

図5. 蚊の幼虫からRDB法を用いて得られた細菌の配列

- Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0002A120.
- Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C113.
- Uncultured bacterium clone E78-204 16S ribosomal RNA gene
- Uncultured bacterium clone ORSPEP_c03 16S ribosomal RNA gene
- Uncultured Frankiaceae bacterium clone Amb_16S_866 16S ribosomal RNA
- Uncultured bacterium clone E71-205 16S ribosomal RNA gene
- Uncultured bacterium clone sE12-101 16S ribosomal RNA gene
- Uncultured *Neisseria* sp. clone IS024B83 16S ribosomal RNA gene

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

分担研究課題：新種、新興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス同定法の開発
ー変異に対応可能なウイルス種特異的プライマー予測アルゴリズムの改良ー

研究分担者：遠藤大二（酪農学園大学獣医学類教授）

研究要旨：前年度までのプライマー設計アルゴリズムを基礎として、縮重塩基数を4個以下に限定したプライマー設計方法を確立した。3種のウイルス感染細胞から作成されたcDNAを鋳型としたPCRにより、33組のプライマーセットにより、いずれかのウイルス試料で単一のバンドが検出された。これらの結果から、改善されたプライマー設計アルゴリズムについて実用性が示唆された。

研究協力者：水谷哲也（東京農工大学）、
前田健（山口大学）、大谷研文（山口県中
部家畜保健衛生所）、桐澤力雄（酪農学園
大学）

A 研究目的

近年、新種の出血熱ウイルスのうちブン
ディブギョ、エボラウイルス、チャパレウ
ウイルスは、感染症法の改正に伴い特定1種
病原体に指定されることになった。また、
重篤な新興ウイルス感染症でも新種ウイル
ス（新種フレボ、ルジヨ、ニパ、ハンタ、
牛痘、LCMウイルス）が同定され、動物へ
の感染の拡大が報告されている。これらの
診断体制は、既知のウイルス種に関しては
ほぼ確立しているが、新種ウイルスの発見

に伴い、診断法の改良や新規診断法の開発
が必要となっている。

新種ウイルスの核酸を検出する方法は、ウ
イルス核酸の比率を高めた後に非特異的に
核酸断片を増幅する方法と、ウイルス核酸
を含む試料を増幅対象の広いPCRプライマ
ーを用いて増幅する方法に分類される。前
者はRDV法として水谷が担当し、分担者は
後者の増幅対象の広いプライマー設計を担
当する。増幅対象の広いプライマーは、類
縁性の高いウイルスについて配列を整列し、
一致した塩基をプライマーとしてそのまま
採用し、異なる塩基については、各ウイル
スの持つ配列中を共通して示す縮重塩基を
縮重配列として用いる(図1)。縮重塩基は、
プライマーの発注において通常塩基と同額

ではほぼ合成されるため、コストの点で問題は無い。多数の縮重塩基を利用することにより、理論的には多数のウイルス種を同時に検出するプライマーが設計可能である。既知のウイルスからプライマーを設計する場合、既知のウイルスからの変異で発生した新種のウイルスの検出効率を高めるために、可能な限り多数の縮重塩基が設計される。縮重塩基は、一方ではPCRによる検出感度を低下させるため、適切な数の縮重塩基を含むプライマー(縮重プライマー)の設計方法が課題となっている。これまでに、10以上の縮重プライマー設計プログラムが設計されてきたが、縮重塩基の利用数を適切に調整するためのアルゴリズムが競われてきた。

本研究でも、2010年から縮重塩基を調整しつつ多数のウイルスを検出対象とするプライマーの設計を進めてきた。2010年度においては、アレナウイルス科全体をカバーする3組のプライマーセットで増幅可能な縮重プライマーが設計された。これらの縮重プライマーは、モデル分子を効率良く増幅したが、感染細胞由来のcDNAについてはPCR増幅効率は低かった。近年、縮重塩基の利用数と検出感度の関係が多数の縮重プライマーの利用結果から蓄積され、プライマーあたりの縮重塩基の利用数が4以下に制限する必要性が明らかになった。今年度は、この文献的知見を利用し、プライマーあたりの縮重塩基数を4に制限しつつ感染細胞cDNAを効率良く増幅することが可能な最低の縮重プライマーを設計できる様、従来

のアルゴリズムを改善した。

B 研究方法

1. 塩基配列の記載方法

塩基配列および縮重配列は、Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB)による Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences, Recommendations 1984 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>)に従った。

2. プライマー設計プログラム

1) 開発環境

プライマー設計プログラム(Co-ordination of common motifs: CoCoMo アルゴリズム)を稼働するためのオペレーティングシステムとしては、Linux (Ubuntu10.04 または 10.10)を用いた。

開発言語としては、Ruby 1.87 を、同言語のバイオインフォマティクス用の拡張モジュールとしては BioRuby を、データベースとの接続モジュールとしては MySQL/Ruby を使用した。データを格納・処理するためのデータベースには MySQL 5.1 (<http://dev.mysql.com/>)を使用した。

2) 連携プログラム

塩基配列間の相同性を算出するためには、USEARCH プログラム (version 5.1, <http://www.drive5.com/usearch/>)を使用した。複数のウイルスの塩基配列を整列させるためには、MAFFT プログラム (version 6.1, <http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/>)

software/)を用いた。多数の配列を、相同性を指標としてグループ化するためのプログラムとしてはクラスタリングソフト MCL プログラム (version 11-335, <http://www.micans.org/mcl/>)を利用した。

3. 対象ウイルスデータ

各ウイルスの既知のゲノム塩基配列データは、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)よりダウンロードし、BioRubyを用いたプログラムによりMySQLのテーブルに格納した。

4. CoCoMo アルゴリズムの構成

1) CoCoMo アルゴリズム

2010年度においては縮重塩基を含む塩基配列を4桁の二進数に変換し、相同性や縮重性などのプライマー評価に必要な数値を算出するプログラムを作出することにより計算全体を高速化した。さらに、プライマー予測プログラムの途中停止を防ぐことにより下記の手順が構成された(図1)。

- ① ウイルス遺伝子の収集と均質データベースの作成。
- ② ウイルス遺伝子産物アミノ配列の相同性の算出・クラスタ化。
- ③ クラスタ内ウイルス遺伝子産物アミノ配列のアライメントを元にしたクラスタ内塩基配列アライメントの作成。
- ④ クラスタ内の全ての配列を整理し共通塩基配列と縮重塩基を設定。
- ⑤ 縮重性条件を満たすプライマー候補1の選択・方向の決定。

- ⑥ PCRで100-500塩基のPCR産物を生じることが予想されるプライマー候補1の選択と評価
- ⑦ 評価点を合計して総合評価を算定し、上位をプライマー候補2とする。

本年度においては全面的に手順を見直し、下記のように、予測されたプライマー候補をクラスタ解析することによりグループ化した(図2)。プライマーのグループ化を実施することにより、縮重塩基4個以下のプライマーを選択することが可能になった。

- ① 対象ウイルスグループを限定
- ② 遺伝子情報を抽出
- ③ 遺伝子情報で重複を除く
- ④ 重複しない遺伝子情報を元に遺伝子をグループ化
- ⑤ グループ化した遺伝子を整理
- ⑥ 整理上の共通領域からプライマー候補を選択
- ⑦ プライマー候補のグループ化: プライマーグループは対象遺伝子の領域によって異なる。グループが最低数となり、縮重塩基数が4以下となる領域から設計されたプライマーをこの時点の候補として採用した(図2)。
- ⑧ プライマー候補の評価・順位づけ

3. 分離ウイルス

山口大学獣医学部(試料1および2)および酪農学園大学ウイルス学教育ユニット(試料3)から分与を受けた、ウイルス分離および分離者による予想は表1に示す通りであ

る。

4. ウイルスおよびウイルス感染細胞からの cDNA の作成

1) 培養上清からの DNA/RNA 抽出

培養上清から、PureLink viral RNA/DNA purification kit(Life Technologies)を用いて DNA および RNA を同時に抽出した。

2) 感染細胞からの RNA 抽出

感染細胞から TRIzol(Life Technologies)を用いて RNA を抽出した。抽出後、RNA は細胞 10^7 個あたり 200 μ l の割合で DW に溶解された。

3) cDNA の合成

培養上清から抽出した DNA/RNA および感染細胞から抽出した RNA を溶液量 1:1 の割合で混合し、RNA 試料溶液として用いた。

4) ウイルスおよび感染細胞 RNA からの増幅 cDNA の合成

混合された試料 RNA 溶液は、TransPlex Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich)によって増幅と同時に増幅試料 cDNA が合成された。

5. 縮重プライマーによる PCR

増幅試料 cDNA を鋳型とした PCR は、HotStartGoTaq Green PCR Mix (プロメガ)によって実施された。反応条件としては、低アニーリング温度での増幅条件を用いた。すなわち、2 \times GoTaqMix (Mg₂+ plus) 12.5 μ l、200 pmol の各縮重プライマー、プライマー検証用 DNA 断片に滅菌蒸留水を 25 μ l となるように混合し、反応溶液とした。反

応は 95 $^{\circ}$ C 2 min の後、[94 $^{\circ}$ C 30 sec — 46 $^{\circ}$ C 30 sec — 72 $^{\circ}$ C 30 sec]の反応を 33 回行った。最後に 72 $^{\circ}$ C 5 min の反応を一回行い 8 $^{\circ}$ C で保温した。

6. マイクロチップゲル電気泳動

メーカーの手順書に従い、PCR 反応後の反応溶液を機器にセットし、分析した。本報告では、100~400 塩基の PCR 産物が分析対象となったため、分離緩衝液として DNA-500 Separation buffer (島津)を、マーカーとして DNA-500 marker for MultiNA(島津)を用いた。

C 結果

1. プライマー設計

今回改善したアルゴリズムにより、増幅要件を基本的に満たしたプライマーが自動設計された。レトロウイルス科については、宿主 mRNA との相同性が高くウイルス特異的なプライマー設計がプログラム上で難しかったため、今回の設計からは除いた。

2. PCR 結果

今回用いた試料の感染の可能性を勘案して、可能性の高い 14 のウイルス科を検出するための 54 組のプライマーペアを用いた PCR を実施した。代表的結果を図 3 に示す。11 のウイルス科について、3 種の cDNA のいずれかについて単一バンドの PCR が観察された(表 3)。

D 考察

縮重塩基を4個以下に限定し、可能な限り多数のウイルス種を増幅するプライマーセットを設計する様、前年度のアルゴリズムが改善された。このことにより、感染細胞由来のcDNAについて単一のバンドが得られるプライマーセットが得られた。

今後、対象ウイルスを高病原性のウイルスに限定し、既知のウイルス感染試料を多数試すことによりプライマー設計の精度を向上することにより、新種ウイルスを検出する方法として実用性を持つようになることが期待される。

今後、方法の改善のため、2012年度においては、モック細胞から抽出したcDNAを用いて非特異ラダーの出るプライマーセットを除くことにより、ウイルス遺伝子の検出精度を高める。また、ウイルスゲノムおよび蛋白質での保存領域情報をプライマー設計に利用することにより、検出感度およびカバー範囲を向上させる試みを実施する。アルゴリズム上では、新種ウイルスデータを除いたウイルスデータにより設計を試み、新種をカバーするプライマーが設計される様アルゴリズムを改善する。これらの改善を進めることにより、新種ウイルスを含むウイルスを検出可能な診断法が開発されることが期待される。

E 結論

1. 原因不明の疾患を解明するため、近縁種のウイルスを増幅可能なプライマー設計アルゴリズムを改善した。複数の感染細胞cDNAを鋳型として用いた実験で、単一の増幅像が得られたことから、実用性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

表1 分離ウイルス

| 番号 | 発症動物 | CPE | 予想されたウイルス |
|----|------|------------------------------|-----------|
| 1 | ネコ | 口腔ぬぐい液を接種した fcwf-4細胞 | レトロ |
| 2 | ウシ | 空腸乳剤を接種した HmLu-1細胞 | パラミクソ |
| 3 | ヒヨドリ | 総排泄孔付近の腸管乳剤を接種した Caco-2細胞 | レオ |

表2 アルゴリズム上プライマー設計対象となるウイルス科ごとの遺伝子
グループ数および10種以上のウイルスが含まれる遺伝子グループ

| | 設計可能な遺伝子グループ数 | 10種以上の遺伝子グループ数 |
|-------------|---------------|----------------|
| アデノウイルス科 | 15 | 15 |
| アレナウイルス科 | 12 | 9 |
| ブニヤウイルス科 | 19 | 7 |
| カリシウイルス科 | 13 | 4 |
| コロナウイルス科 | 17 | 8 |
| フィロウイルス科 | 1 | 1 |
| フラビウイルス科 | 44 | 10 |
| ヘペウイルス科 | 2 | 2 |
| ヘルペスウイルス科 | 113 | 9 |
| オルソミクソウイルス科 | 171 | 9 |
| パピローマウイルス科 | 12 | 8 |
| パラミクソウイルス科 | 20 | 6 |
| パルボウイルス科 | 8 | 8 |
| ピコルナウイルス科 | 15 | 6 |
| ポリオーマウイルス科 | 4 | 4 |
| ポックスウイルス科 | 52 | 29 |
| レオウイルス科 | 32 | 2 |
| ラブドウイルス科 | 9 | 3 |
| トガウイルス科 | 4 | 3 |

表3 各試料に関するウイルス科の増幅結果

単一のPCRバンドが既知のウイルス遺伝子から予想されるサイズに検出された結果のみを記載する。

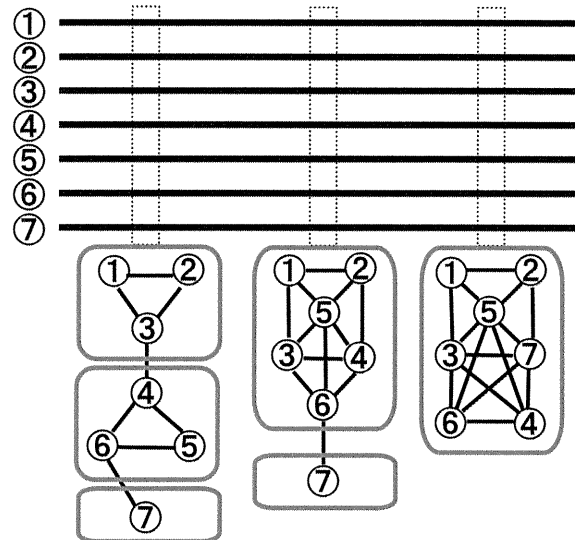
| | 試料1 | 試料2 | 試料3 |
|-------------|-----|-----|-----|
| アデノウイルス科 | ○ | ○ | |
| アレナウイルス科 | ○ | | |
| ブニヤウイルス科 | | | ○ |
| コロナウイルス科 | | | |
| フィロウイルス科 | | | |
| フラビウイルス科 | ○ | ○ | ○ |
| オルソミクソウイルス科 | | | |
| パラミクソウイルス科 | ○ | ○ | ○ |
| パルボウイルス科 | | ○ | |
| ピコルナウイルス科 | | ○ | |
| ポックスウイルス科 | | ○ | |
| レオウイルス科 | ○ | ○ | ○ |
| ラブドウイルス科 | | ○ | ○ |
| トガウイルス科 | | ○ | |

図1 プライマー設計のための縮重塩基と共通配列

ウイルス1 ATGGGCGTACCCTGCCCAATAA
ウイルス2 ATGGCCGTACCCTGCCTATTA
ウイルス3 ATGCCATACCCTGCGTATTA
共通配列 ATGSSCRTACCCTGCCYAWTAA

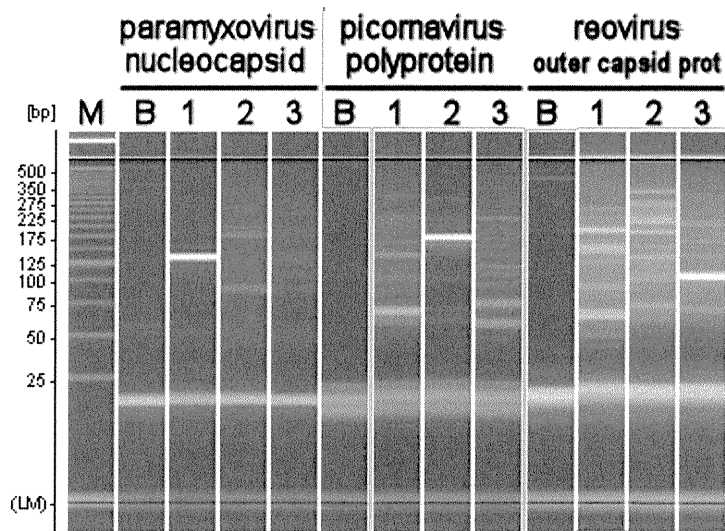
縮重塩基で共通配列を設計する方法を示す。ここでS=C or G, R=A or G, Y=C or T, W=A or Tとして記載している。

図2 プライマー設計のためのクラスター解析



候補遺伝子を番号で示し、遺伝子の領域ごとについて、プライマー候補配列同士の相関性が高い場合に連結することによるクラスター解析を各領域の下に示す。

図3 単一バンドが得られたPCR結果(一部)



左端のレーンにマーカー(M)を、上部に対象ウイルスおよび遺伝子を、各レーンの上に試料番号を示す。B:水を鋳型としたバックグラウンド。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *J Virol Methods*. 180:68-74, 2012
2. Tani H., Morikawa S, and Matsuura Y. Development and applications of VSV vectors based on cell tropism. *Frontiers in Microbiol.*, 2012, 2(272): 1-7.
3. Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, and Greenberg RN. Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults. *J Infect Dis* 2011, 204(9):1395-402
4. Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2012, ;44(1):40-4.
5. Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Fukushi, S Saijo M, Kurane, I Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Shigeru Morikawa, S. Reston Ebola Virus Antibodies in Bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*, 2011 17(8):1559-60
6. Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba M, Nishimura M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M, Mizutani T. A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. *Virus Genes*. 2011, 43(2):243-8.
7. 西條政幸: バイオテロリズムに用いられる可能性のある病原体と国立感染症研究所における対応: 出血熱ウイルスと痘瘡ワクチン. *日本犯罪学会雑誌* 77:63-66, 2011
8. Yusuke Sayama, Yuki Eshita, Takuya Yamao, Miho Nishimura, Tomomitsu Satho, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Kouji Sakai, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa and Tetsuya Mizutani*. Prevalence of Phasi Charoen Virus in Female Mosquitoes. *J. Parasitology and Vector Biology*. 2011. 3, 19-21.
9. Tetsuya Mizutani, Yusuke Sayama, Akira Nakanishi, Hideharu Ochiai, Kouji Sakai, Kouji Wakabayashi, Nozomi Tanaka, Emi Miura, Mami Oba, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Shin-ichi Ono. Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology*. 2011. 412. 179-187.
10. Masako Abe, Naoto Ito, Kouji Sakai, Yoshihiro Kaku, Mami Oba, Miho Nishimura, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Makoto Sugiyama, Tetsuya Mizutani. A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. *Virus Genes*. 43, 243-248. 2011.
11. Isawa H, Kuwata R, Hoshino K, Tsuda Y, Sakai K, Watanabe S, Nishimura M, Satho T, Kataoka M, Nagata N, Hasegawa H, Bando H, Yano K, Sasaki T, Kobayashi M, Mizutani T, Sawabe K. Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from *Culex* mosquitoes in Japan. *Virus Res*. 2011. 255.

- 147-155.
12. Kai, C. and Yoneda, M., Henipavirus infections – An expanding zoonosis from fruit bats. *J Disaster Res*, 6, 390-397, 2011.
 13. Kodama, A., Yanai, T., Kubo, M., El Habashi, N., Kasem, S., Sakai, H., Masegi, T., Fukushi, H., Kuraishi, T., Yoneda, M., Hattori, S. and Kai, C.: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) may not be infected with equine herpesvirus 9. *J. Med. Primatol.* 40(1):18-20, 2011.
 14. Huang M., Sato H., Hagiwara K., Watanabe A., Sugai A., Ikeda F., Kozuka-Hata H., Oyama M., Yoneda, M. and Kai, C. Determination of phosphorylation site in Nipah virus nucleoprotein and its involvement in viral transcription. *J.Gen.Virol.*, 92(9); 2133- 2141, 2011.
 15. Inoue Y, Sato H, Fujita K, Tsukiyama-Kohara K, Yoneda M, Kai C. Selective translation of the measles virus nucleocapsid mRNA by la protein. *Front Microbiol.* 2:173; 2011.
 16. Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C. Recombinant vaccines against the mononegaviruses--what we have learned from animal disease controls. *Virus Res.* 162(1-2): 63-71. 2011.
 17. Takayama, I., Sato, H., Watanabe, A., Omi-Furutani, M., Kanki, K., Yoneda, M. and Kai, C. The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, 424, 45-55, 2012.
 18. Fukuma, A., Kurosaki, Y., Morikawa, Y., Grolla, A., Feldmann, H., and Yasuda, J.: Rapid detection of Lassa virus by reverse transcription – loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and Immunology*, 55, 44-50, 2011.
 19. Yasuda, J.: Ebolavirus replication and Tetherin/BST-2. *Frontiers in Virology*, in press.
 20. Usami, K., Matsuno, K., Igarashi, M., Denda-Nagai, K., Takada, A., and Irimura, T. (2011) Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407(1):74-78.
 21. Nakayama, E., Tomabechei, D., Matsuno, K., Kishida, N., Yoshida, R., Feldmann, H., and Takada, A. (2011) Antibody-dependent enhancement of Marburg virus infection. *J. Infect. Dis. Suppl* 3:S978-985.
 22. Falzarano, D., Feldmann, F., Grolla, A., Leung, A., Ebihara, H., Strong, J.E., Marzi, A., Takada, A., Jones, S., Gren, J., Geisbert, J., Jones, S.M., Geisbert, T.W., and Feldmann, H. (2011) Single Immunization With a Monovalent Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Protects Nonhuman Primates Against Heterologous Challenge With Bundibugyo ebolavirus. *J. Infect. Dis. Suppl* 3:S1082-1089.
 23. Ishii, A., Thomas, Y., Moonga, L., Nakamura, I., Ohnuma, A., Hang'ombe, B., Takada, A., Mweene, A., and Sawa, H. (2011) Novel arenavirus, Zambia. *Emerg. Infect. Dis.* 17(10):1921-1924.
 24. Nakayama, E. and Takada, A. (2011) Ebola and Marburg viruses. *J. Disaster Res.* 6(4):381-389.
 25. Gamage CD, Yasuda SP, Nishio S, Kularatne SA, Weerakoon K, Rajapakse J, Nwafor-Okoli C, Lee RB, Obayashi Y, Yoshimatsu K, Arikawa J, Tamashiro H (2011) Serological evidence

- of Thailand virus-related hantavirus infection among suspected leptospirosis patients in Kandy, Sri Lanka. *Jpn J Inf Diss* 64: 72-75
26. Yasuda SP, Yoshimatsu K, Koma T, Shimizu K, Endo R, Isozumi R, Arikawa J (2012) Application of Truncated Nucleocapsid Protein (N) for Serotyping ELISA of Murinae-Associated Hantavirus Infection in Rats. *J. Vety Med Sci* 74: 215-219
 27. Kariwa H, Yoshida H, Sanchez-Hernandez C, Romero-Almaraz MD, Almazan- Catalan JA, Ramos C, Miyashita D, Seto T, Takano A, Totani M, Murata R, Saasa N, Ishizuka M, Sanada T, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I (2012) Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: Identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Res* 163: 486-494
 28. Seto T, Tkachenko EA, Morozov VG, Tanikawa Y, Kolominov SI, Belov SN, Nakamura I, Hashimoto N, Kon Y, Balakiev AE, Dzagurnova TK, Medvedkina OA, Nakauchi M, Ishizuka M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Ivanov LV, Arikawa J, Takashima I, Kariwa H (2011) An efficient in vivo method for the isolation of Puumala virus in Syrian hamsters and the characterization of the isolates from Russia. *J Viroll Methods* 173: 17-23
 29. Sanada T, Kariwa H, Nagata N, Tanikawa Y, Seto T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I (2011) Puumala virus infection in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural rodent hosts. *Virus Res* 160: 108-119
 30. Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda PS, Arikawa J, Koma T, Kataoko M, Ami Y, Suzaki Y, Le Thi Quynh M, Nguyen Thuy H, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T (2011) Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J Gen Virol, in press*
 31. Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology*, 2012, *in press*

