

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)

分担者研究報告書

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

野生鳥獣類媒介性感染症の病理学的検索

—BALB/c マウスを用いたダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス血症モデルの確立—

分担研究者:永田典代(国立感染症研究所 感染病理部第二室 室長)

協力研究者: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)

早坂大輔(長崎大学熱帯医学研究所 微生物分野 助教)

長谷川秀樹(国立感染症研究所 感染病理部 部長)

研究要旨:平成 22 年度に引き続き、ダニ媒介性脳炎ウイルス感染後の脳炎発症機序の解明と新規ワクチン評価系の確立を目的として、BALB/c を用いたウイルス血症モデルにおける神経病原性を解析した。その結果、ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株感染早期(3, 5 日)から腸管、胸腺、脾臓、脳に感染性ウイルスが存在し、非常に強い神経親和性を示すことが判明した。病理学的には、小脳、腸管神経叢のウイルス感染・増殖がみられたが、炎症性反応は全体に乏しかった。本研究によって、BALB/c を用いたダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス血症モデルを確立し、そのウイルス動態と病理像を明らかにした。

A. 研究目的

わが国のフラビウイルス感染症には日本脳炎と、ロシア春夏脳炎として知られるダニ媒介性脳炎がある。さらに、ウエストナイル熱・脳炎は輸入感染症例や流行が危惧されている。いずれもフラビウイルス科フラビウイルス属が原因となり、新興・再興感染症として警戒されている。いずれのウイルスも感染後にウイルス血症を引き起こし、中枢神経系に侵入後、神経細胞に感染し、直接的あるいは炎症反応によって細胞を破壊する。そのため、致死性あるいは後遺症を残すことがある。よって、予防が重要な感染症である。一方、これらのフラビウイルスの病原性解析には

C57BL/6 マウスや C3H/HeN マウスなど Th1 反応の強い系統を用いるのが一般的であるが、ワクチン接種による抗体誘導の効果を評価するためには Th2 反応の強い BALB/c マウスが適していることがある。われわれは、フラビウイルス感染症による脳炎発症機序の解明と新規ワクチン評価系の確立を目的として、BALB/c を用いたウイルス血症モデルにおける、各種の脳炎関連フラビウイルスの神経病原性を検討している。平成 22 年度に実施したダニ媒介性脳炎ウイルス(以下、TBEV)感染マウスモデルの病理学的検討に引き続き、今年度は、ウイルスの局在と病理像の関係について解析し、これまでの結果を比較

検討した。

B. 研究方法

1) 感染実験とウイルス分離

8週齢のBALB/cマウスにTBEVの標準株であるSofjin株を一匹あたり 2.5×10^3 PFU/200 μ l (100 LD₅₀に相当する) 静脈内接種した。接種3, 5, 7あるいは8日目にこれらの動物(一群3匹)を過麻酔殺、心臓採血し、血液、血漿、脳、脊髄、肝、腎、脾、リンパ節(頸部、腋窩、鼠径、および腸根)、胸腺、腸管を採取しウイルス分離を実施した。ウイルス分離は盲目的継代を2回まで実施した。TBEVの感染動物実験と細胞実験はすべて長崎大学熱帯医学研究所のABSL3実験施設内で実施した。この感染実験は長崎大学熱帯医学研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。

2) 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TBEV感染マウス組織材料(脳、脊髄、胃、小腸、大腸、心、肺、腎、肝、脾、副腎、胸腺、リンパ節)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TBEVウイルスEタンパクポリクローナル抗体(早坂研究協力者より供与)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抗原賦活化剤(pH9.0)(ニチレイ)中で121°C20分オートクレーブ処理によって抗原賦活化した。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(4000倍希釈)を加え4°Cで一晩インキュベートした。その後、ENVISION+ (DAKO)を用いてプロトコール通り免疫

染色を実施した。

C. 研究結果

動物は接種7日目には立毛、腹部膨満、元気消失がみられ8日目には瀕死となった。解剖時、7日目以降発症個体では胃、小腸の内容物(水、消化物)停滞による腸管膨隆がみられた。各臓器のウイルス分離と組織病変、ウイルス抗原の局在について表1, 2にそれぞれ示した。比較的早い時期から、中枢神経系でウイルスが分離されることが特徴的であった。また、腸管神経叢と大脳・脳幹・脊髄・小脳の神経細胞にウイルス抗原が検出された。組織学的解析結果から、腸管の分離ウイルスは腸管の神経叢に由来すると推察しているが、3日目の組織標本でそれは証明されていない。

D. 考察

TBEVをBALB/cマウスに静脈内接種すると、ウイルスは腸管神経叢と中枢神経系に侵入し、神経細胞に感染、増殖し、神経症状を引き起こした。これまでの研究結果から、3種類のフラビウイルスのBALB/Cマウスにおける神経病原性について、次の相違点が明らかとなった。1. TBEV Sofjin株は比較的早い時期から中枢神経系でウイルスが分離され、マウスの神経細胞に非常に強い親和性を示す。小脳および腸管神経叢のウイルス感染・増殖が特徴的である。2. 日本脳炎ウイルス JaTH株感染では感染初期にリンパ節、発症期に中枢神経系でウイルスが分離される。大脳皮質の脳炎と脊髄炎が主体だが、脊髄前角病変は弱く、麻痺はない。3. ウエストナイルウイルス NY99株感染は早期から血液、リンパ組織で

ウイルスが分離されるが、個体によって異なる病態を示す。また、これらの病態の特徴は、分離後の継代歴やウイルスそのものの特徴を示していると考えられる(表 3)。そのため、これらの病理像は、患者の病態を理解する上で有用な情報であろう。

E. 結論

ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス血症モデルを確立し、そのウイルス動態と病理像を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshii K., Moritoh K., Nagata N., Yokozawa K., Sakai M., Sasaki N., Kariwa H., Agui T., Takashima I. Susceptibility to flavivirus-specific antiviral response of Oas1b affects the neurovirulence of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. Arch Virol. 2012 in press

2) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su IJ, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Vallet S, Cardoso MJ, Desai A, Ravi V, Nagata N., Shimizu H. Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA. Neuropathol Appl Neurobiol. 2012. 38:443-453

2. 学会発表

1) 永田 典代、岩田 奈織子、早坂 大輔、佐藤 由子、小島 朝人、佐多 徹太郎、長谷川 秀樹: BALB/c マウスを用いた脳炎関連フラビウイルスの病原性の比較。第 60 回日本ウイルス学会(大阪)2012 年 11 月

2) 小谷 治、鈴木 忠樹、Naeem Asif、岩田 奈織子、中島 典子、片野 晴隆、田口 文広、長谷川 秀樹、清水 博之、永田 典代: 新生仔マウスにおける新規ヒトカルジオウイルス(Saffold virus)の神経病原性の解析。第 60 回日本ウイルス学会(大阪)2012 年 11 月

3) 駒 貴明、永田 典代、吉松 組子、佐藤 由子、清水 健太、天田 貴子、西尾 佐奈恵、長谷川 秀樹、有川 二郎: 肺水腫を呈すハンタウイルス感染 SCID マウスに於ける好中球の役割。第 60 回日本ウイルス学会(大阪)2012 年 11 月

4) 早坂 大輔、青木 康太郎、北浦 一孝、白井 顕治、Dash Sima Simanti、永田 典代、高松 由基、鈴木 隆二、森田 公一: 日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く。第 60 回日本ウイルス学会(大阪)2012 年 11 月

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

表 1 ウイルス分離の結果

解剖日	血液	脳	脊髄	肝	腎	脾	リンパ節				胸腺	腸管
							頸部	腋窩	鼠径	腸根		
3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	2/3
5	0/3	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	2/3
7	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	1/3

分離陽性動物数/使用動物数

表 2 組織病変とウイルス抗原局在(組織像は平成 22 年度報告書を参照のこと)

解剖日	前頭葉	頭頂葉	海馬	視床	視床下部	中脳	小脳	延髄	脊髄	腸管				胸腺	パイエル板
										神経叢	肝	腎	脾		
3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
7	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	1/0	1/0	2/0	2/0	3/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
8	1/1	1/0	1/0	2/0	2/0	1/0	2/0	2/0	2/0	3/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

ウイルス抗原陽性動物数/炎症反応陽性動物数 (n = 3)

表 3 各フラビウイルスのプロトタイプ株の由来と履歴

ウイルス(株名)	由来	継代履歴	分与	病原性	参考文献
ダニ媒介性脳炎ウイルス(Sofjin)	1937 年ダニ脳炎患者脳(極東ロシア型)	新生仔マウス脳と細胞で 100 回以上継代	長崎大学 熱帯医学研究所	強毒	Shamanin <i>et al.</i> , 1990
日本脳炎ウイルス(JaTH-160)	1959 年の日本脳炎患者	新生仔マウス脳内接種分離後、成マウス腹腔内接種 15 代、Vero 細胞 1 代、VeroE6 細胞 1 代	感染研	強毒	Nishimura <i>et al.</i> , 1968
ウエストナイルウイルス(NY99-6922)	1999 年ニューヨークで採取された蚊由来	新生仔マウス脳および細胞、Vero 細胞で継代	北海道大学	強毒	Shirato <i>et al.</i> , 2003

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）

分担研究報告書

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究
ダニ媒介性脳炎の重症化機構の解析および迅速診断法の確立

研究分担者：早坂大輔 長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 助教
研究協力者：Mya Myat Ngwe Tun 長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 COE 研究員
永田典代 国立感染症研究所 感染病理部 室長
好井健太郎 北海道大学大学院獣医学研究科 助教
竹上勉 金沢医科大学 総合医学研究所 教授
鈴木隆二 (独) 国立病院機構 相模原病院 臨床研究センター 室長

研究要旨：本研究ではダニ媒介性脳炎(TBE)の病態解析および迅速診断法の確立を目指して、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)感染マウスモデルにおける重症化機序の解析、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による TBEV 遺伝子検出法の確立、日本脳炎ウイルス(JEV)感染マウスモデルによる脳炎病態の分子イメージング解析を行い以下の結果を得た。1) TBEV 感染マウスモデルにおいて TNF α KO マウスでは致死性が亢進することから、TNF α 応答は重症化抑制に働くことが示唆された。2) TBEV Oshima 株感染マウスの脳内遺伝子発現をマイクロアレイ法により網羅的に比較解析したところ、重症個体と軽症個体で発現量が異なる数種の遺伝子が確認された。3) TBEV 極東型、シベリア型、ヨーロッパ型を区別できる LAMP 法を確立した。また、ヒト血液またはマダニ材料と TBEV の混合物から LAMP 法により TBEV 遺伝子を検出できることを確認した。4) F-18 FDG 投与による positron emission tomography (PET) イメージングにより JEV JaTH160 株感染マウスでは大脳皮質域における FDG 集積の著しい低下がみられた。以上の結果から、ダニ媒介性脳炎およびフラビウイルス脳炎の特異的な予防・治療法の確立に重要な知見が得られた。

A. 研究目的

TBEV は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・脳炎を引き起こす人獣共通感染症の原因病原体である。TBEV に

は極東型、シベリア型、ヨーロッパ型のサブタイプが知られ、一般的に極東型は他の型に比べ病原性が高いとされる。日本においても北海道南部で極東型 TBEV の存在が確認され

ている。TBE は、重症化し脳炎を発症すると致死性が高く、回復しても多くの患者で後遺症が問題となる。しかしながら、重症化に至る機序については不明な点が多く、特異的な予防・治療法は確立されていない。また、TBEV 感染の特定、さらに発症後の予後を早い段階から特異的に早期診断できる方法も十分確立されていない。

我々はこれまでにマウスモデルを用いた重症化機序の解析により、重症個体では軽症個体にくらべ IL-10 と TNF α 応答の上昇がみられることを示してきた。さらに、IL-10 KO マウスでは重症化の亢進がみられたことから、IL-10 応答は重症化の抑制に働くことを示唆してきた。しかしながら、重症化における TNF α の役割については不明である。そこで、本研究では重症化における TNF α 応答の役割を調べるために、TNF α KO マウスを用いて病態発現機序の解析を行った。また、炎症性サイトカイン以外に重症個体で特異的に発現がみられる遺伝子を調べるために、マイクロアレイ法を用いて重症個体と軽症個体の脳内遺伝子発現の網羅的比較を行った。

また、TBEV 感染予防には迅速な診断や流行巣の把握が非常に重要となる。そこで、LAMP 法を用いて TBEV の各サブタイプを特異的に区別できる遺伝子検出法の確立を試みた。さらに、ヒト血液やマダニからの BEV 遺伝子検出の可能性を検討した。

また、脳炎を生体内で非侵襲的にイメージングし脳炎病態を早期に診断、把握する方法の確立を目指して、TBEV と同じフラビウイルス科に属する JEV 感染マウスモデルを用いて

分子イメージングによる生体内脳炎イメージングを試みた。

B. 研究方法

1) B6 マウスおよび TNF α KO B6 マウスに極東型 TBEV 株の Oshima 株、Sofjin 株をそれぞれ 10^4 PFU 皮下感染させ、体重減少、症状、致死性を比較した。さらに、感染 5, 9 日目における中枢神経組織中のウイルス量をプラークアッセイ、炎症性サイトカイン量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。

2) B6 マウスに Oshima 株 10^3 PFU 皮下感染後 13 日目に体重変化率により重症個体と軽症個体を区別し (n=3)、それぞれの脳から RNA を抽出しマイクロアレイ法 (mouse 2.0 GeneChip microarray system, Affymetrix) にて遺伝子発現量を測定、比較した。

3) E 蛋白領域を基に極東型、シベリア型、ヨーロッパ型それぞれの特異的 LAMP プライマーを PrimerExplorerV3 (栄研化学) により設計した。極東型 Oshima 株、Sofjin 株、シベリア型 IR98 株、ヨーロッパ型 Hochosterwitz 株 (オーストリア、ウイーン大学 Dr. Heinz より分与) の RNA10ng を反応液 25ul 中に加え、Loop amp[®] DNA 増幅試薬キット (栄研化学株式会社) を用いて 62.5°C、1 時間の反応を行った。反応の確認はリアルタイム濁度測定装置 LA320C (栄研化学株式会社) を用いて行った。また、TBEV Oshima 株を 10^{-1} - 10^6 PFU ずつ健康ヒト血液 200 μ l またはマダニ 10mg と混合した後 RNA を抽出、RNA10ng を用いて NS1 蛋白領域を基に作製した TBEV 共通プライマーにより LAMP 反応を行った。

4) JEV JaTH160 株を 10^4 PFU 皮下感染させ、13 日目に F-18 FDG (FDG スキャン[®]注、日本メジフィジックス) を 10~20MBq 腹腔内投与し、投与後 10 分後からイソフルラン吸入麻酔下で 30 分間 FX3000 プレクリニカルイメージングシステム (SII) にて頭部の PET および CT 撮像を行った。

(倫理面への配慮)

ウイルス感染実験は BSL3 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。ヒト血液サンプルを用いる実験については長崎大学熱帯医学研究所倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

1) Oshima 株感染後の致死率は B6 マウスで 38.1% (n=21) に対して TNF α KO B6 マウスでは 100% (n=14) となった。また、致死個体の生存日数は B6 マウスで 14.1 ± 2.3 日に対して TNF α KO B6 マウスでは 12.6 ± 0.74 と 2 日程度短くなった (図 1)。しかしながら、WT マウスと TNF α KO の脳内ウイルス量を比較したところ有意な差が確認されなかった (図 2)。また、脳および脾臓中の IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6 の発現量も比較したがマウス群のあいだで有意な差は確認されなかった (図 2)。

一方、Sofjin 株感染では B6 マウス、TNF α KO マウスともに致死率は 100%、致死個体の生存日数は B6 マウスで 9.4 ± 0.19 日、TNF α KO マウスで 8.83 ± 0.11 となり両マウス間で有意差が見られなかった (図 1)。

2) TBEV Oshima 株感染マウス脳の遺伝子発現比較の結果、軽症個体に比べ重症個体で発

現上昇していた遺伝子として Sulfotransferase family, Protein kinase inhibitor, D19Ertd386e, BB541617, Nucleolar prot Nol 7, BB476293, BB747838, Ribonuclease A family がみられた。一方、低下していた遺伝子として Calpain 3, LSM7homo, U6 snRNA, 160586 (RIKEN), Olfactomedin like 3, DNA methyltransferase, 116018 (RIKEN), Smad 7, 53BP1, Parc がみられた。

3) RT-LAMP 法において TBEV 各サブタイプ特異的プライマーを用いると、各サブタイプのウイルス株遺伝子のみを検出でき他の株との交差反応性は確認されなかった (図 3)。

また、健康ヒト血液またはマダニと混合した TBEV の RNA より、いずれも 10^2 PFU 以上との混合サンプルからウイルス遺伝子が検出された (図 3)。

4) F-18 FDG を投与した JEV JaTH160 株感染マウスでは大脳皮質域における FDG 集積の著しい低下がみられた。一方、非感染コントロールマウスでは脳全体に FDG 集積がみられた (図 4)。

D. 考察

1) TNF α KO マウスへの TBEV Oshima 株感染において致死性の増加みられたことから、TNF α 応答は重症化抑制に働くことが示唆された。しかしながら、TNF α KO マウスにおいて中枢神経組織におけるウイルス量には有意な増加が認められず、また、IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6 の発現量に有意な差がみられなかったことから、TNF α が重症化をどのように抑制するかの

機序については今後の課題である。

一方、Sofjin 株感染では TNF α KO でも致死性に違いがみられなかったことから、Sofjin 株感染の場合は TNF α 応答の重症化への影響は小さいものと考えられた。

2) TBEV 感染マウス脳内遺伝子発現において、重症個体と軽症個体で差がみられた遺伝子はこれまでにウイルス性脳炎との関連が報告されていないものが多く、また機能が必ずしも明らかになっていない遺伝子がみられる。これらの遺伝子がフラビウイルス感染にどのように関与しているかを調べるのが今後の課題である。

3) 本研究で TBEV 共通および各サブタイプ特異的に TBEV 遺伝子を検出できる方法を確立した。LAMP 法は特別な装置を必要とせず、ウォーターバスなどで 62.5°C、1 時間の反応で検出できる点が大きなメリットである。また、ヒト血液およびマダニ材料が LAMP 法による TBEV 遺伝子検出を阻害しないことが確認された。したがって、本研究で確立した方法は、TBEV 患者臨床サンプルからの簡便迅速診断、また、マダニ中の TBEV 保有状況を調べるための野外調査への応用に期待がもてる。

4) F-18 FDG を用いた PET イメージングは臨床検査や薬剤開発研究での応用性が高い。F-18 FDG は代謝活性の高い細胞に取り込まれるため、炎症部位や癌細胞、中枢神経組織での集積がみられる。しかしながら、ウイルス感染、特に急性脳炎において F-18 FDG の集積が上昇するのか低下するのかのデータはこれまでに報告がなかった。本研究で、脳炎部位では FDG 集積が低下することがはじめて確認された。

したがって、この PET イメージングを応用することにより、フラビウイルス脳炎患者において重症化の程度、中枢神経組織のダメージが高い部位などを特定して患者の予後判定、治療方針決定への重要な診断法への確立が期待される。

E. 結論

本研究成果により TBE の重症化には TNF α 応答による抑制機構が関連した病態機序が働くことが示唆された。今後これらのより詳細な機序解析により、特異的予防・治療薬の開発に結びつくことが期待される。また、TBEV 遺伝子の特異的、簡便かつ迅速な診断法の確立、生体内でのフラビウイルス脳炎イメージングによる病態診断の確立に関する重要な基礎情報が得られた。これらの研究成果から、ダニ媒介性脳炎およびフラビウイルス脳炎の重症化診断、予防・治療法の確立が期待される。

S. 健康危険情報

なし

T. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

8) 早坂大輔、北浦一孝、青木康太郎、白井顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く：第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇（2012, 4）

- 9) 高松 由基、ディン ティアン デュク、早坂大輔、森田公一：病原性の異なる日本脳炎ウイルス 2 株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み：第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇（2012, 4）
- 10) Daisuke Hayasaka, Kazuki Kitaura, Kotaro Aoki, Kenji Shirai, Dash Sima Simanti, Noriyo Nagata, Yuki Takamatsu, Ryuji Suzuki and Kouichi Morita : The mechanism of severe form of Japanese encephalitis virus infection : US-Japan 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, Beppu (2012, 6)
- 11) 早坂大輔、青木康太郎、北浦一孝、白井顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く：第 49 回ウイルス学会九州支部総会、那覇（2012, 8）
- 12) 早坂大輔、青木康太郎、北浦一孝、白井顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く：第 53 回日本熱帯医学会大会、帯広（2012, 9）
- 13) 早坂大輔、青木康太郎、森田公一：LAMP 法によるダニ媒介性能炎ウイルス（TBEV）遺伝子検出法の確立：第 53 回日本熱帯医学会大会、帯広（2012, 9）
- 14) 高松 由基、ディン ティアン デュク、早坂大輔、森田公一：病原性の異なる日本脳炎ウイルス 2 株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み：第 53 回日本熱帯医学会大会、帯広（2012, 9）
- 15) 早坂大輔、北浦一孝、青木康太郎、白井顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス（JEV）感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く：第 154 回日本獣医学会学術集会、盛岡（2012, 9）
- 16) 早坂大輔、青木康太郎、森田公一：RT-LAMP 法によるダニ媒介性能炎ウイルス遺伝子検出法の確立：第 19 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、大阪（2012, 11）
- 17) 早坂大輔、青木康太郎、北浦一孝、白井顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪（2012, 11）
- 18) 日本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：白井顕治、北浦一孝、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪（2012, 11）
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
1. 特許取得
- なし
2. 実用新案登録
- なし
3. その他
- なし

図1 TBEV 感染マウスの生存曲線

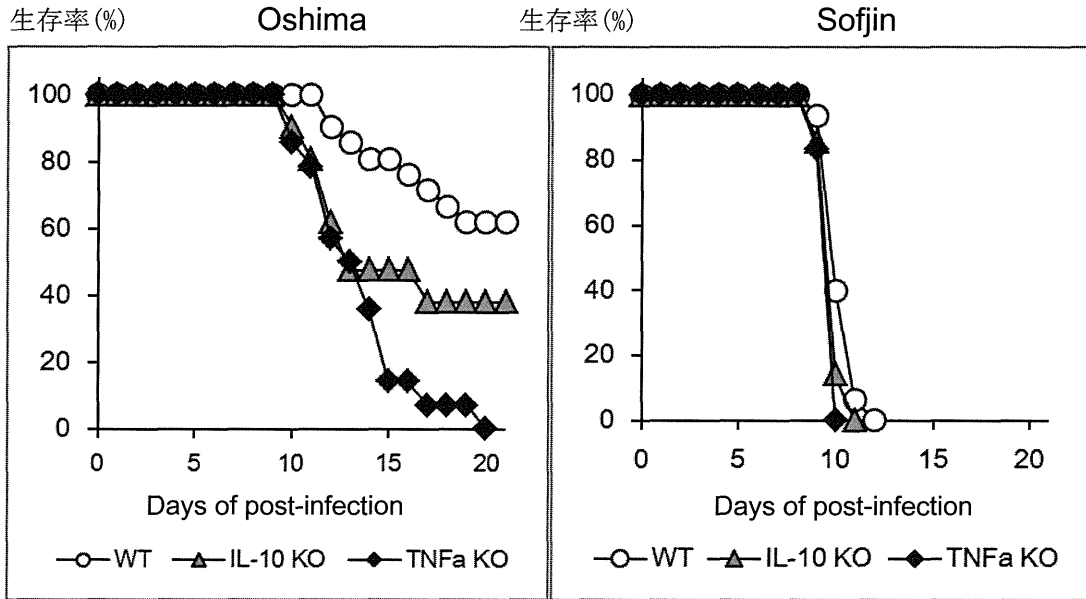


図2 TBEV Oshima 感染マウスの中中枢神経組織中ウイルス量と大脳皮質中サイトカイン mRNA 量

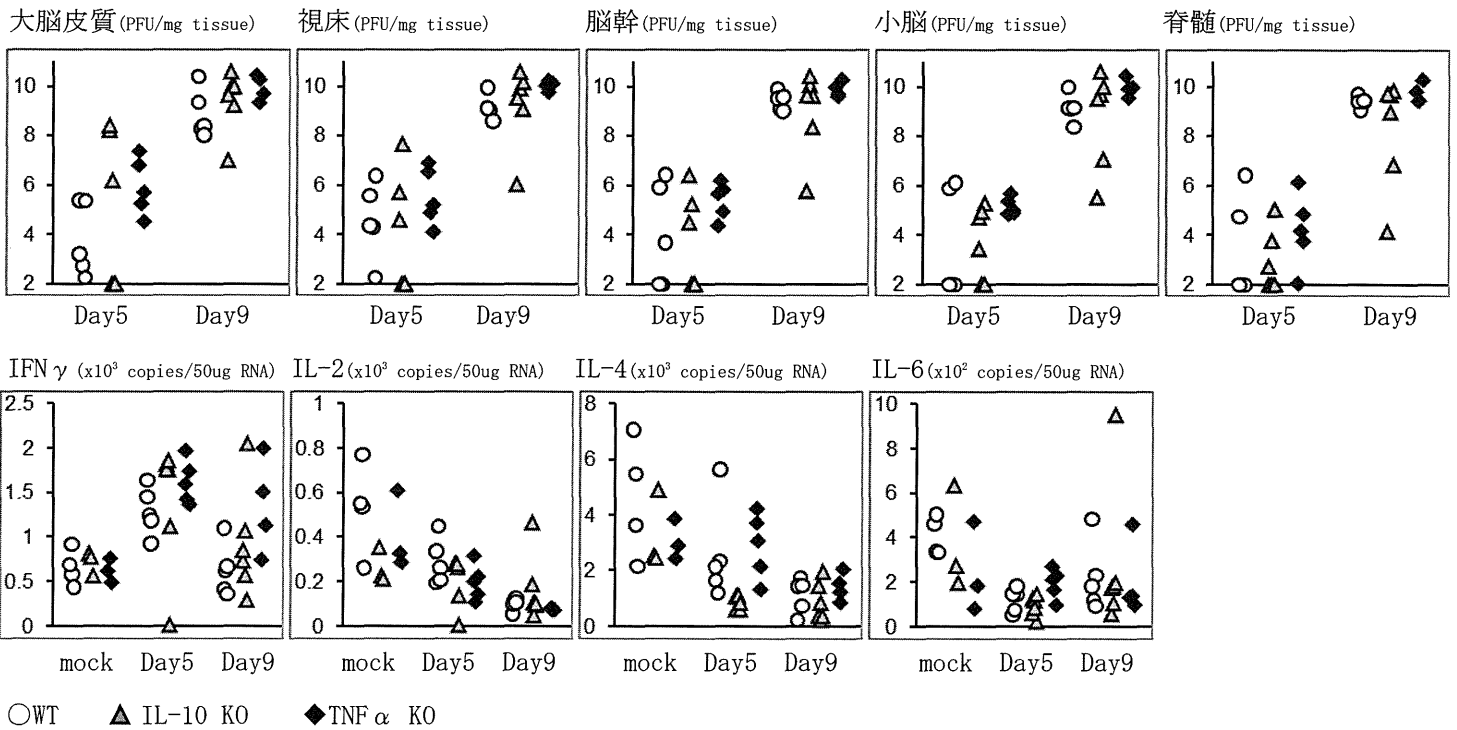
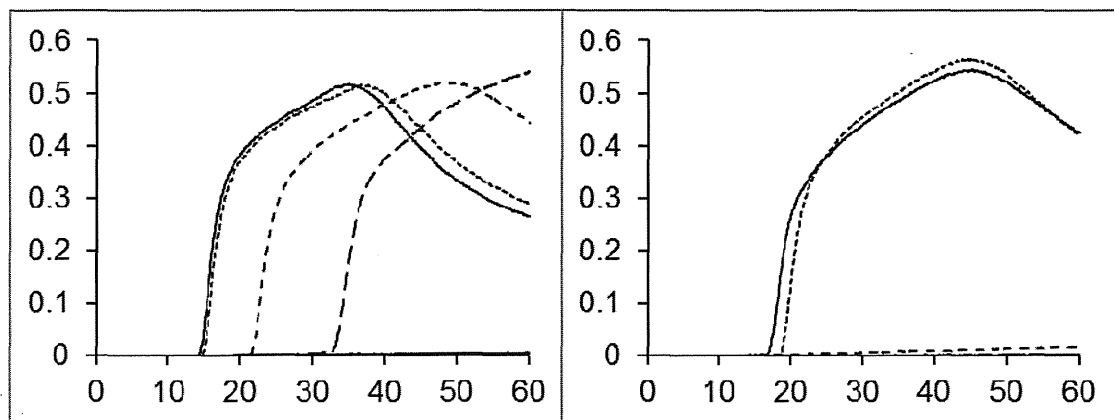


図3 TBEV サブタイプ特異的プライマーを用いた LAMP 反応液の濁度

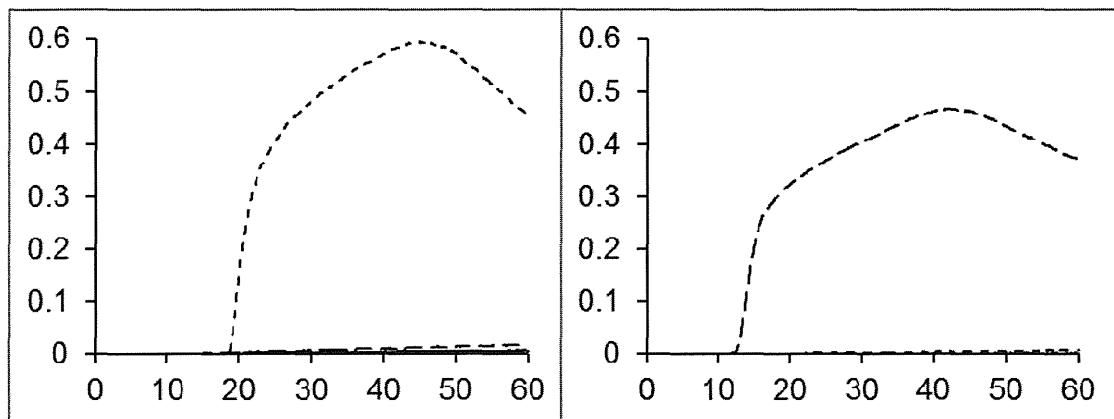
TBEV 共通プライマー

極東型プライマー



シベリア型プライマー

ヨーロッパ型プライマー



— Oshima 株 ····· Sofjin 株 - - - - IR98 株 - · - · Hochosterwitz 株

マダニと TBEV の混合サンプル

ヒト血液と TBEV の混合サンプル

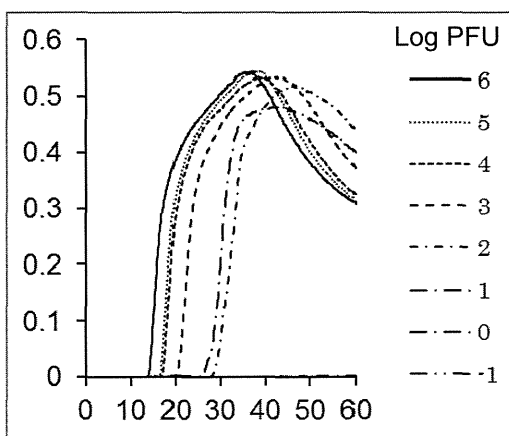
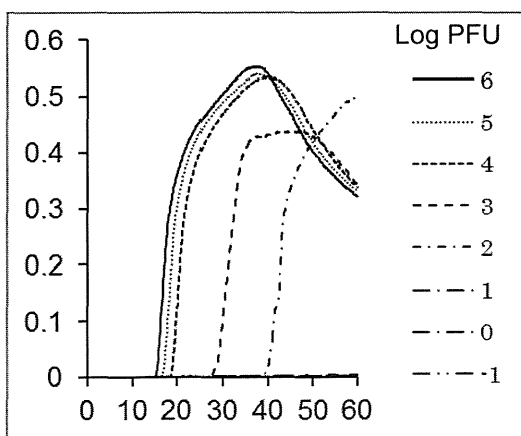
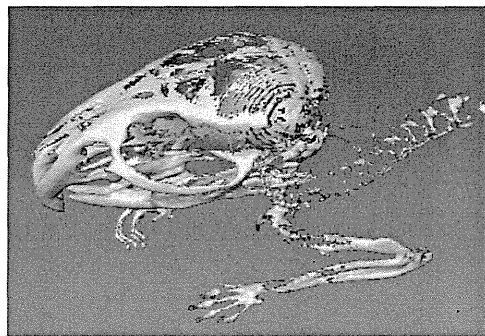


図4 JEV 感染マウス（13日目）の 18F-FDG 投与後の頭部 CT/PET 画像

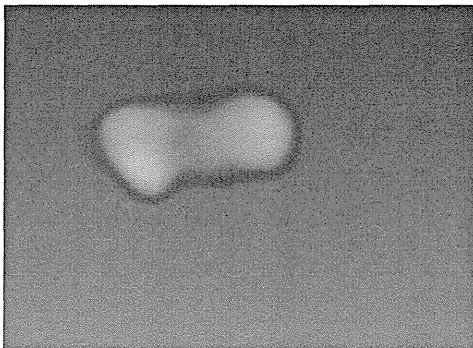
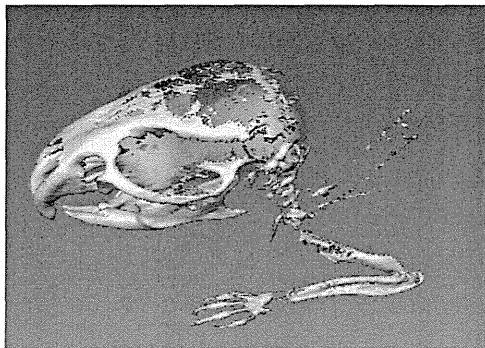
CT/PET（頭部骨格と FDG 集積像）

PET（FDG 集積像のみ）

JEV 感染



非感染



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
好井健太郎, 山崎翔子, 持館景太, 苅和宏明, 高島郁夫	2008年北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析	獣医畜産新報	65	377-378	2012
Sanada T, Seto T, Ozaki Y, Saasa N, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Kariwa H	Isolation of Hokkaido virus, genus Hantavirus, using a newly established cell line derived from the kidney of the grey red-backed vole (<i>Myodes rufocanus bedfordiae</i>)	J Gen Virol	93	2237-2246	2012
Sanada T, Kariwa H, Saasa N, Yoshikawa K, Seto T, Morozov VG, Tkachenko EA, Ivanov LI, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I	Development of a diagnostic method applicable to various serotypes of hantavirus infection in rodents	J Vet Med Sci	74	1237-1242	2012
Saasa N, Sanchez-Hernandez C, de Lourdes Romero-Almaraz M, Guerrero-Ibarra E, Almazan-Catalan A, Yoshida H, Miyashita D, Ishizuka M, Sanada T, Seto T, Yoshii K, Ramos C, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Kariwa H.	Ecology of hantaviruses in Mexico: Genetic identification of rodent host species and spillover infection.	Virus Res	168	88-96	2012
Saasa N, Yoshida H, Shimizu K, Sanchez-Hernandez C, Romero-Almaraz M de L, Koma T, Sanada T, Seto T, Yoshii K, Ramos C, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Kariwa H.	The N-terminus of the Montano virus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes conserved in rodent-borne hantaviruses.	Virology	428	48-57	2012
Yoshii K, Igarashi M, Ichii O, Yokozawa K, Ito K, Kariwa H, Takashima I. The Conserved Region in the PrM Protein Is a Critical Determinant in the Assembly of Flavivirus Particles	A Conserved Region in the PrM Protein Is a Critical Determinant in the Assembly of Flavivirus Particles	J Gen Virol	93	27-38	2012
Kariwa H, Yoshikawa K, Tanikawa Y, Seto T, Sanada T, Saasa N, Ivanov LI, Slonova R, Zakharycheva TA, Nakamura I, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I	Isolation and characterization of hantaviruses in far East Russia and etiology of hemorrhagic Fever with renal syndrome in the region	Am J Trop Med Hyg	86	545-553	2012
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	Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: Identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents	Virus Res	163	486-494	2012
Seto T, Nagata N, Yoshikawa K, Ichii O, Sanada T, Saasa N, Ozaki Y, Kon Y, Yoshii K, Takashima I, Kariwa H	Infection of Hantaan virus strain AA57 leading to pulmonary disease in laboratory mice	Virus Res	163	284-290	2012
Yasuda SP, Yoshimatsu K, Koma T, Shimizu K, Endo R, Isozumi R, Arikawa J	Application of Truncated Nucleocapsid Protein (N) for Serotyping ELISA of Murinae-Associated Hantavirus Infection in Rats.	J Vet Med Sci	74	215-9	2012
Schiegel M, Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Petraityte R, Sasnauskas K, Hammerschmidt B, Friedrich R, Mertens M, Groschup MH, Arai S, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda PS, Ishihara C, Ulrich R, Arikawa J, Köllner B	Novel serological tools for detection of Thottapalayam virus, a Soricomorpha-borne hantavirus.	Arch Virol	157	2179-87	2012
Koma T, Yoshimatsu K, Taruishi M, Miyashita D, Endo R, Shimizu K, Yasuda PS, Amada T, Seto T, Murata R, Yoshida H, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J	Development of a serotyping enzyme-linked immunosorbent assay system based on recombinant truncated hantavirus nucleocapsid proteins for New World Hantavirus infection.	J. Virol. Methods	185	74-81	2012
Yamada K, Park CH, Noguchi K, Kojima D, Kubo T, Komiya N, Matsumoto T, Mitui MT, Ahmed K, Morimoto K, Inoue S, Nishizono A.	Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus.	Virus Res.	165	34-45	2012
Sato, S., Kabeya, H., Miura, T., Suzuki, K., Bai, Y., Kosoy, M., Sentsui, H., Kariwa, H., and Maruyama, S	Isolation and phylogenetic analysis of <i>Bartonella</i> species from wild carnivores of the suborder Caniformia in Japan.	Vet Microbiol	161	130-136.	2012
Sato, S., Kabeya, H., Yamazaki, M., Takeno, S., Suzuki, K., Kobayashi, S., Souma, K., Masuko, T., Chomel, B. B., and Maruyama, S	Prevalence and genetic diversity of <i>Bartonella</i> species in sika deer (<i>Cervus nippon</i>) in Japan	Com Immunol Microbiol Infect Dis	35	575-581	2012
林谷秀樹, Ly, T.L.K., Nguyen N. T., Nguyen, T.D., 奥村水門, Nguyen N. T.	トナム・メコンデルタに生息するヤモリにおけるサルモネラの疫学.	獣医畜産新報	65	372-373	2012
Takano A, Sugimori C, Fujita H, Kadosaka T, Taylor K, Tsubota T, Konnai S, Tajima T, Sato K, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H	A novel Relapsing fever <i>Borrelia</i> sp. infects the salivary glands of the molted hard-bodied tick, <i>Amblyomma geomydae</i> .	Ticks and Tick-borne Diseases	3	259-261	2012

IV. 研究成果の刊行物・印刷

2008年北海道における ダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析

好井健太郎 山崎翔子 持館景太 荻和宏明 高島郁夫

要約

ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) は、人に対して重篤な脳炎を引き起こす人獣共通感染症の原因ウイルスである。日本では道南地域において10年以上にわたってTBEVの流行巣が存続していることが示されている。本研究では現在流行しているTBEVの情報を得るため、同地域の野鼠からウイルスの分離を試みた。分離されたTBEVを過去の分離株と比較したところ、遺伝子RNA配列の相異はわずか(36塩基/11000塩基)であったが、マウスにおける病原性が上昇していた。今後はこのような相違をもたらすウイルス側因子を同定するとともに、流行しているTBEVについてモニタリングを継続して行う必要があるものと考えられる。

はじめに

ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) はフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、人に重篤な脳炎を引き起こす人獣共通感染症の原因ウイルスである。日本では、1993年に北海道北斗市(旧上磯町)で患者が発生し、同地域の野鼠、ダニ、犬よりTBEVが分離されたことから、TBEVの流行巣の存在が明らかとなった¹⁻³⁾。その後の継続的な疫学調

査により、同地域で現在まで10年以上に渡り流行巣が維持されていることが示されているが⁴⁾、現在流行しているTBEVに関する情報は乏しい。そこで本研究では、北海道におけるTBEVの疫学的危険度を再評価するために、現在流行しているウイルスの分離および生物学的性状の解析を試みた。

材料と方法

2008年に北斗市で捕獲した野鼠の脾臓乳剤をBALB/c哺乳マウスに脳内接種し、このマウスの脳乳剤をBHK細胞に接種することでウイルス分離を行った。ウイルスの分離はTBEV特異的抗体を用いたIFAによるウイルス抗原検出とRT-PCRによるウイルス遺伝子検出によって確認した。分離したウイルスから遺伝子RNAを抽出し、RT-PCRにより増幅した後に遺伝子RNA全長の塩基配列を決定した。培養細胞における増殖性やマウスモデルにおける病原性を解析した。ウイルスをBHK細胞にMOI=0.01で感染させ、継時的に培養上清中に分泌されたウイルスの力価を測定した。またC57BL/6J(5週齢、雌)にウイルスを皮下接種し病原性の解析を行った。

結果

哺乳マウスへの接種実験において、北斗市のアカネズミ由来の脾臓乳剤を接種した群で衰弱個体が現れた。この個体から脳乳剤を作製しBHK細胞に接種したところ、TBEV特異的抗原の産生が確認され、またTBEV特異的遺伝子が検出された。分離ウイルスをTBEV Oshima 08-AS株と命名し、遺伝子RNAの全長の塩基配列を決定した。既知のTBEVとの系統樹を作成し比較したところ、Oshima 08-AS株は極東型に分類され、その中でも同地域で1990年代に分離されたウイルスと同じクラスターを形成、ロシア分離株とは明らかに異なるクラスターに属することが示さ

Kentaro YOSHII (写真・コメント), Shoko YAMAZAKI, Keita MOTTATE, Hiroaki KARIWA & Ikuo TAKASHIMA
北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医学講座公衆衛生学教室
〒060-0818 札幌市北区北18条西9



当研究室ではダニ媒介性脳炎ウイルスの全国での分布状況を調査するために、野鼠を対象とした血清疫学調査を継続して行っております。野鼠のダニ媒介性脳炎ウイルスに対する抗体調査のご依頼などありましたらご連絡ください。

表1 Oshima 08-AS 株と Oshima 5-10 株の全塩基配列の比較

遺伝子	総塩基数	塩基相違数	アミノ酸相違数
5' 非翻訳領域	131	1	—
C	348	1	0
prM	492	0	0
E	1488	2	0
NS1	1056	1	1
NS2A	690	3	1
NS2B	393	0	0
NS3	1863	9	5
NS4A	447	2	1
NS4B	756	5	1
NS5	2712	9	3
3' 非翻訳領域	724	3	—
計	11100	36	12

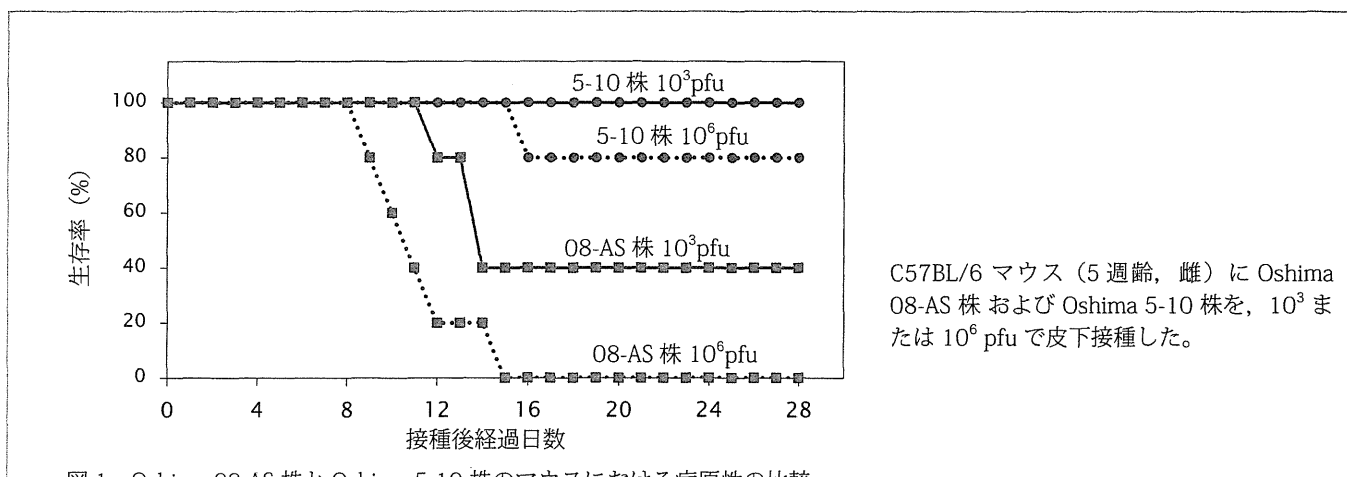


図1 Oshima 08-AS 株と Oshima 5-10 株のマウスにおける病原性の比較

C57BL/6 マウス (5 週齢, 雌) に Oshima 08-AS 株 および Oshima 5-10 株を, 10³ または 10⁶ pfu で皮下接種した。

れた。また 1995 年に北斗市の犬より分離された Oshima 5-10 株と比較したところ, 36 個の塩基の相違があり, そのうち非構造蛋白質領域の 12 個がアミノ酸の相違を伴うものだった (表 1)。

Oshima 08-AS 株と 5-10 株を BHK 細胞に感染させ増殖性を比較した所, 両株の間に違いは認められなかった。C57BL/6J マウスへの感染実験において 08-AS 株は 5-10 株より高い死亡率を示し, また脳内において比較的高い増殖性を示した (図 1)。

考 察

本研究において近年北斗市で流行している TBEV が分離され, 過去の分離株と比較することにより自然界で生じたわずかな遺伝子の変異により生物性状が影響を受けること

が示された。今後はこのような相違をもたらしウイルス側因子を同定するとともに, 本地域で流行している TBEV についてアミノ酸の変化を含めたモニタリングを継続して行っていく必要があるものと考えられる。

参考文献

- 1) Takashima, I., Morita, K., Chiba, M. et al. (1997) : *J. Clin. Microbiol.* 35, 1943-1947.
- 2) Takeda, T., Ito, T., Chiba, M. et al. (1998) : *J. Med. Entomol.* 35, 227-231.
- 3) Takeda, T., Ito, T., Osada, M. et al. (1999) : *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 287-291.
- 4) Yoshii, K., Mottate, K., Omori-Urabe, Y. et al. (2011) : *J. Vet. Med. Sci.* 73, 409-412.

Isolation of Hokkaido virus, genus *Hantavirus*, using a newly established cell line derived from the kidney of the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus bedfordiae*)

Takahiro Sanada,¹ Takahiro Seto,¹ Yuka Ozaki,¹ Ngonda Saasa,¹ Kumiko Yoshimatsu,² Jiro Arikawa,² Kentaro Yoshii¹ and Hiroaki Kariwa¹

¹Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0818, Japan

²Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0838, Japan

Correspondence

Hiroaki Kariwa

kariwa@vetmed.hokudai.ac.jp

Hantaviruses belong to the family *Bunyaviridae* and are maintained in wild rodents. Although Vero E6 cells, which originate from African green monkey kidney, are used widely in hantavirus research, isolation of hantaviruses from this cell line is difficult. To develop an efficient method of propagation and isolation of hantaviruses we established a novel cell line, MRK101, derived from the kidney of the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus bedfordiae*), the natural host of Hokkaido virus (HOKV). The MRK101 cells showed a significantly higher susceptibility to Puumala virus (PUUV) hosted by *Myodes glareolus* than Vero E6 cells. Viral nucleocapsid protein in PUUV-infected MRK101 cells was detected earlier than in Vero E6 cells, and the viral titre in the culture fluid of MRK101 cells was higher than that of Vero E6 cells during the early phase of infection. In contrast, MRK101 cells showed no susceptibility to Hantaan virus. HOKV, which has not been isolated to date, was isolated successfully using MRK101 cells. Moreover, the newly isolated HOKV was successfully propagated in MRK101, but not Vero E6, cells. Phylogenetic analyses of the S (small), M (medium) and L (large) segment sequences revealed that HOKV is related most closely to PUUV, but is distinct from other hantaviruses. These data suggest that the MRK101 cell line is a useful tool for the isolation and propagation of hantaviruses. Moreover, this is (to our knowledge) the first report of hantavirus isolation in a cell line that originated from the natural host.

Received 15 June 2012

Accepted 11 July 2012

INTRODUCTION

Hantaviruses, members of the family *Bunyaviridae*, have a tri-segmented, negative-stranded RNA genome consisting of small (S), medium (M) and large (L) segments (Plyusnin *et al.*, 1996), which encode nucleocapsid (N) proteins, envelope glycoproteins (Gn and Gc) and an RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), respectively (Plyusnin *et al.*, 1996). Each hantavirus is carried by a specific species in the orders Rodentia and Soricomorpha. For example, Hantaan virus (HTNV), Seoul virus (SEOV), Amur virus (AMRV) and Puumala virus (PUUV) are carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*), Norway rat (*Rattus norvegicus*), Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*) and bank vole (*Myodes glareolus*), respectively (Jonsson *et al.*, 2010). In general, hantaviruses are believed to infect persistently, and are

apathogenic to their reservoir hosts (Gavrilovskaya *et al.*, 1990; Yanagihara *et al.*, 1985). In contrast, hantaviruses when transmitted to humans cause two severe disease syndromes: haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS). HTNV, SEOV, AMRV, Dobrava-Belgrade virus, Saaremaa virus and PUUV have been identified as aetiological agents of HFRS. Sin Nombre virus (SNV), Laguna Negra virus and Andes virus (ANDV) are considered to be the major pathogens associated with HCPS (Bi *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2010).

Hokkaido virus (HOKV) is a hantavirus that is maintained in grey red-backed voles (*Myodes rufocanus bedfordiae*), which are distributed geographically in the northern Palaearctic, extending from northern Fennoscandia through northern Russia and the northern part of Asia (Sheftel & Henttonen, 2008). Although HOKV is related serologically to PUUV, these viruses are distinct genetically (Kariwa *et al.*, 1999). No human disease cases have been reported in association with HOKV. Although HOKV was first identified in 1995 (Kariwa

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the S, M and L segment sequences of HOKV strain Kitahiyama128/2008 and the *cytb* gene sequence of MRK101 cells are AB675463, AB676848, AB712372 and AB712373, respectively.

et al., 1995), little is known about its characteristics due to the inability to isolate this virus.

Several cell-culture systems for the study of hantavirus infection have been reported to date (Ohsawa *et al.*, 1995; Pensiero *et al.*, 1992; Raftery *et al.*, 2002; Yanagihara & Silverman, 1990; Yanagihara *et al.*, 1984). Since it is derived from African green monkey kidney, exhibits a functional type III interferon response but not type I interferon response (Prescott *et al.*, 2010; Stoltz & Klingström, 2010), and is susceptible to hantaviruses, the Vero E6 cell line is used widely in hantavirus research, particularly for their isolation and propagation. However, hantaviruses do not grow well even in Vero E6 cells, and isolation is not always successful (Seto *et al.*, 2011). Therefore, generation of a novel cell line that shows a greater susceptibility to hantaviruses, and from which hantavirus could be isolated easily, is required.

Hantaviruses are known to be associated strongly with their specific rodent hosts (Jonsson *et al.*, 2010). In a previous report, primary kidney cells derived from the bank vole showed a high susceptibility to PUUV (Temonen *et al.*, 1993). Recently, cell lines derived from the bank vole were established and showed PUUV susceptibility (Essbauer *et al.*, 2011; Stoltz *et al.*, 2011). These data suggest that any given hantavirus may propagate efficiently in cells derived from its natural host. Herein, we describe the establishment of a novel cell line derived from a wild rodent species that is a natural host of hantavirus and the isolation of a hantavirus using this cell line.

RESULTS

Cell line derived from the grey red-backed vole

Primary cells derived from the kidney of the grey red-backed vole (*M. rufocanus bedfordiae*), the natural host of HOKV, were cultured in a flask at 37 °C in a 5% CO₂ incubator, and the first subculture was performed after 10 days incubation. From the seventh passage, growth stabilized and the cells were then subcultured continuously with a split rate of 1:3 every 3–5 days. After cloning twice by limiting dilution, the cells were designated the MRK101 cell line. MRK101 cells exhibited a cobblestone morphology, which is typical of epithelial cells (Fig. 1a). The MRK cells had a doubling time of 34.7 h, and their growth plateaued by contact inhibition around 5 days after seeding (Fig. 1b). The morphological and growth characteristics of MRK101 cells did not change during the subsequent ~100 passages. The characteristics of the cells were maintained after freezing and thawing. Tests for contamination with HOKV, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) and mycoplasma were negative. No micro-organisms (i.e. bacteria, fungi and yeasts) were detected, and no cytopathic effect was observed.

To confirm the origin of the MRK101 cell line, the mitochondrial cytochrome *b* (*cytb*) gene was sequenced. The *cytb* sequence of MRK101 cells was highly similar (>99%) to those of grey red-backed voles from Hokkaido, Japan (e.g. GenBank accession no. AB031560).

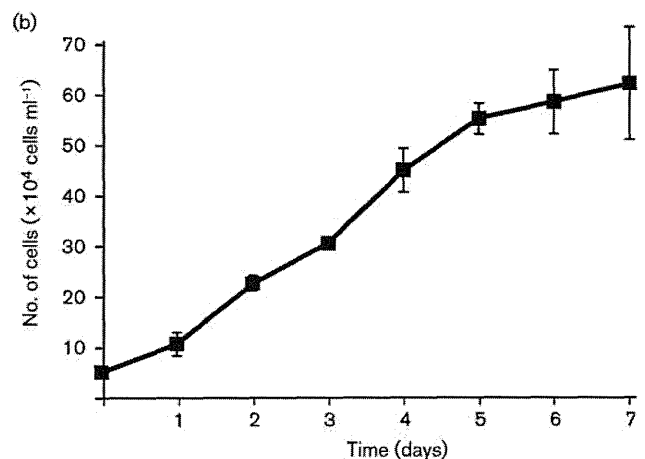
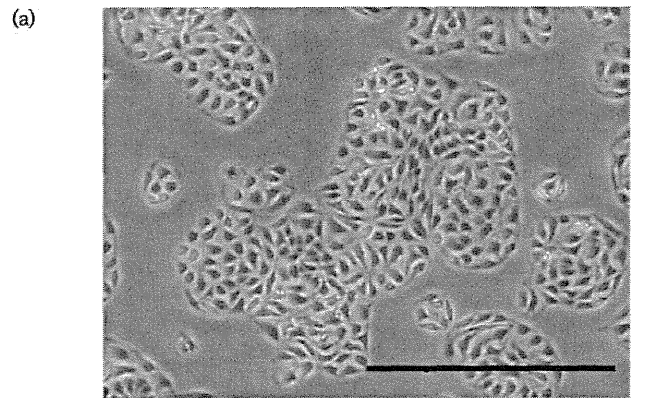


Fig. 1. Morphology and growth curve of MRK101 cells. (a) Epithelial-like morphology of MRK101 cells 72 h after seeding. Bar, 500 μ m. (b) Growth curve of MRK101 cells. Data are shown as means \pm SD of three independent determinations.

Susceptibility of MRK101 cells to hantaviruses

To investigate the susceptibility of MRK101 cells to hantaviruses, both MRK101 and Vero E6 cells, which are commonly used for hantavirus research, were infected with an identical infectious dose of various hantaviruses. The focus number of PUUV strains in MRK101 cells was about three times greater than those in Vero E6 cells, with the exception of the DTK/Ufa-97 strain (Fig. 2). The infectivity of the PUUV DTK/Ufa-97 strain and SEOV in MRK101 cells was identical to that in Vero E6 cells. In contrast, the susceptibility of MRK101 cells to AMRV infection was notably lower than that of Vero E6 cells. The number of AMRV foci in MRK101 cells was approximately one-twentieth of that in Vero E6 cells. No HTNV foci were observed in MRK101 cells.

Replication of hantaviruses in the MRK101 cell line

To assess the propagation of hantaviruses in MRK101 and Vero E6 cells, we evaluated the expression of hantavirus N protein in infected cells by Western blotting and

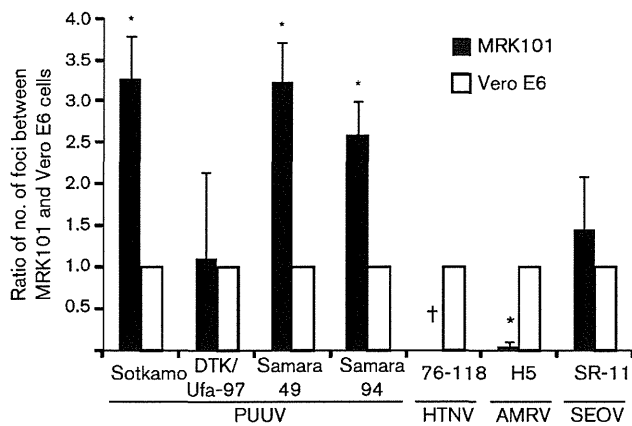


Fig. 2. Susceptibility of MRK101 and Vero E6 cells to each hantavirus. Both cell lines were infected with an identical hantavirus dose and the number of foci were compared. *Significant differences in focus number between MRK101 and Vero E6 cells ($P < 0.05$); †no virus-specific foci were observed in HTNV-infected MRK101 cells.

determined the viral titre in culture fluid using a focus-forming assay. Viral N protein in MRK101 cells infected with the PUUV Sotkamo strain was initially detected at 5 days post-inoculation (p.i.) (Fig. 3a). In contrast, no PUUV antigens were detected in infected Vero E6 cells during the experimental period. Viral titres in the culture fluid of MRK101 cells were higher than that in Vero E6 cell culture fluid during the early phase of infection (Fig. 3b). At 14 days p.i., the viral titre of MRK101 cell fluid was similar to that of Vero E6 cell culture fluid. The PUUV Samara_94/CG/2005 strain showed a tendency identical to that of the PUUV Sotkamo strain (Fig. 3c, d); viral antigens in infected MRK101 cells were detected from 5 days p.i. Viral N proteins were detected in infected Vero E6 cells beginning at 10 days p.i. Viral N proteins were detected from 5 days p.i. in the culture fluid of Vero E6 cells infected with the HTNV 76-118 strain (Fig. 3e). Viral titres in the culture fluid of infected Vero E6 cells increased over time and peaked at 7 days p.i. (Fig. 3f). In contrast, neither viral antigens nor culture-fluid virus were detected in MRK101 cells infected with HTNV. In contrast to HTNV, the propagation of the SEOV SR-11 strain in MRK101 and Vero E6 cells were similar (Fig. 3g, h). Viral N proteins in both MRK101 and Vero E6 cells were detected from 5 and 7 days p.i., respectively. Viral titres in the culture fluid of both MRK101 and Vero E6 cells increased gradually and plateaued at 7 days p.i. The peak titre of culture fluid of MRK101 cells was slightly lower than that of Vero E6 cells.

Isolation of HOKV using MRK101 cells

Since MRK101 cells showed a high susceptibility to PUUV, we attempted to isolate HOKV using MRK101 cells. RT-PCR-positive lung homogenates from grey red-backed

voles trapped in 2008 were inoculated into suckling Syrian hamsters for propagation of HOKV. At 15 days p.i., the lungs and kidneys of inoculated hamsters were collected and used to inoculate MRK101 and Vero E6 cells. The hantaviral genome and characteristic intracytoplasmic granular fluorescence were detected in MRK101 cells beginning at 14 days p.i. (Fig. 4a, b). Infectious virus was recovered from MRK101 cells and designated Kitahiyama128/2008 (Kitahiyama128). In contrast, virus isolation using Vero E6 cells was unsuccessful. Although viral genome was detected beginning at 14 days p.i. (Fig. 4a) and continuously detected until 84 days p.i., no virus-specific intracytoplasmic fluorescence or infectious virus was detected in Vero E6 cells until 112 days p.i.

Growth of HOKV in MRK101 cells

To assess the growth of HOKV, the HOKV Kitahiyama128 strain was inoculated into MRK101 and Vero E6 cells, and the expression of the viral N protein and the titres of progeny virus were determined. In MRK101 cells, the expression of N protein was confirmed at 14 days p.i. (Fig. 5a). The level of progeny virus increased gradually until 14 days p.i. (Fig. 5b). No cytopathic effect was observed in HOKV-infected MRK101 cells. In contrast, propagation of HOKV in Vero E6 cells was unsuccessful; expression of neither N protein nor infectious virus was detected (Fig. 5a, b).

Genetic analysis of HOKV

The full-length sequences of the S, M and L segments of the HOKV Kitahiyama128 strain were determined. The full-length S segment was 1832 nt with 42 nt 5' and 488 nt 3' non-coding regions and was found to encode an N protein of 433 aa. The S segment sequence of this isolated HOKV was almost identical to previously reported HOKVs (97–98.7% nucleotide and 99.8–100% amino acid identity) (Table 1). HOKV was the most closely related to PUUV (81.9–83.8% nucleotide and 94.7–95.8% amino acid identity). The complete sequence of the HOKV M segment was determined to be 3682 nt with 40 nt 5' and 195 nt 3' non-coding regions, and was found to encode a precursor glycoprotein of 1148 aa. The pentapeptide motif (WAASA) previously identified as the cleavage site of the glycoprotein precursor was conserved at aa 654–658. The HOKV glycoprotein contains five potential N-glycosylation sites, three of which are in Gn (aa 142, 357 and 409), and two are in Gc (aa 898 and 937). Of the hantavirus genome segments, the nucleotide sequence of the M segment showed the greatest variation. In terms of the M segment sequence, the most closely related virus to HOKV was PUUV, with nucleotide and amino acid identities of 78.1–79.9% and 90.6–91.6%, respectively. The full-length L segment comprised 6547 nt with 37 nt 5' and 43 nt 3' non-coding regions, and was found to code for an RdRP of 2156 aa. The pattern of genetic identities of the L segment between HOKV and other hantaviruses was similar to those of the S segment.

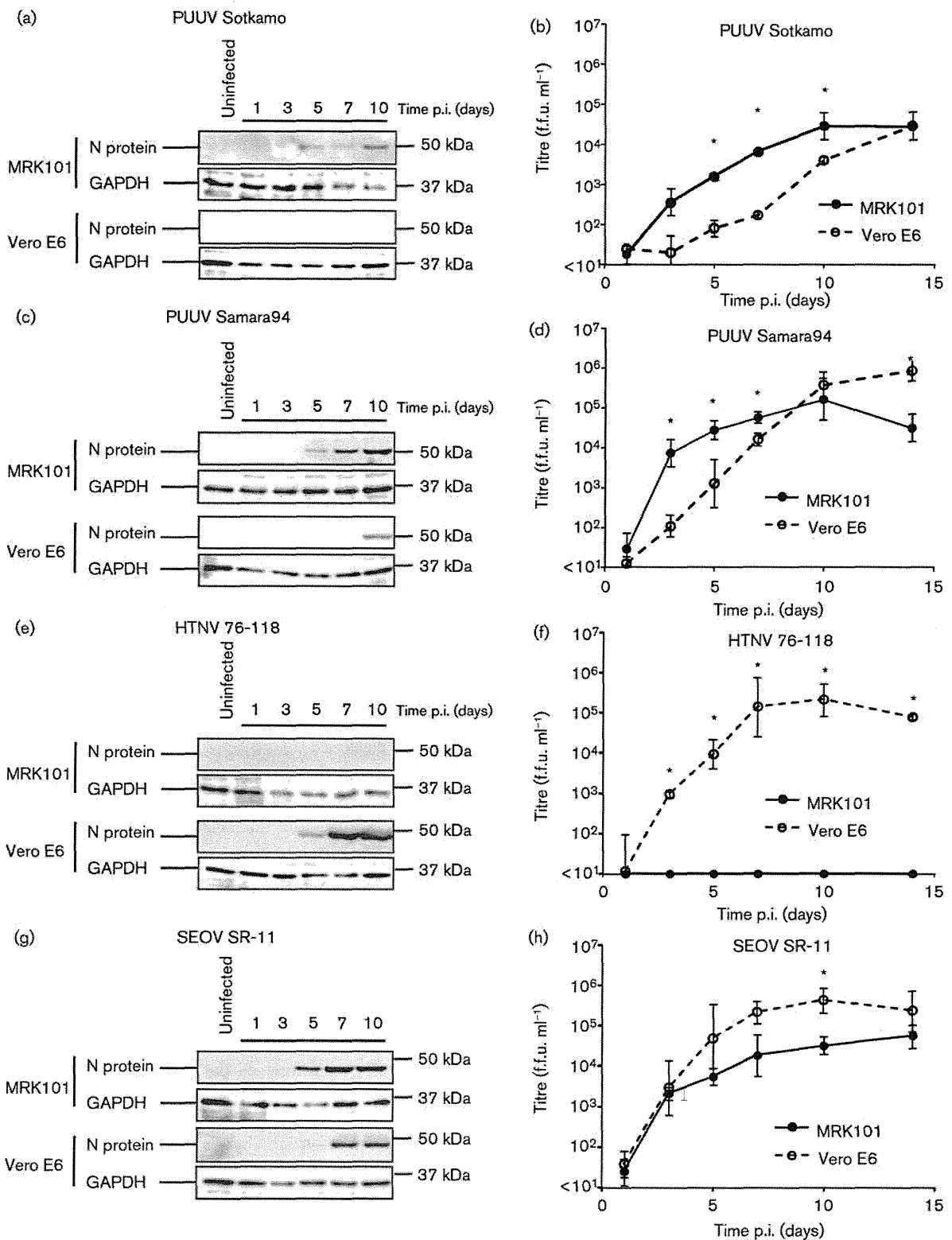


Fig. 3. Expression of hantavirus N protein in infected MRK101 and Vero E6 cells, and virus titres in culture fluid. MRK101 and Vero E6 cells were infected with the PUUV Sotkamo strain (a, b), Samara_94/CG/2005 strain (c, d), HTNV 76-118 strain (e, f) or SEOV SR-11 strain (g, h) (0.001 m.o.i.). Expression of viral protein and GAPDH in infected cells at each time point were evaluated by Western blotting (a, c, e, g). Virus titres in culture fluid, expressed as focus-forming units (f.f.u.) ml⁻¹, at each time point were determined by a focus-forming assay (b, d, f, h). The culture medium was changed at 7 days p.i. Error bars represent SD; *significant differences between MRK101 and Vero E6 cells ($P < 0.05$).