を発現させた。これら組換え核蛋白を nitrocellulose がコートされた FAST スライドに吸着させ、抗原とした。抗原に血清を反応させ、2次抗体としてビオチン化 goat anti-human IgA + IgG + IgM (H+L) (Jackson Immunolabs)を反応させた。さらにstreptavidin-PBXL3をハイブリダイゼーション法により結合させ、蛍光強度を ScanArray Express HT (Perkin Elmer)を用いて測定した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得た上で実施された。

C. 研究結果

1. EEV 関連蛋白に対する抗体応答。全ての EEV 関連蛋白(F13L, A33R, A34R, A36R, B5R)に対する抗体は感染 10 日目には検出され、21 日目にはより高い抗体応答が認められた(図 1)。
2. IMV 関連蛋白に対する抗体応答。IMV 関連蛋白に対する抗体応答は、H3L, D8L, A13L, A17L に認められ、L1R と L5R に対する応答は

極めて弱かった(図 2).

3. コア蛋白に対する抗体応答. F17R, I1L, および, A4L に対する応答が強く認められた(図 3). 病原因子関連蛋白の抗体応答では, C23L, C11R, および, E3L に対するものが比較的強く認められた(図 3).
4. ウイルス病原因子関連蛋白に対する抗体応答. 病原因子関連蛋白の抗体応答では, C23L, C11R, および, E3L に対するものが比較的強く認められた(図 4).
5. トランスクリプション関連蛋白に対する抗体応答. 全てのトランスレーション関連蛋白に対して抗体応答が認められるが, 中でも H5R に対して強い抗体応答が認められた(図 5).
6. 増殖関連蛋白に対する抗体応答. 調べた全ての増殖関連蛋白に強い抗体応答が認められた(図 6).

D. 考察

本研究では, サル痘ウイルス感染カニクイザルにおける, サル痘ウイルスが分類されるオルソポックスウイルスに属するワクチニアウイルスの各種蛋白を *in vitro* トランスレーション法で発現させた組換え蛋白を抗原とした抗体応答を詳細に解析した.

3 週間の観察期間において死亡しなかった 2 頭の個体(#4839 と #4826)は, それぞれサル痘ウイルス Liberia 株と Zr-599 株に感染している. この両者における抗体応答プロファイルは, ほぼ同等であった. Liberia 株は西アフリカ型に, Zr-599 株はコンゴ盆地型に分類される. 後者はより病原性が高いと報告されている. しかし, 病原性により強い関連のある EEV 関連膜蛋白に対する抗体応答

においては, 同等の反応が認められた.

本研究では, サル痘ウイルス感染霊長類におけるオルソポックスウイルスの発現する各種抗原に対する抗体応答が明らかにされた. これらの成績は, ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症の診断や治療, 病態解析に有用な知見を提供するものと考えられる.

N. 健康危険情報

なし

O. 研究発表

1. 論文発表

- (ア) Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogawa, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., Morikawa, S.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J. Med. Virol.* 80:1102-1108, 2009
- (イ) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *J. Gen. Virol.* 90:2266-2271, 2009
- (ウ) Nakauchi, M., Fukushi, S., Saijo, M., Mizutani, T., Ure, A.E., Romonowski, V., Kurane, I., Morikawa, S.: Characterization of monoclonal

antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. Clin. Vaccine Immunol. 16:1132-1138, 2009

(エ) Saijo, M.: Emerging and re-emerging infection threats to society. J. Disaster Res. 4:291-297, 2009

(オ) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases. J. Disaster Res. 4:315-321, 2009

(カ) Morimoto, K., Saijo, M.: Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. Journal of Disaster Research 4:346-357, 2009

2.学会発表

- 1) 塩田智之、森川茂、飯塚愛恵、倉根一郎、西條政幸: 293T細胞を用いた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19回日本抗ウイルス療法研究会, 東京(2009.6)
- 2) Bukbuk, D.N., Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., George, A., Shuetsu, F., Mizutani, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting, Philadelphia, PA (2009.05)
- 3) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Iizuka, I., Shiota, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Congo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on enterovirus 71, Philadelphia, PA (2009.07)
- 4) 西條政幸, 網至康, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 新村靖彦, 横手公幸, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂. 痘そうワクチンLC16m8およびLister株免疫時におけるIMVおよびEEV蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果. 第13回日本ワクチン学会学術総会, 札幌(2009.09)
- 5) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中のJCポリオーマウイルスを検出するためのリアルタイムPCR検査系の確立と進行性多巣性白質脳症(PML)の診断支援. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 6) 酒井宏治, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 網至康, 平井理香, 須崎百合子, 水谷哲也, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 藤本嗣人, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 森川茂. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 7) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物における宿主Th1/Th2バランスと重症化の関連. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 8) 塩田智之, 飯塚愛恵, 森川茂, 倉根一郎, 水口雅, 西條政幸. 293T細胞を用いた単純ヘル

- ペスウイルスならびに水痘帯状疱疹ウイルス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57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 9) 森川茂, 福士秀悦, 酒井宏治, 永田典代, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 水谷哲也, 平井理香, 網康至, 緒方もも子, 西條政幸, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎. カニクイザルの致死的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 10) 飯塚愛恵, 塩田智之, 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 水口雅, 森川茂. 痘そうワクチンLC16m8株の温度感受性に関する解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 11) 水谷哲也, 前田健, 渡辺俊平, 久和茂, 吉川泰弘, 明石博臣, 中内美名, 酒井宏治, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. ウイルスの網羅的検出法(RDV法ver 3.1)を用いたコウモリ由来新規 β ヘルペスウイルスの同定第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 12) 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, Austin Ure, Victor Romanowski, 森川茂. 南米出血熱の実験室診断法の開発. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 13) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 定位微量投与系を用いたマウスポリオーマウイルスの脳における持続感染様式の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 14) 岩田奈織子, 永田典代, 辻隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 横田恭子, 水谷哲也, 西條政幸, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの免疫効果と副作用について. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 15) 佐山勇輔, 福士秀悦, 斎藤麻理子, 飯塚愛恵, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 鈴木陽, 神垣太郎, 玉記雷太, 倉根一郎, 押谷仁, 森川茂. フィリピンのレストランエボラウイルス感染症のウイルス遺伝子解析と感染状況の実態調査. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 16) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 塩田智之, 飯塚愛恵, 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, 倉根一郎, 佐多徹太郎, 倉田毅, 森川茂. コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 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

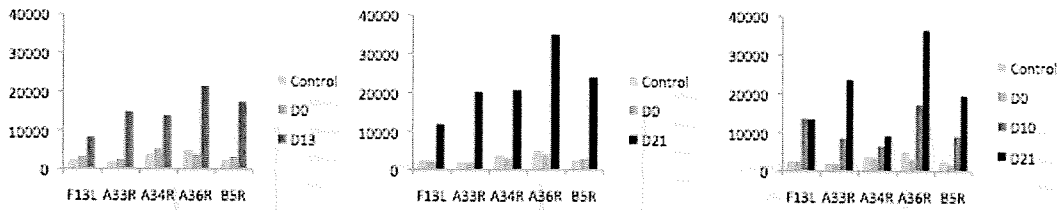


図 1. 各個体の EEV 関連蛋白 (F13L, A33R, A34R, A36R, B5R) に対する抗体応答.

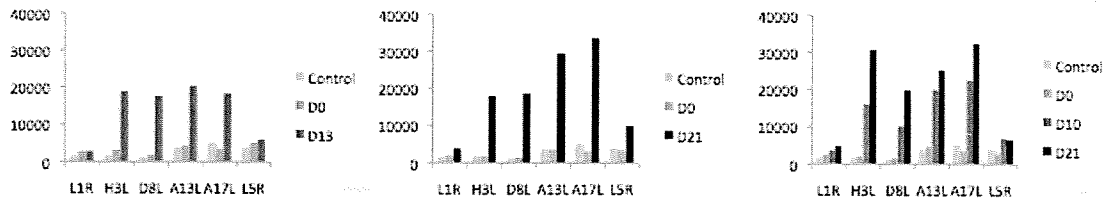


図 2. 各個体の IMV 関連蛋白 (L1R, H3L, D8L, A13L, A17L, L5R) に対する抗体応答.

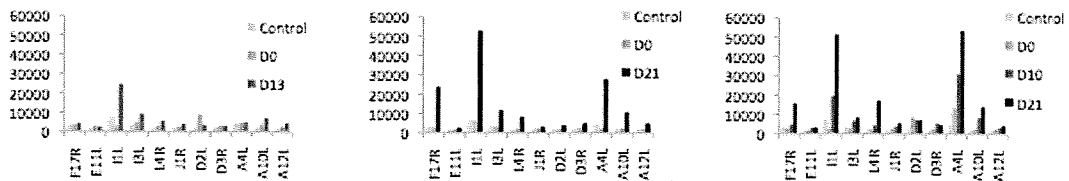


図 3. 各個体のコア蛋白 (F17R, E11L, I1L, I3L, L4R, J1R, D2L, D3R, A4L, A10L, A12L) に対する抗体応答.

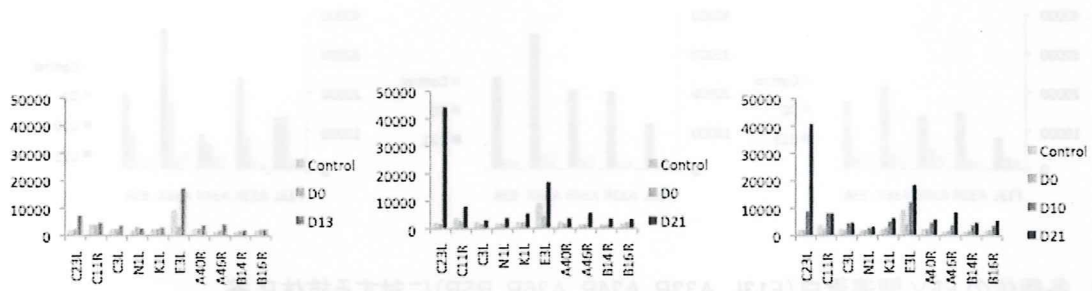


図 4. 各個体のウイルス病原性因子関連蛋白 (C23L, C11R, C3L, N1L, K1L, E3L, A40R, A46R, B14R, B16R) に対する抗体応答.

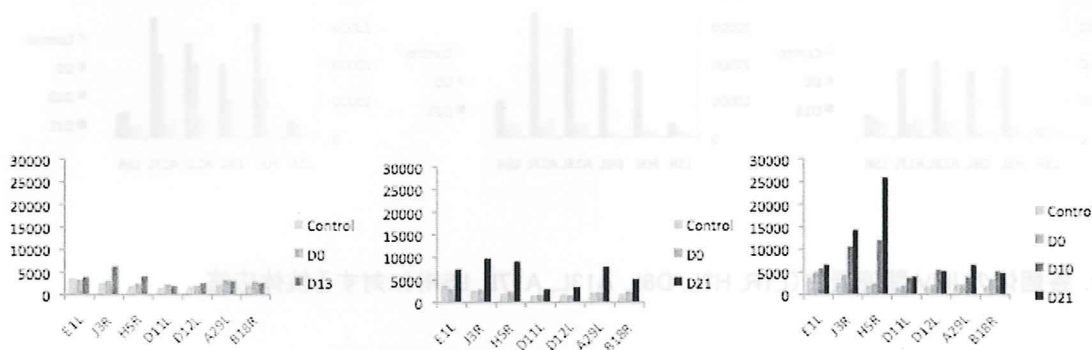


図 5. 各個体のトランスクリプション関連蛋白 (E1L, J3R, H5R, D11L, D12L, A29L, B18R) に対する抗体応答.

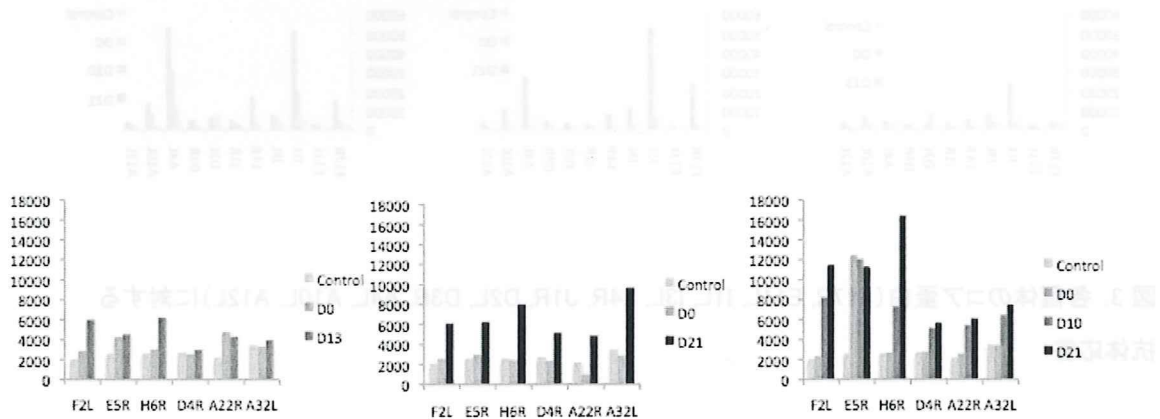


図 6. 各個体の増殖関連蛋白 (F2L, E5R, H6R, D4R, A22R, A32L) に対する抗体応答.

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

Puumala 型ハンタウイルスの実験的感染ハムスターを用いた病理学的検討

研究分担者:永田典代(国立感染症研究所 感染病理部第二室 室長)

研究協力者:岩田奈織子(国立感染症研究所 感染病理部第二室 主任研究官)

長谷川秀樹(国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター第六室 室長)

研究要旨: Puumala 型ハンタウイルスの病原性を明らかにするために、実験的感染した4週齢と8週齢のシリアンハムスターの組織標本を用いて、病理学的検討を行った。7, 14, 28日目の組織標本を用いて病理組織学的解析を行った結果、皮下接種後のウイルス感染増殖の程度は週齢によって違いがみとめられることが病理組織学的に明らかとなった。4週齢のシリアンハムスターにおける肺の上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、副腎実質細胞、小脳プルキンエ細胞におけるウイルス増殖は非常にゆっくりで、限局しており、炎症性反応は軽度であった。一方で、8週齢動物では明らかな組織学的変化は認められなかった。

A. 研究目的

Puumala 型ハンタウイルスはヨーロッパやロシアではハタネズミを媒介動物としており、この地域では、このウイルスが原因となる腎症候性出血熱(HFRS)患者が年間5千人から1万人報告されている。この Puumala 型ハンタウイルスは我が国においても北海道のエゾヤチネズミに感染していることが苺和らによって明らかにされており、ウイルス学的解析、動物実験系とワクチン、抗ウイルス剤の評価系の確立が試みられている。このウイルスは培養細胞系での増殖が非常に遅く、動物モデルの確立も困難である。これまでに苺和らは4週齢のシリアンハムスター(Syrian hamster)がこのウイルスの感受性動物であることを見いだしている。今年度、われわれは Puumala 型ハンタウイルスの病原性を明らかにする目的で、4週齢と8週齢のシリアンハム

スターにおける Puumala 型ウイルスの感染病理について検討を行った。

B. 研究方法

4週齢および8週齢のシリアンハムスターに Puumala virus の標準株である Sotkamo 株を 3,300ffu 皮下接種し、7, 14, あるいは 28日目に臓器を採取した(一群1匹あるいは2匹)。対照群には細胞培養液(MEM)を皮下接種し材料を採取した。これら採取した組織材料は10%ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。このホルマリン固定組織材料とウイルス特異的抗体(いずれも苺和主任研究者より供与)を用いて病理学的および免疫組織学的検索を行い、病理学的変化とウイルス抗原の検出を行った。なお、苺和らによって実施された、この感染動物における Real-time PCR による肺、腎、脾、肝、

心、脳におけるウイルスの定量（viral RNA copies/ng of GAPDH）の結果は以下の通りであった。4週齢でウイルスを接種したハムスター（以下、4週齢群）から14日目で採取した肺ではウイルス RNA copy 量が 10^4 から 10^5 であったのに対し、8週齢で接種して（以下、8週齢群）同じく14日目に採取した肺では 10^3 量であった。ウイルス RNA 量が最も高いのは肺で、その他の臓器では14日目では 10^3 程度であった。

病理学および免疫組織学的検索

10%ホルマリン緩衝液固定のPuumala virus感染ハムスター組織材料（肺、腎、肝、脾、脳、心、直腸、4週齢のみ副腎）は、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、一次抗体として抗ハンタウイルスモノクローナル抗体（KiritoppuおよびE5/G6）を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片をクエン酸緩衝液pH6.0中で121°C10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（精製抗体1μg/ml濃度で使用）を加え4°C一晩インキュベートした。M.O.M kit（PK-200）を使用し染色を行った。

C. 研究結果

感染ハムスターのうち、8週齢群（7日目1例、14日目2例、28日目2例）では明らかな組織学的変化を認めず、ウイルス抗原は陰性であった。一方で4週齢群（7日目1例、14日目2例）では肺の呼吸細気管支上皮～肺胞道の上皮細胞、腎髄質の一部の尿細管上皮細胞、副腎皮質実質細胞にウイ

ルス抗原陽性細胞が限局して認められた（図1）。抗原陽性細胞は7日目より14日目の方が多数存在し、肺と副腎でウイルス抗原と一致して好中球、マクロファージを中心とした炎症性細胞の軽度な浸潤がみられた。腎において明らかな組織学的変化は観察されなかった。

さらに、4週齢群の14日目解剖の2個体のうち1個体において、小脳灰白質の分子層にグリア細胞のわずかな増殖がみられた（図2）。この部位に一致してプルキンエ細胞とその突起がウイルス抗原陽性であった。肝、脾、心、直腸に明らかな病変は認められなかった。

D. 考察

4週齢群と8週齢群の Real time PCR によるウイルス RNA コピー数とウイルス抗原の局在の結果はほぼ一致し、 10^3 量（ウイルス RNA コピー数/ng of GAPDH）以上の臓器でウイルス抗原が検出された。この結果によって、各臓器における免疫組織化学の検出限界が想定される。ウイルス抗原は肺で最も多く検出され、抗原量は14日目の方が多い傾向にあった。肺、副腎、腎および小脳組織のウイルス抗原陽性細胞の局在とこれに対する炎症性反応所見から、ウイルスの増殖は非常にゆっくりであり組織傷害は殆ど無く、動物はほぼ無症状で耐過する可能性が示唆された。しかしながら、肺、腎の上皮においてウイルス RNA とウイルス抗原が検出されたことから、経気道、尿中への長期のウイルス排泄が示唆され、バイオセーフティー管理上、注意が必要である。また、副腎皮質、小脳にウイルス抗原が検出されたことからハムスターにおけるウイルスの神経向性が示唆された。

E. 結論

4週齢および8週齢の Syrian hamster における Puumala 型ウイルスの感染増殖の程度に違いが認められることが病理組織学的に明らかとなった。4週齢動物の肺、腎、副腎、小脳におけるウイルス増殖は非常にゆっくりで、限局し、炎症性反応は軽度であった。一方で8週齢動物では明らかな組織学的変化は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogata, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., and Morikawa, S.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J. Med. Virol.* 81:1102-1108. 2009.

2) Hayasaka, D., Nagata, N., Fujii, Y., Hasegawa, H., Sata, T., Suzuki, R., Gould, EA., Takashima, I., and Koike, S.: Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology.* 390:139-150. 2009.

3) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human

primates. *J. Gen. Virol.* 90:2266-2271. 2009.

4) Hayasaka, D., Nagata, N., Hasegawa, H., Sata, T., Takashima, I., and Koike, S.: Early Mortality Following Intracerebral Infection with Tick-Borne Encephalitis Virus Oshima Strain in a Mouse Model. *J. Vet. Med. Sci.* 2009.

2. 学会発表

早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性：第57回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009, 10)

西條政幸、網康至、須崎百合子、塩田智之、飯塚愛恵、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、倉根一郎、佐多徹太郎、倉田毅、森川茂：コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性：第57回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009, 10)

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

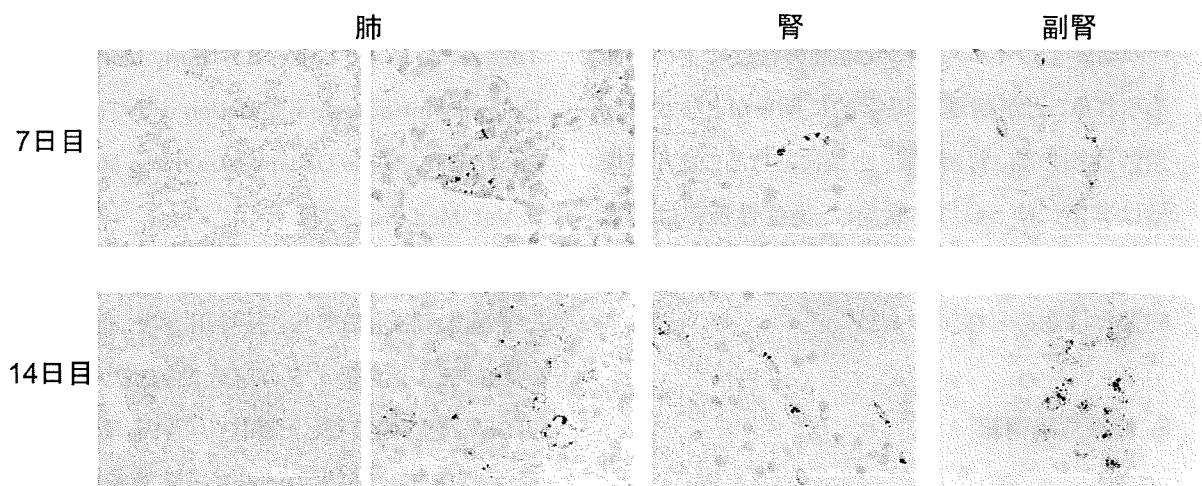


図1 Puumala virus 皮下接種後の7日あるいは14日目の肺、腎および副腎組織におけるウイルス抗原の局在（シリアンハムスター、4週齢、免疫組織化学染色）。肺の肺胞道の上皮と腎髄質の尿細管上皮あるいは副腎皮質の一部に抗原が検出された。抗原陽性細胞はいずれの臓器においても7日目よりも14日目の方が多数認められた。

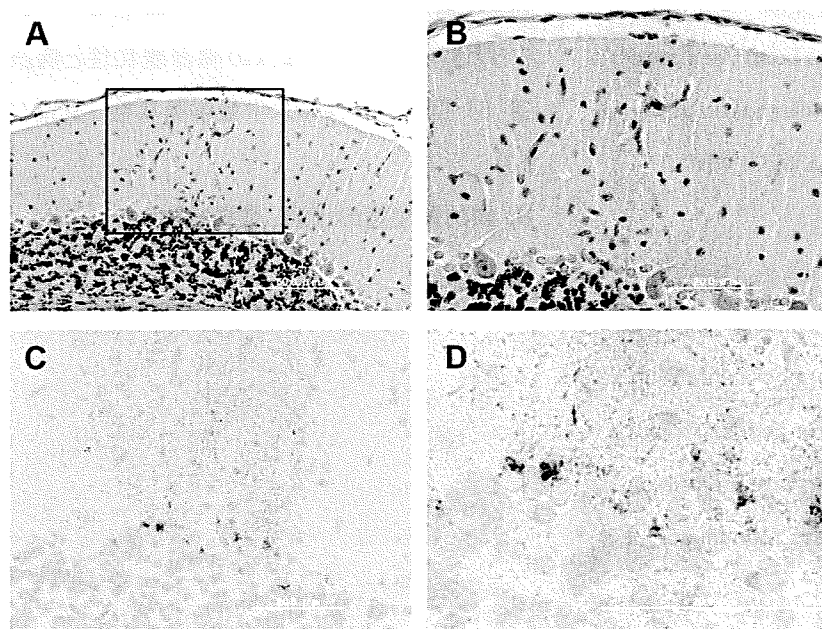


図2 Puumala virus 皮下接種後14日目の小脳皮質におけるウイルス抗原陽性部位（シリアンハムスター#2、4週齢、免疫組織化学染色）。小脳灰白質の分子層の一部にわずかにグリア細胞の増加が認められ(A,B)、プルキンエ細胞の細胞質とその突起がウイルス抗原陽性であった(C,D)。

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

フラビウイルス脳炎の重症化に関わる病原性発現機序の解析

研究分担者 早坂 大輔 長崎大学熱帯医学研究所 助教

研究要旨:フラビウイルス脳炎の重症化に関わる病原性発現機序を調べるために、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV) Oshima 株および日本脳炎ウイルス(JEV) JaOArS982 株を感染させたマウスモデルを用いた解析を行った。1) TBEV Oshima 株中に含まれる small および large plaque type クローンのそれぞれをマウスに皮下接種させたところ、small plaque type はマウスに病原性を示さなかった。一方、large plaque type ではほとんどのマウスで体重減少および臨床症状が確認されたが、そのうち一部のマウスだけが死に至り、残りは回復した。このことから、TBEV Oshima 株の親株には病原性の異なるウイルスが混在していることが示唆された。2) JEV S982 株をマウスに皮下接種させたところ、ほとんどのマウスが発症したが、一部のマウスだけが重症化後死に至り、残りは軽症で回復した。重症個体の大脳皮質内のウイルス量は 10^6 pfu/g 組織以上であったが、軽症個体のなかにも同程度のウイルス量を示す個体がみられた。重症個体は軽症個体にくらべ、大脳皮質の GFAP、TNF alpha、IL-10 の増加、IL-2、IL-4 の低下がみられた。一方、脾臓においては IL-10 の増加、TNF alpha、IFN gamma、IL-4、CD3、CD8 の低下がみられた。また、血清中のコルチコステロン、IL-10 の上昇がみられた。これらのことから、日本脳炎ウイルス感染における重症化の病態発現機序には神経組織へのウイルス感染に加え、全身性の免疫およびストレス応答のバランスが重要であることが示唆された。

A. 研究目的

脳炎フラビウイルスにはダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)や日本脳炎ウイルス(JEV)が知られ、これらのウイルスは蚊やマダニの吸血によりヒトに感染し、急性の熱性疾患、髄膜炎・脳炎を引き起こす。ヒトの TBEV または JEV 感染の多くは不顕性もしくは熱性疾患で済むと考えられているが、髄膜炎・脳炎を起こすと重症化し死に到る場合もあるため、公衆衛生上非常に問題となる感染症である。しかしながら、重症化の機序については不

明な点が多い。そこで、本研究では TBEV および JEV 感染マウスモデルを用いて重症化に関わる病態発現機序の解明を目指す。

B. 研究方法

1) TBEV Oshima 株のストック液から BHK 細胞を用いて限界希釈法によりクローニングしたそれぞれのクローンを 10^3 PFU を B6 マウスに皮下接種させ臨床症状、致死性を観察した。

2) 10^4 pfu の JaOArS982 株を B6 マウスに皮下接

種後、13 日目に重症個体と軽症個体を体重変化率により区別し、各個体の中枢神経組織のウイルス量、大脳皮質および脾臓における遺伝子発現量を定量 RT-PCR により測定した。また、血清中のサイトカインを ELISA により測定した。

TBEV を用いた実験は BSL3、JEV を用いた実験は BSL2 実験室で行い、動物実験は長崎大学における動物実験指針に沿って行った。

C. 研究結果

1) TBEV Oshima 株から小さいプラークサイズを示すクローン (small plaque type) および大きいプラークサイズを示すクローン (large plaque type) を計 8 クローン得た。small plaque type クローンはいずれもすべてのマウスで明確な臨床症状、体重減少を起こさなかった。一方、large plaque type クローン接種ではいずれのクローンも 80% 以上のマウスで体重減少がみられた。最終的な致死率は 0-40% となり、発症しても回復する個体が見られた。

2) JaOArS982 株を感染させたマウスは、13 日目の体重比が接種時とくらべて <0.7 の個体は最終的に死に至り (重症個体)、 >0.9 の個体は無症状もしくは回復後生存した (軽症個体)。いずれの個体も大脳皮質でのウイルス量が多く、重症個体ではすべて 10^6 pfu/g 組織以上であった。軽症個体のなかには 10^6 pfu/g 組織以上の個体と 10^6 pfu/g 組織以下の個体が見られた。重症個体は軽症個体に比べ、大脳皮質の GFAP、TNF alpha、IL-10 の増加、IL-2、IL-4 の低下がみられた。一方、脾臓においては IL-10 の増加、TNF alpha、IFN gamma、IL-4、CD3、CD8 の低下がみられた。また、血清中のコルチコステロン、IL-10 の上昇は

みられたが、TNF alpha には有意な差がなかった。

D. 考察

1) TBEV Oshima 株の small plaque type クローンはマウスに病原性を示さず、large plaque type クローンは親株と同程度の病原性を示したことから、親株のストックには異なる病原性を示すウイルスが混在していることが示唆された。しかしながら、large plaque type クローン接種でも発症後回復する個体が見られたことから、重症化および致死性には宿主の要因も関わることが考えられた。

2) JEV JaOArS98 感染後の重症個体と軽症個体で中枢神経および全身性の免疫およびストレス応答に違いがみられたことから、重症化の病態発現機序にはウイルス感染、免疫およびストレス応答のバランスが重要であることが示唆された。また、中枢神経系でのウイルス感染では、重症個体と軽症個体とも常に大脳皮質でのウイルス量が他の部位より高かったため、TBEV 感染との相違も考えられた。

E. 結論

フラビウイルス脳炎の発症には病原性のあるウイルスクローン感染が必要であるが、発症後の重症化および致死性には中枢神経でのウイルス感染に加え、全身性の免疫およびストレス応答のバランスが重要であることが示唆された。これらの研究成果より、フラビウイルス脳炎の病態発現機序のさらなる詳細な解明、より有効なワクチン、治療法の確立につながることを期待される。

P. 健康危険情報

なし

Q. 研究発表

1.論文発表

- V. Hayasaka, D., Nagata, N., Fujii, Y., Hasegawa, H., Sata, T., Suzuki, R., Gould, E.A., Takashima, I., and Koike, S. Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology* 390 : 139-150, 2009
- VI. Hayasaka, D., Nagata, N., Hasegawa, H., Sata, T., Takashima, I., and Koike, S. Early Mortality following Intracerebral Infection with the Oshima Strain of Tick-Borne Encephalitis Virus in a Mouse Model. *J. Vet. Med. Sci.* in press.

2.学会発表

- 6) 早坂大輔:ダニ媒介性脳炎ウイルスをマウスに異なる経路で接種した際の発症・致死性の比較:第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、千歳(2009.6)
- 7) 早坂大輔:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)をマウスに異なる経路で接種した際の発症・致死性の比較:第46回日本ウイルス学会九州支部総会、佐賀(2009.9)
- 8) 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太

郎、高島郁夫、小池智:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性:第148回日本獣医学会学術集会、鳥取(2009.9)

- 9) 早坂大輔、ディン テュアン デュク、木下一美、田中香苗、藤井克樹、鈴木隆二、森田公一:日本脳炎ウイルス感染症の重症化のメカニズム:第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京(2009,10)
- 10) 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)
- 11) 北浦一孝、藤井克樹、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎:ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸潤T細胞の解析:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)

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

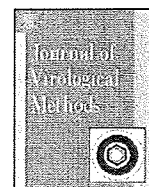
3. その他

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., Ikawa, A., Chiba, Y., Omori, Y., Maeda, J., Murata, R., Kariwa, H., Takashima, I	Establishment of a neutralization test involving reporter gene-expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus.	J. Virol. Methods.	161(1)	173-176	2009
Hayasaka, D., Nagata, N., Fujii, Y., Hasegawa, H., Sata, T., Suzuki, R., Gould, E.A., Takashima, I., Koike, S.	Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses.	Virology	390(1)	139-150	2009
Truong T-T, Yoshimatsu K, Araki K, Lee B-H, Nakamura I, Endo R, Shimizu K, Yasuda PS, Koma T, Taruishi M, Okumura M, Truong U-N, and Arikawa J.	Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in Northern Vietnam.	J. Vet. Med. Sci.	71(10)	1357-1363	2009
Kariwa H, Tkachenko EA, Morozov VG, Seto T, Tanikawa Y, Kolominov SI, Belov SN, Nakamura I, Hashimoto N, Balakiev AE, Dzagurnova TK, Daud NH, Miyashita D, Medvedkina OA, Nakauchi M, Ishizuka M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, and Takashima I.	Epidemiological study of hantavirus infection in the Samara Region of European Russia.	J. Vet. Med. Sci.	71(12)	1569-1578	2009
Chandy S, Yoshimatsu K, Boorugu HK, Chrispal A, Thomas K, Peedicyil A, Abraham P, Arikawa J, and Sridharan G	Acute febrile illness caused by hantavirus: serological and molecular evidence from India.	Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.	103(4)	407-412	2009
Chandy S, Okumura M, Yoshimatsu K, Ulrich RG, John GT, Abraham P, Arikawa J, and Sridharan G.	Hantavirus species in India: A retrospective study.	Indian. J. Med. Res.	27(4)	348-350	2009
I. Russell-Lodrigue, KE., Andoh, M., Poels, MW., Shive, HR., Weeks, BR., Zhang, GQ., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., McMurray, DN., Samuel, JE.:	Coxiella burnetii isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever.	Infect. Immun.	77(12)	5640-5650	2009
Inoue, K., Kabeya, H., Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., and Maruyama S.	Evolutional and geographical relationships of Bartonella grahamii isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis.	Microb. Ecol.	57(3)	534-541	2009
Bouchouicha, R., Durand, B., Monteil, M., Chomel, B. B., Berrich, M., Arvand, M., Birtles, R., J., Breitschwerdt, E. B., Koehler, J. E., Maggi, R., Maruyama, S., Kasten, R., Petit, E., Boulouis, H-J., and Haddad, N.	Molecular epidemiology of feline and human Bartonella henselae isolates.	Emer. Infect. Dis.	15(5)	813-816	2009
Lee, K., Iwata, T., Shimizu, M., Taniguchi, T., Nakada, A., Hirota, Y., and Hayashidani, H.	A novel multiplex PCR assay for Salmonella subspecies identification.	J. Appl. Microbiol.	107(3)	805-811	2009
Nakamura, S., Hayashidani, H., Iwata, T., Takada, T., Ure, Y.	Spontaneous yersiniosis due to Yersinia pseudotuberculosis serotype 7 in a squirrel monkey.	J. Vet. Med. Sci.	71(12)	1657-1659	2009
Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogawa, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., Morikawa, S.	Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections.	J. Med. Virol.	81(6)	1102-1108	2009
Nakauchi, M., Fukushi, S., Saijo, M., Mizutani, T., Ure, A.E., Romonowski, V., Kurane, I., Morikawa S.:	Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses.	Clin. Vaccine Immunol.	16(8)	1132-1138	2009
Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.	Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates.	J. Gen. Virol.	90(9)	2266-2271	2009

IV. 研究成果の刊行物・印刷



Short communication

Establishment of a neutralization test involving reporter gene-expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus

Kentaro Yoshii*, Ayae Ikawa, Yumiko Chiba, Yuki Omori, Junko Maeda, Ryo Murata, Hiroaki Kariwa, Ikuo Takashima

Laboratory of Public Health, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, kita-18 nishi-9, kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0818, Japan

A B S T R A C T

Article history:

Received 18 March 2009
Received in revised form 18 May 2009
Accepted 20 May 2009
Available online 27 May 2009

Keywords:

Tick-borne encephalitis
Virus-like particles
Neutralization test

Previously, a system for packaging tick-borne encephalitis virus (TBEV) subgenomic replicon RNAs into single-round infectious virus-like particles (VLPs) was developed. In the present study, VLPs were applied to measuring the levels of neutralizing antibodies against TBEV as an alternative to performing neutralization tests with live virus. As markers of VLP infection, the genes for GFP and luciferase were inserted into the TBEV replicon, which was then packaged into VLPs. The reporter genes were expressed in cells that were infected with the VLPs, and this infection was inhibited by neutralizing antibodies to TBEV. Serum samples from wild rodents were used to evaluate the neutralization test using VLPs. All the sera that were positive in the conventional neutralization test were also found to be positive in the neutralization test using VLPs, and there were highly significant correlations between the neutralization titres obtained using the native virus and those using VLPs. These results indicate that VLPs that express reporter genes represent a useful and safe alternative to conventional neutralization testing using live virus.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Tick-borne encephalitis virus (TBEV), which belongs to the family *Flaviviridae* genus *Flavivirus*, causes fatal encephalitis in humans with serious sequelae (Dumpis et al., 1999). TBE occurs widely across Europe, Russia, and Far-Eastern Asia, including Japan (Blaskovic et al., 1967; Korenberg and Kovalevskii, 1999; Lindgren and Gustafson, 2001; Ormaasen et al., 2001; Roggendorf et al., 1981), and more than 10,000 cases of the disease are reported annually. TBEV can be divided into three subtypes: (1) the Far-Eastern subtype, known as Russian spring summer encephalitis (RSSE) virus; (2) the European subtype, known as Central European encephalitis (CEE) virus; and (3) the Siberian subtype (Bakhvalova et al., 2000; Ecker et al., 1999). TBEV is transmitted by tick bites and is maintained in the zoonotic transmission cycle between ticks and wild vertebrate hosts, with humans acting as accidental hosts. The major tick vector of the European subtype is *Ixodes ricinus*, whereas *I. persulcatus* is the major tick vector for the other two viral subtypes (Ecker et al., 1999; Gaunt et al., 2001; Hayasaka et al., 2001; Lundkvist et al., 2001).

Effective diagnosis of TBE infection relies on the detection of specific antibodies. However, the presence of cross-reactive antigenic structures among flaviviruses makes it difficult to differentiate between TBEV and other flavivirus infections/vaccinations using IgG-ELISA and the HI test (Holzmann et al., 1996). For cases that

involve contact with other flaviviruses or vaccinations, a neutralizing test, which is the most specific serological test, is required to confirm the diagnosis of TBE infection. However, since TBEV is classified as a biosafety level 3 or 4 virus, a high-level biocontainment facility is required to handle the live virus required for neutralization testing.

Flavivirus virions are 40–50 nm in diameter, spherical in shape, and contain a nucleocapsid and an envelope. The flavivirus genome consists of a positive-polarity, single-stranded RNA of approximately 11 kb, which encodes three structural proteins, the core (C), premembrane (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 that is co-translated and cleaved post-translationally (Chambers et al., 1990). The 5'- and 3'-untranslated regions (UTRs) have predicted secondary stem-loop structures that are implicated as *cis*-acting elements in viral replication, translation, and genome packaging (Gritsun et al., 1997; Proutski et al., 1997; Rauscher et al., 1997).

Subgenomic replicons have been constructed by deleting the genes for the viral structural proteins from several flaviviruses, including TBEV (Gehrke et al., 2003; Hayasaka et al., 2004; Khromykh and Westaway, 1997; Molenkamp et al., 2003; Pang et al., 2001; Scholle et al., 2004; Shi et al., 2002). Virus-like particles (VLPs) of flavivirus are produced by the complementation of replicon RNA with the viral structural genes expressed *in trans* (Gehrke et al., 2003; Khromykh et al., 1998; Scholle et al., 2004; Yoshii et al., 2008). The VLPs of flaviviruses are similar to the native virus

* Corresponding author. Tel.: +81 11 706 5213; fax: +81 11 706 5213.
E-mail address: kyoshii@vetmed.hokudai.ac.jp (K. Yoshii).

with respect to their antigenic and functional characteristics. However, progeny viruses cannot be produced from VLP-infected cells due to the lack of viral structural genes. This limitation of only a single round of infectivity enables the safe handling of VLPs under BSL-2 conditions. Therefore, VLPs can be used for serological diagnosis in place of the conventional neutralization test, which uses infectious virus. In previous studies, flavivirus VLPs were used to detect virus entry, as well as the inhibition thereof by neutralizing antibody (Ansarah-Sobrinho et al., 2008; Pierson et al., 2006). In the present study, we describe a novel approach for measuring neutralizing antibodies against TBEV using VLPs that comprise encapsidated TBEV replicons that are capable of expressing reporter genes as markers of VLP infection.

Reporter genes inserted into replicons can be used as fast and easy alternatives for the assessment of genome replication. To construct TBE replicons that express reporter genes, the gene for GFP and the gene for firefly (*Photinus pyralis*) luciferase (*luc2*) were cloned separately into the deleted structural genes of the Oshima-REP plasmid, which is a TBEV replicon that was constructed from the Far-Eastern subtype TBEV strain Oshima 5–10 (Hayasaka et al., 2004), and the resulting constructs were designated as Oshima-REP-GFP2A and Oshima-REP-luc2A, respectively (Fig. 1A). The GFP and *luc2* genes were amplified from pRES2-EGFP (Clontech) and pGL4.1 (Promega), respectively. These constructs contain the sequence for the first 38 codons of C, fused in-frame to the initiation codon of GFP or *luc2*. To ensure appropriate processing of the reporter gene from the signal sequence of NS1, the foot and mouse disease virus (FMDV) 2A coding sequence (2A) was inserted between the C-terminus of the reporter gene and the NS1 signal sequence. The 2A protein is a 17-aa autoproteolytic peptide that has been shown to mediate the efficient cleavage of C-terminally fused heterologous protein sequences (Percy et al., 1994).

Oshima-REP-GFP2A and Oshima-REP-luc2A were prepared for run-off transcription by digestion with *SpeI*, and the resulting template DNAs were transcribed *in vitro* using the mMACHINE SP6 Kit (Ambion), as described previously (Hayasaka et al., 2004). The synthesised RNA was transfected into BHK cells using the TransIT-mRNA transfection kit (Mirus Bio).

GFP was detected in the BHK cells by fluorescence microscopy as early as 24 h after transfection with the Oshima-REP-GFP2A replicon RNA (Fig. 1B). The GFP expression persisted at 96 h post-transfection. To test the Oshima-REP-luc2A replicon, BHK cells were transfected with the *in vitro*-transcribed RNA and the kinetics of replicon RNA replication and luciferase activity were analysed (Fig. 1C). Luciferase activity was detected using the Luciferase Assay System (Promega), and the replicon RNAs were quantified by Real-Time RT-PCR using primers and the TaqMan probe, as described previously (Schwaiger and Cassinotti, 2003). The levels of luciferase activity in the transfected cells increased significantly as the levels of replicon RNA increased (Fig. 1C).

The pcTBECME plasmid, which contains the TBEV virus C-prM-E genes (Yoshii et al., 2005), was used for the expression of TBEV structural proteins to be used for packaging the replicon RNA. To prepare the VLPs, 293T cells were first transfected with Oshima-REP-GFP2A or Oshima-REP-luc2A, followed 8 h later by a second transfection with the pcTBECME plasmid, as described previously (Yoshii et al., 2005). Following the second transfection, the culture supernatant that contained the VLPs was harvested and used to infect naïve cells. At 48 h post-infection, GFP fluorescence was observed for the cells that were infected with the VLPs that contained Oshima-REP-GFP2A (GFP-VLPs) (Fig. 2A, upper panel: no antibody). As shown in Fig. 2B, sequential transfection with the Oshima-REP-luc2A replicon and the pcTBECME plasmid resulted in the production of VLPs, and luciferase expression was confirmed in the cells that were infected with VLPs that contained the Oshima-REP-luc2A replicon (luc-VLPs).

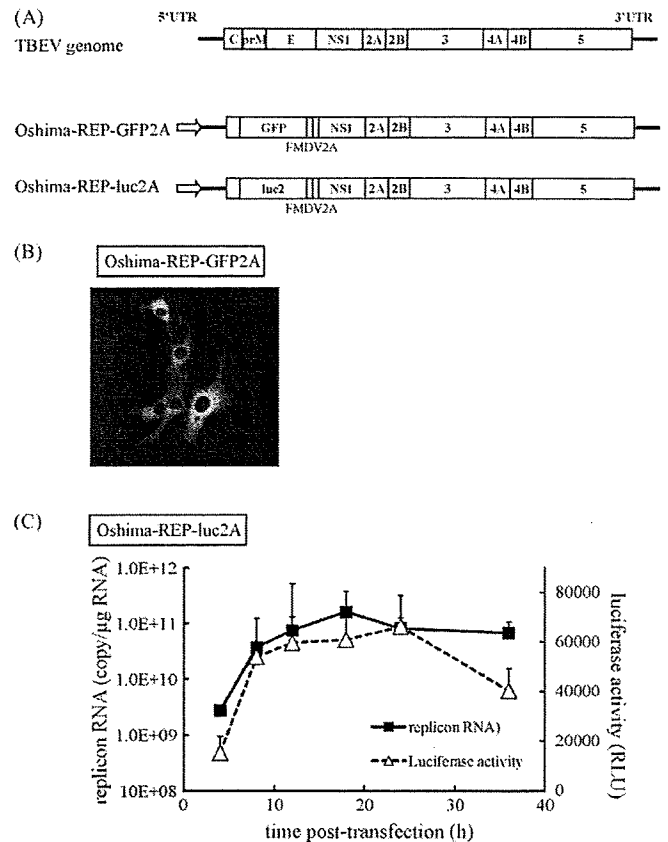


Fig. 1. (A) Schematic representation of the TBEV genome and replicon constructs. TBE replicon regions were inserted under the control of the SP6 promoter. The genes for GFP and luciferase were inserted between the C and E protein-encoding regions of the TBEV genome. The foot and mouse disease virus (FMDV) 2A coding sequence (2A) was inserted between the C-terminus of the GFP or luciferase gene and the NS1 signal sequence. (B and C) Expression of reporter genes in TBEV replicons. BHK cells were transfected with Oshima-REP-GFP2A or Oshima-REP-luc2A and monitored for reporter gene expression. GFP fluorescence was observed 24 h post-transfection in the cells that were transfected with Oshima-REP-GFP2A (B). Luciferase activity and replicon RNA replication were monitored from 4 to 36 h post-transfection with Oshima-REP-luc2A. The replicon RNAs were quantified by Real-Time PCR. Luciferase activity is expressed in Raw Luciferase Units (RLU).

In previous studies, the envelope glycoproteins of the VLPs exhibited the same antigenicities as those of the authentic virion (Yoshii et al., 2005, 2008). To apply the VLPs that express reporter genes to neutralization testing, we examined whether infection with VLPs was neutralized by virus-specific neutralizing antibodies. Prior to infection, the GFP-VLPs or the luc-VLPs were incubated with the anti-TBE E protein monoclonal antibody 1H4, which has neutralizing activity against TBEV (Komoro et al., 2000). As shown in Fig. 2A, the number of GFP-positive cells was reduced by incubation of the GFP-VLPs with 1H4, whereas no reduction was observed after incubation of the GFP-VLPs with control normal mouse serum. Similar results were obtained for luc-VLPs incubated with 1H4 (Fig. 2C). An antibody-dependent reduction in luciferase activity was also observed in the VLP-infected cells:

To evaluate whether the VLPs that express reporter genes can be used in neutralization testing as a substitute for native virions, serum samples with neutralizing antibodies derived from 28 wild rodents, which were collected in a TBE-endemic area of Hokkaido, Japan, were tested. The results for the neutralization tests using VLPs that express reporter genes were compared with those for neutralization tests using the native virus. Prior to the infection of BHK cells, the VLPs were incubated with serum samples that were

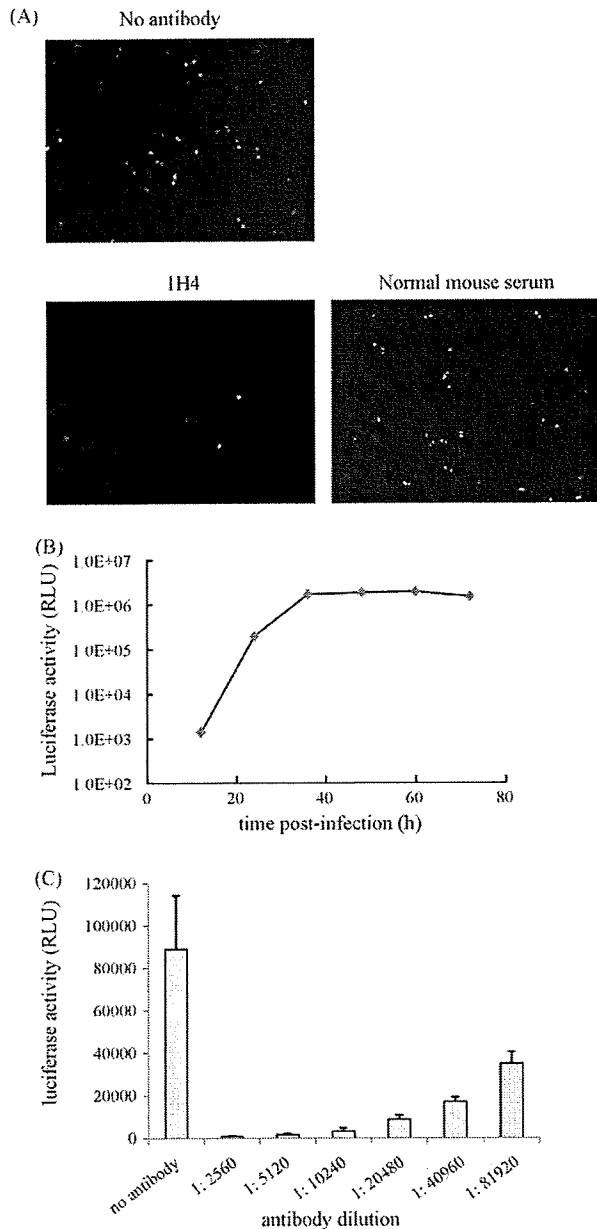


Fig. 2. Infection with VLPs that express reporter genes. (A) BHK cells were infected with the GFP-VLPs, and GFP fluorescence was confirmed at 48 h post-infection (upper panel). To investigate the neutralization of VLP infection, GFP-VLPs were incubated with anti-TBE E protein monoclonal antibody 1H4 or normal mouse serum (lower panel) prior to infection. (B) BHK cells were infected with luc-VLPs, and luciferase activity was detected 12–72 h post-infection. Luciferase activity is expressed in Raw Luciferase Units (RLU). (C) Neutralization of VLP infection. BHK cells were infected with VLPs after incubation with serial dilutions of monoclonal antibody 1H4. The level of luciferase activity was detected 48 h post-infection and is expressed in Raw Light Units (RLU).

diluted serially. The neutralizing antibody titre was determined as the reciprocal of the highest serum dilution that reduced the number of viral foci by 50% or more when using the native virus, that reduced the number of GFP-positive cells by 50% or more when using the GFP-VLPs or that reduced the level of luciferase activity by 80% or more when using the luc-VLPs. The correlations between the neutralizing antibody titres obtained using native TBEV and the GFP-VLPs or luc-VLPs are shown in Fig. 3. There was a highly significant correlation between the neutralizing antibody titre obtained using the native virus and those titres obtained using GFP-VLPs

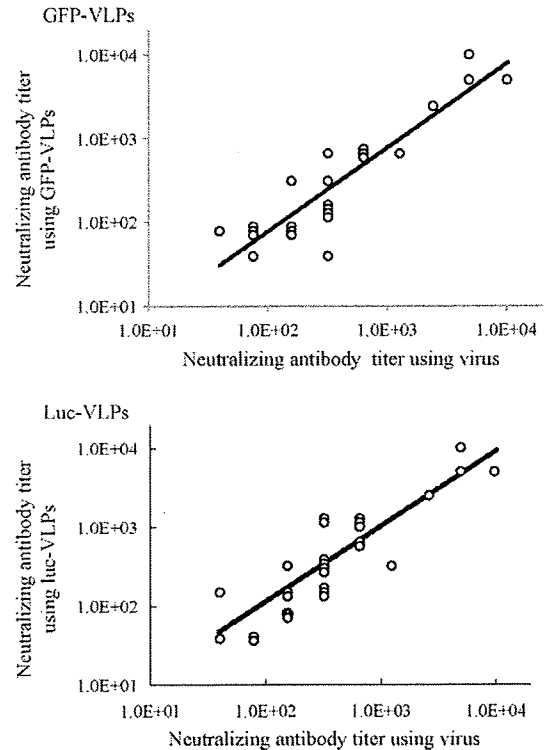


Fig. 3. Correlation between the neutralizing antibody titre obtained using native virus and those obtained using GFP-VLPs (upper panel) and luc-VLPs (lower panel). Twenty-eight serum samples collected from wild rodents in a TBEV-endemic area were used.

and luc-VLPs [$r = 0.83277$ ($P < 0.0001$) and $r = 0.78834$ ($P < 0.00001$), respectively]. Fifteen serum samples that were found to be negative by the neutralization test with the VLPs were also found to be negative by the conventional neutralization test with the native virus.

The application of reporter gene-expressing VLPs to neutralization tests offers several advantages over neutralization tests using live virus. The standard method for neutralization testing of TBEV is the plaque or focus reduction neutralization test (PRNT or FRNT). The PRNT/FRNT is the most specific serological test, although this approach has several limitations. The formation of plaques or foci depends on the cell type and culture conditions, and the number of plaques or foci must be estimated manually by investigators. Thus, the results may be somewhat subjective when the plaque sizes and/or morphologies are variable. In addition, the PRNT/FRNT uses live viruses, which must be handled by skilled investigators in a high-level biocontainment facility. The neutralization test using VLPs can complement the features of the PRNT/FRNT. The reporter genes can be useful markers for quantifying cell infection by VLPs, and the neutralization test using VLPs can be performed both rapidly (in 2 days) and on a large scale using a 96-well format. Furthermore, the single-round infectivity feature of VLPs enables safe handling under BSL-2 conditions. Neutralization testing using VLPs can be also applied to serological diagnoses of other flaviviruses though the construction of pseudo-typed VLPs. In a previous study, pseudo-typed VLPs with envelope proteins derived from Japanese encephalitis virus were constructed (Yoshii et al., 2008). The antigenic characteristics of the pseudo-typed VLPs are similar to those of the native virus. By replacing the structural proteins with those from other flaviviruses, neutralization testing using VLPs can be adapted to the detection of antibodies with specificities for a variety of flaviviruses.