

1. 日本と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの 系統解析と病原性

高島郁夫, 早坂大輔, 後藤明子, 好井健太郎, 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科・環境獣医科学講座公衆衛生学教室

北海道と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの系統解析の結果, 北海道株は極東地区において数百年前に出現したと推定された. イルクーツク地区のダニ媒介性脳炎ウイルスはシベリア亜型と同定された. ダニ媒介性脳炎ウイルスのBHK細胞適応変異株はマウスにおける神経侵襲性毒力が低下していた. 変異株はエンベロップ蛋白に1ヶ所のアミノ酸置換があり, 荷電が陽性に变化する変異であった. 変異株はウイルス血症と脾臓でのウイルス価が親株に比べ低下していた. ダニ媒介性脳炎ウイルスの感染性cDNAクローンの作製に成功し, 神経毒力の解析を行った. エンベロップ蛋白の1ヶ所とNs5の2ヶ所のアミノ酸変異が相乗的に神経毒力の低下に関与していた.

1. はじめに

ダニ媒介性脳炎はフラビウイルスによる人獣共通感染症でマダニ科Ixodidaeに属する各種のマダニにより伝播される. ダニ媒介性脳炎には致死率30%にも及ぶロシア春夏脳炎と比較的軽症で経過する中央ヨーロッパダニ媒介性脳炎が存在する^{2, 16)}. これまでわが国では長い間ダニ媒介性脳炎の発生報告はなかったが, 1993年北海道で本症の患者が発見され, 原因ウイルスをイヌ, ノネズミおよびマダニより分離した¹⁷⁻¹⁹⁾. ロシアでは, 毎年10,000人前後の本病の流行が報告されている(表1). 我々はこれまで極東ロシアにおいて疫学調査を実施し, ダニ媒介性脳炎ウイルスを分離した. ここではまず日本と極東ロシアのTBEウイルスの系統解析の成績を紹介する. さらに日本のダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性について, 弱毒変異株および感染性cDNAクローンを用いて解析した成績について紹介する.

2. 日本と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの 系統解析

北海道のダニ媒介性脳炎ウイルス株の起源を推定するために, 極東ハバロフスクにおいてマダニ類を採集してウイルス分離を試み, ウイルスの系統解析を実施した. 1998年にハバロフスク地区で採集した550匹のシュルツェマダニから5株のウイルスを分離した⁷⁾. これらの株と北海道分離株のE-タンパク遺伝子の塩基配列を決定し, すでに公表済みのダニ媒介性フラビウイルス各株の塩基配列と比較し, 系統樹を作成した(図1)^{4, 7, 14)}. 北海道株(Oshima 5-11, I-1, 3-6, 5-10, C-1, A-1)はSofjin株とハバロフスク株(KH98-2, 98-10, 98-5)とともに極東型ウイルスとして同一のクラスターを形成した. 次に極東型ウイルス各株の同義置換距離をもとに系統樹を作成した(図2). これらの株の平均同義置換率を計算したところ, 2.9×10^{-4} となった. この平均同義置換率と同義置換距離をもとに北海道株とハバロフスク株の分岐の年代を計算したところ, これらの株は約260~430年前に分岐したと推定された. 従ってダニ媒介性脳炎ウイルス北海道株は極東地区において数百年前に出現したと推定された⁸⁾.

次に近年, シベリア地区に系統樹解析による極東型とヨーロッパ型に加え, 第3の亜型のダニ媒介性脳炎の存在が示唆された. そこでイルクーツク周辺において, マダニを採集しウイルス分離を試みた. 新たに6株のダニ媒介性脳炎ウイルスを, シュルツェマダニ(*I.persulcatus*)から分

連絡先

〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目

TEL : 011-706-5211

FAX : 011-706-5211

E-mail : takasima@vetmed.hokudai.ac.jp

表1 1992年～2001年のダニ媒介脳炎患者発生状況

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
オーストリア	84	102	178	109	128	99	62	41	60	51
ドイツ	142	118	306	204	109	168	130	82	155	
エストニア	163	166	177	175	177	403	387		272	
ラトビア	287	791	1366	1341	736	884	1037	352	544	303
リトアニア	17	198	284	426	310	646	584		419	
ポーランド	8	241	181	267	259	200				
ロシア	6301	7520	5593	5982	10298	6702	7520	9955	5931	6399
スウェーデン	83	51	116	68	45	76				
フィンランド	14	25	16	23		20	17			
スイス	66	44	97	60	62	123	68			
スロベニア	210	194	492	260	406	269	136			
クロアチア	27	76	87	91	57	25	32			
チェコ	337	629	619	743	571	415	422	490	7191	623
スロバキア	13	50	58	89	93	77				
ハンガリー	206	329	278	240	253	107	84	51		
イタリー		3	2	5	3		6			
フランス	3	5	4	7	1	1				

表2 研究に使用された極東とシベリア地区からのダニ媒介性脳炎ウイルス

Strain	Year of isolation	Geographical origin	Source	Accession no.	
				Envelope	3'-NCR
VL99-m11	1999	Vladiostok	<i>I. persulcatus</i>	AB049345	AB049393
KH99-m9	1999	Khabarovsk	<i>I. persulcatus</i>	AB049346	—
D1283	1998	Khabarovsk	Human brain	AB049347	—
IR99-1m1	1999	Irkutsk (1)*	<i>I. persulcatus</i>	AB049348	AB049397
IR99-1m4	1999	Irkutsk (1)	<i>I. persulcatus</i>	AB049349	AB049398
IR99-2m3	1999	Irkutsk (2)	<i>I. persulcatus</i>	AB049350	—
IR99-2m7	1999	Irkutsk (2)	<i>I. persulcatus</i>	AB049351	AB049399
IR99-2f7	1999	Irkutsk (2)	<i>I. persulcatus</i>	AB049352	—
IR99-2f13	1999	Irkutsk (2)	<i>I. persulcatus</i>	AB049353	AB049400
Oshima 5-10	1995	Oshima	Dog blood	AB001026	AB049390
Oshima I-1	1996	Oshima	<i>I. ovatus</i>	AB022292	AB049391
Oshima A-1	1995	Oshima	<i>A. speciosus</i>	AB022293	AB049392
KH98-2	1998	Khabarovsk	<i>I. persulcatus</i>	AB022295	AB049394
KH98-5	1998	Khabarovsk	<i>I. persulcatus</i>	AB022296	AB049395
KH98-10	1998	Khabarovsk	<i>I. persulcatus</i>	AB022297	AB049396
Sofjin-HO	1937	Primorsky	Human brain	AB022703	AB049401

()*: Virus isolation point number

離し、エンベロープタンパク遺伝子の系統解析を行った(表2)。エンベロープタンパク遺伝子の塩基配列に基づく系統樹が図3に示されている。系統樹の分岐パターンは、ダニ媒介性脳炎ウイルスの4つのクラスターすなわち、ヨーロッパ亜型、極東亜型、シベリア亜型の3つのダニ媒介性脳炎ウイルスと跳躍病(louping ill)ウイルスに分かれた。ウラジオストックとハバロフスクから新たに分離された株(VL99-m11, KH99-m9とD1283)はOshima株とSofjin株のように、極東亜型と同定されたウイルス株と同一のクラスターを形成した。従ってこれらの分離株はダニ

媒介性脳炎ウイルス極東亜型と分離された。しかし、イルクーツク地区からの分離株はVasilchenko株(シベリア亜型のプロトタイプ)とAina株とクラスターを形成した。従ってこれらの株はシベリア亜型のダニ媒介性脳炎ウイルスと同定された。これらのシベリア亜型のウイルス株は極東亜型とヨーロッパ亜型のウイルスと区別されたが、これらシベリア分離株はヨーロッパ亜型よりは極東亜型により近縁であった。

マウスモデルを用いてイルクーツク分離株(IR99-2f7と-2f13)と極東株(VL99-m11, D1283, KH98-5, Ohima5-10)

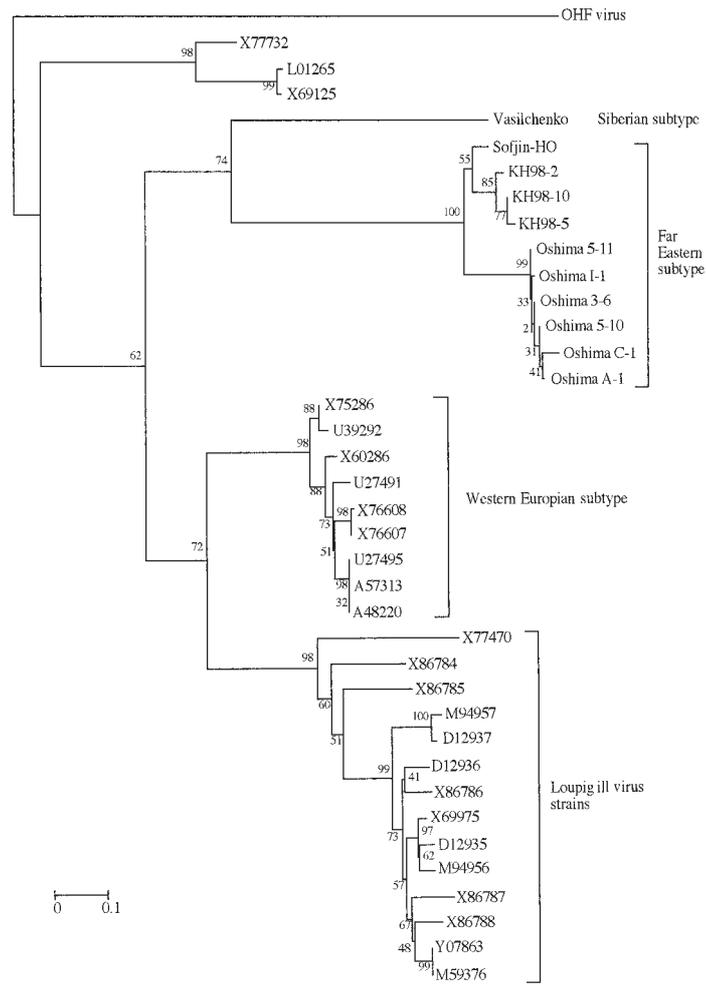


図1 極東亜型、シベリア亜型、西欧亜型ダニ媒介性脳炎ウイルスと跳躍病ウイルスを含めた系統樹

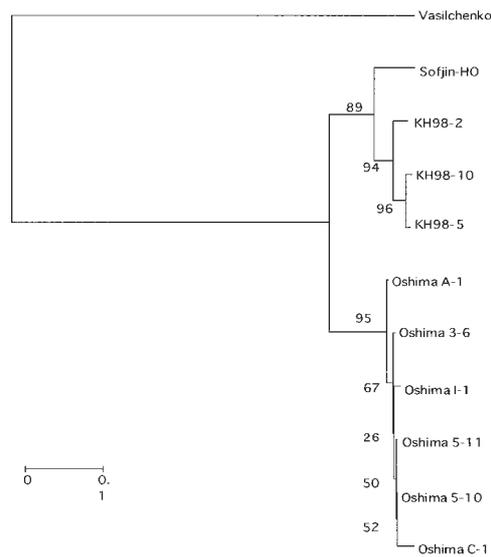


図2 北海道と極東ロシアで分離された極東型ダニ媒介性脳炎ウイルス株の系統樹

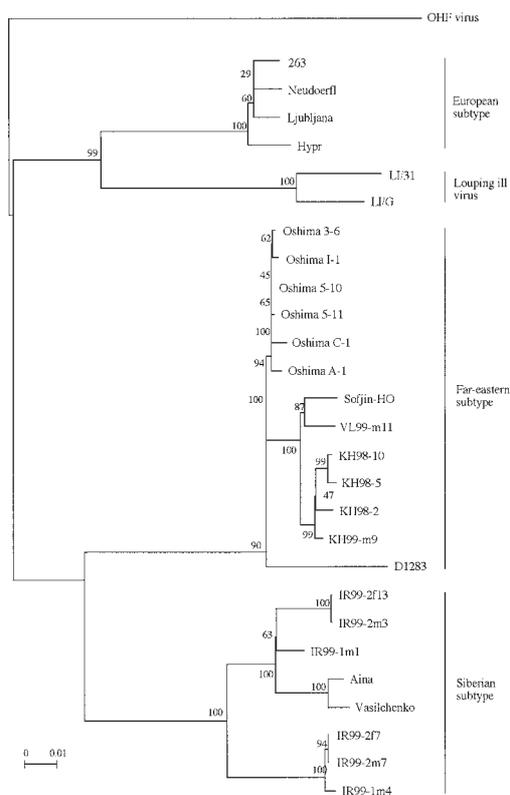


図3 各種ダニ媒介性脳炎ウイルス株とイルクーツク株の系統樹の比較

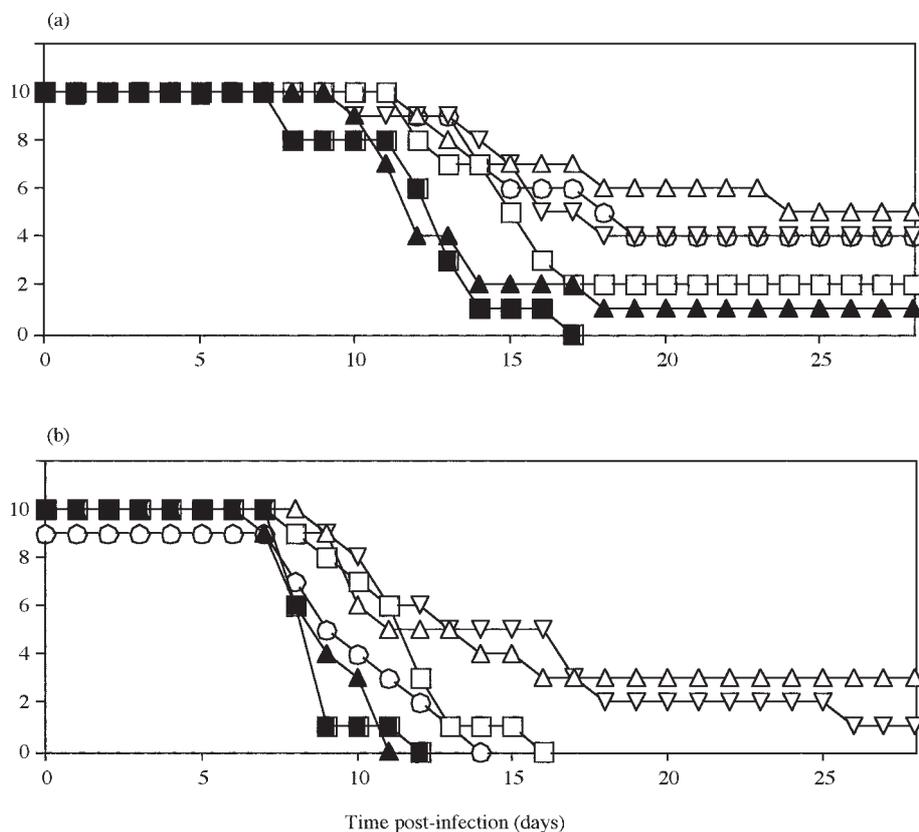


図4 ダニ媒介性脳炎ウイルス株接種後のマウスの生存 (a)1000FFUのウイルスを皮下接種, (b)10FFUのウイルスを脳内接種, IR99-2f7(■), IR99-2f13(▲), VL99-m11(□), KH98-5(△), D1283(▽), Oshima 5-10(○)

の病原性を比較した (図 4). 神経侵襲性毒力を調べるために, 1,000FFU のウイルスをマウスへ皮下接種し, 28 日間生存率を記録した (図 4a). これらのウイルス株は異なる神経侵襲性を示した. 接種後, 生存率は IR99-2f7 の 0%, IR99-2f13 の 10%, VL99-m11 の 20%, D1283 と Oshima5-10 の 40%, KH98-5 の 50% であった. イルクーツク分離株を接種したマウスは極東株接種マウスより 3~5 日間早く死亡した. これらのウイルス株の神経毒力を調べるために, 各ウイルス株の 10FFU を脳内接種して, マウスの生存率を比較した (図 4b). IR99-2f7, IR99-2f13, VL99-m11, Oshima5-10 株接種マウスはすべて死亡した. しかし IR99-2f7 と IR99-2f13 接種マウスは VL99-m11 または Oshima5-10 接種マウスより約 2~5 日早く死亡した. D1283 と KH98-5 接種マウスは各々 10%, 20% 生存した. これらの成績はイルクーツクに分布するダニ媒介性脳炎ウイルスは極東地区に分布するウイルスと比べ同等かまたはより強い毒力を持つことを示している.

3. 培養細胞に適応したダニ媒介性ウイルス変異株の病原性

ダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima5-10 株を BHK 細胞に継

代したところ, 大きなプラックを形成する培養細胞適応変異株が得られた (図 5a)⁵⁾. この BHK 細胞適応変異株 Oshima CI-1 株についてマウスにおける病原性と他の生物的性状および遺伝子性状を調べた. Oshima 5-10 株と Oshima CI-1 株 BHK 細胞での増殖を比較した. Oshima CI-1 株の培養上清におけるウイルス力価は 9 時間後に増加したが, Oshima5-10 株の力価は 9 時間目まで低く, 12 時間後に増加したが Oshima CI-1 の 1/100 であった (図 5b). この結果は変異株 Oshima CI-1 は親株 Oshima5-10 より迅速に増殖することを示す.

ウイルスの神経侵襲性毒力の程度を, マウスの皮下接種の系で調べた. 神経毒力の程度を評価するため, マウスへの脳内接種も実施した. 各ウイルスを 10,000FFU マウスへ皮下接種したところ, 2 株の間に神経侵襲性毒力に有意な違いがあることが明らかになった (図 6a). Oshima CI-1 株接種マウスは 80% 生存したのに比べ, Oshima 5-10 株では 30% のマウスが生存した. 一方 2 株のウイルスの神経毒力のレベルは 10FFU のウイルスを神経内接種により調べた (図 6b). 両株の間には有意の差は見られなかった. これらの成績から Oshima CI-1 株の神経侵襲性毒力の程度は Oshima5-10 株より有意に低かったが, 神経毒力のレベルは

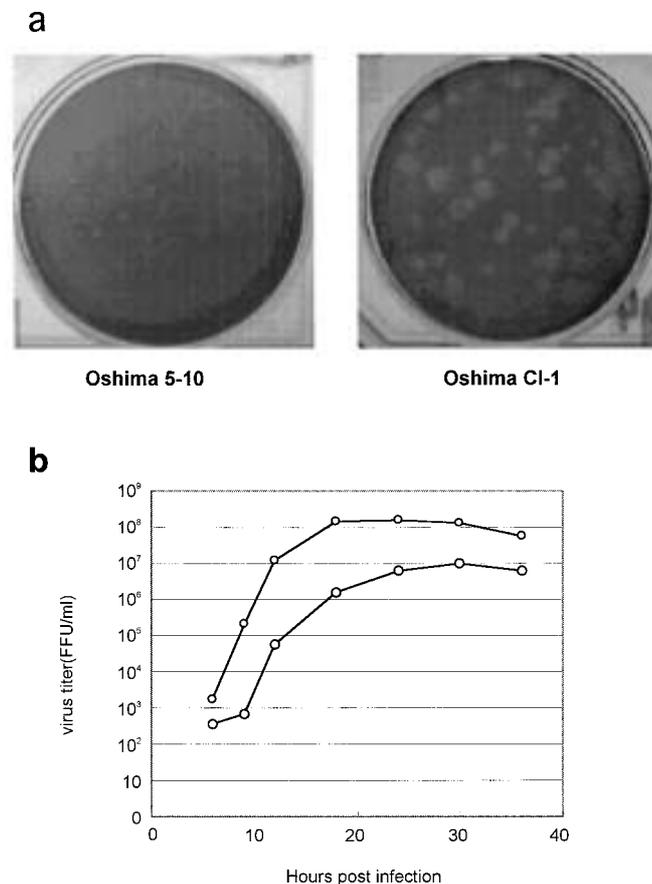


図 5 BHK-21 培養細胞におけるダニ媒介性ウイルスの増殖 (a) Oshima5-10 と Oshima CI-1 感染 120 時間後の BHK-21 細胞上でのプラックの形態 (b) BHK-21 細胞でのウイルス増殖曲線, MOI1FFU の Oshima CI-1 (●) または Oshima 5-10 (○) を感染させた。

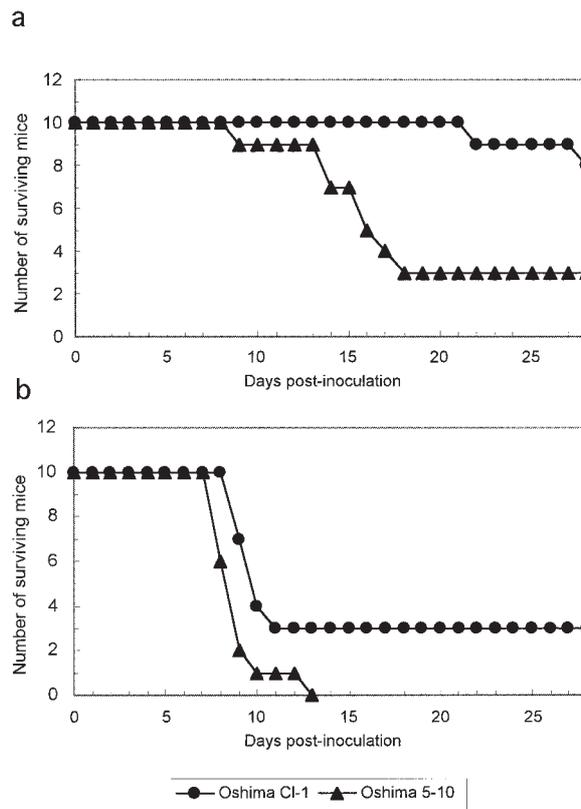


図6 ダニ媒介性脳炎ウイルス接種後のマウスの生存(a)10,000FFUのウイルスを皮下接種(b)10FFUのウイルスを脳内接種, Oshima CI-1(●), Oshima 5-10(▲)

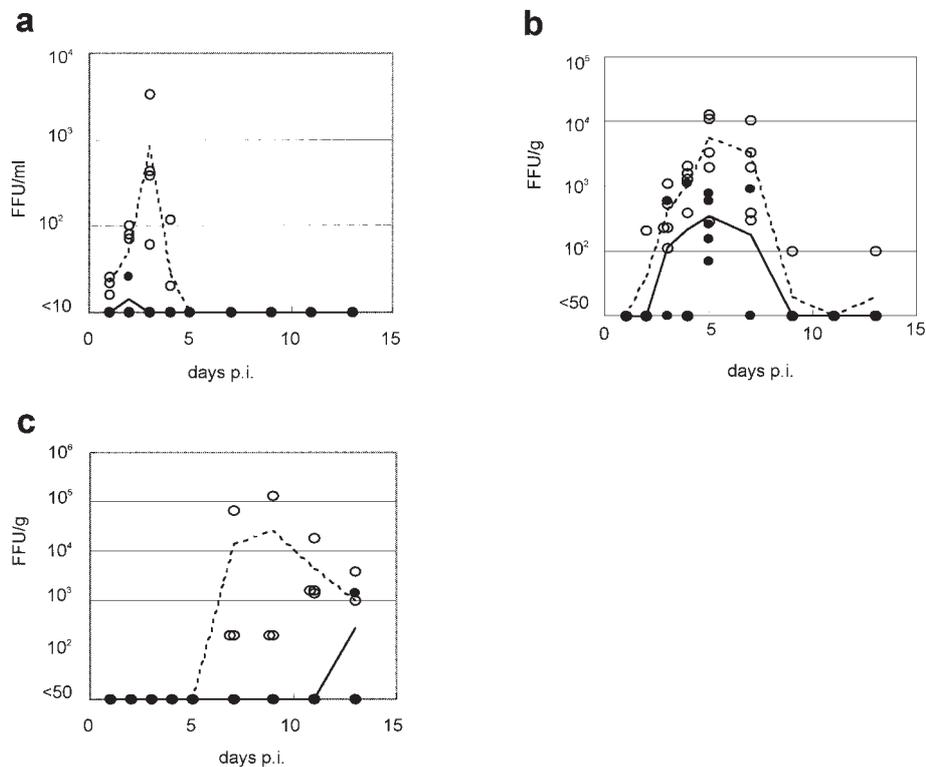


図7 マウスの血液と組織におけるダニ媒介性脳炎ウイルスカ価の推移, (a)血液, (b)脾臓, (c)脳, Oshima CI-1(●—●), Oshima 5-10(○----○)

両株で差がなかったことが示された。

Oshima Cl-1 の低い神経侵襲性毒力が末梢組織におけるウイルスの増殖または拡散が低下し脳内へのウイルス侵入の低下に原因した可能性がある。この点を調査するために、血液、脳および脾臓におけるウイルス増殖のレベルを両ウイルス株を皮下接種したマウスにおいて比較した (図 7)。Oshima 5-10 接種後、ウイルス血症は接種後 1 日目に検出され、3 日後にピーク (1×10^3 FFU/ml) に達し、徐々に減少し 5 日目には検出できなくなった (図 7a)。脾臓においてはウイルスは 2 日目に検出され、5 日目に 5×10^3 FFU/g のピーク値に達した (図 7b)。脳ではウイルスは 7 日目に最初に検出され、9 日目にピークの 2×10^4 FFU/g に達した (図 7c)。他方、Oshima Cl-1 接種後、ウイルス血症は 2 日目に検出され (60 FFU/ml)、その後減少し、3 日目には検出できなかった (図 7a)。脾臓ではウイルスは 3 日目に最初に検出され、5 日目にピーク (5×10^2 FFU/g) に達した。9 日目に脾臓ではウイルスは検出できなかった。脳においてはウイルスは 11 日目まで検出されず (図 7c)、観察期間中、マウスは臨床的な脳炎症状を示さなかった。まとめると、脾臓と血液での Oshima Cl-1 のウイルス増殖は Oshima 5-10 より低く、さらに脳でのウイルス増殖は、Oshima 5-10 は 7 日目に検出されたが、Oshima Cl-1 ではほとんど認められなかった。

塩基配列の比較では、Oshima Cl-1 は Oshima 5-10 と比べ 3 つの塩基と 2 つのアミノ酸の置換があった。2 つのアミノ酸の置換の 1 つは、NS5 タンパクで検出されたが、タンパクの荷電や極性に影響しない変化であった²⁰⁾。しかし他の置換は、E タンパクにあり、Oshima Cl-1 の E タンパクの陽性電荷を増加させた。この置換は E タンパクのドメイン II に位置しており¹⁵⁾、以前の研究でこのドメインの変異は膜融合と赤血球凝集性に影響することが示されていた^{3,10)}。

特定の培養細胞へのウイルスの適応は、グリコサアミノグルカン (GAGs) へ高い親和性を持つ変異株を選択し、それらの変異株のいくつかは、動物における毒力の低下を来す^{1, 11, 13)}。そこで、2 株のウイルスの GAGs への親和性を比較するために、異なる GAGs のウイルス感染性の抑制効果を調べた。Oshima 5-10 の BHK-21 細胞への感染性は GAGs によりほとんど阻止されなかった (図 8a)。対照的に Oshima Cl-1 の感染性は、試験されたすべての GAGs により抑制され、その抑制は用量依存的であった (図 8b)。

これらの成績はウイルス E タンパクのアミノ酸の置換が、マウスモデルでの神経侵襲性の低下を来したことを示している。その変異によりウイルス血症と末梢でのウイルス増殖が低下し、ウイルスが脳内に侵入できなかったと考えられた。この E タンパクの変異により、ウイルスタンパクの

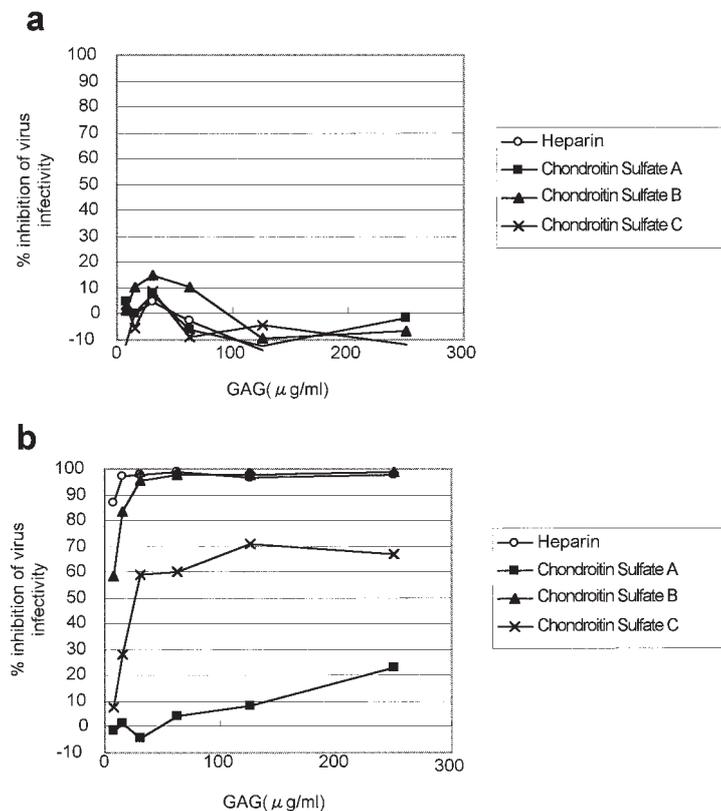


図 8 GAGs による Oshima 5-10 (a) と Oshima Cl-1 (b) の感染阻止

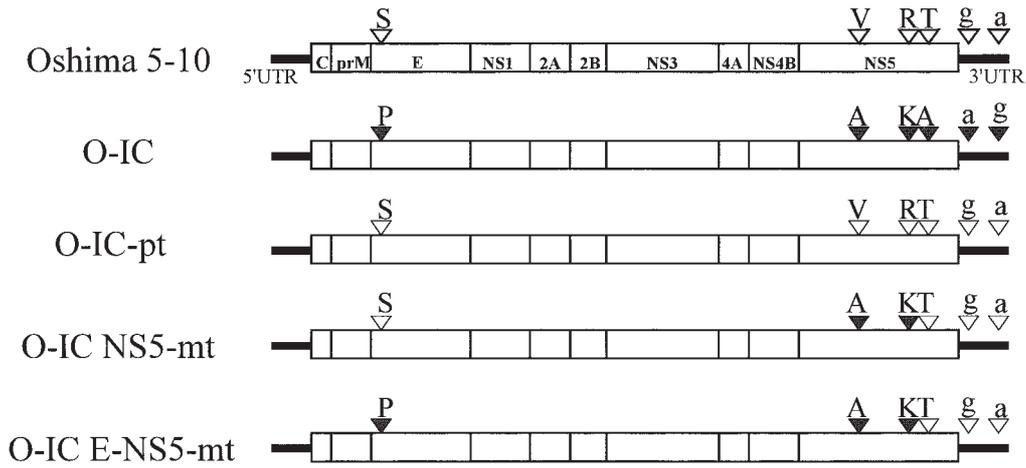


図9 親株と cDNA クローン由来ウイルスの amino 酸の置換▽は親株の amino 酸または塩基, ▼は O-IC の amino 酸または塩基

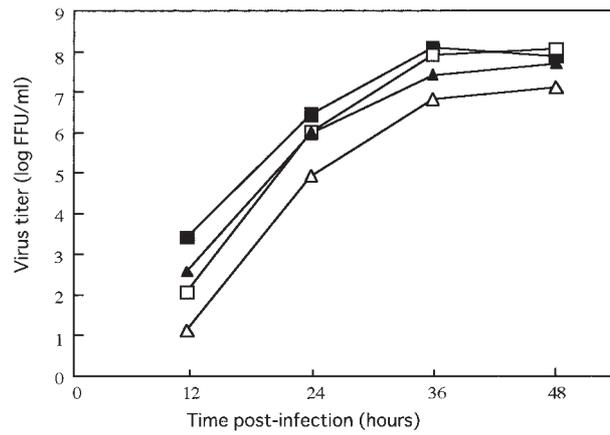


図10 BHK 細胞における親株 Oshima 5-10 と cDNA クローン由来ウイルスの増殖曲線の比較
親株 Oshima 5-10(■), O-IC NS5-mt(▲)
O-IC-E-NS5-mt(△), O-IC-pt(□)

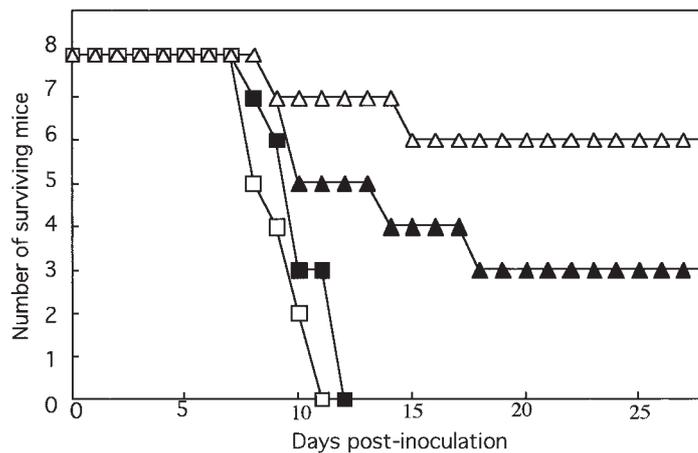


図11 50FFU 脳内接種マウスにおける生存。
親株 Oshima 5-10(■), O-IC NS5-mt(▲)
O-IC-E-NS5-mt(△), O-IC-pt(□)

陽性電荷の程度が増加し、動物体内に一般的に分布する GAGs によりウイルスが捕捉されウイルスの末梢での増殖が低下したためと推定された。

4. 感染性 cDNA クローンを用いた ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性の解析

ダニ媒介性脳炎ウイルスの感染性 cDNA クローンについて、ヨーロッパ亜型の Neudoerfl 株と Hypr 株およびシベリア亜型の Vasilchenko 株についての報告がある^{6, 12)}。そこで極東亜型のダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima5-10 株について感染性 cDNA クローンを作出し、病原性の解析に用いた。

Oshima 5-10 株の感染性 cDNA クローンの作出は、long high-fidelity RT-PCR と one-step cloning 法により実施した⁹⁾。最初に得られた感染性 cDNA クローン O-IC は構造タンパクに 4ヶ所のアミノ酸置換と、3' UTR に 2ヶ所の塩基置換を有していた。構造タンパクのアミノ酸置換は E-タンパクに 1ヶ所、Ns5 タンパクに 3ヶ所存在した(図 9)。このアミノ酸と塩基の置換を親株に部分的修復した種々のクローンおよびすべて親株に修復した O-IC-pt を作成した(図 9)。

これらのクローンからウイルスを回収し、BHK 細胞における増殖を比較した(図 10)。親株 Oshima 5-10 と遺伝的に同一の O-IC-pt ウイルスの間に感染後 12 時間で、ウイルス産生量に有意な違いが存在した。これは親株ウイルスストックの集団中に quasi-species の存在によるためかも知れない。4 株のうちで E-タンパクに置換のある P₄₀A₃₇₈K₆₇₄T₇₉₄ (O-IC E-NS5-mt) が他の株に比べウイルス産生が低下していた。

次にこれら 4 株のウイルスのマウスの神経毒力について調べた(図 11)。50FFU のウイルスをマウスの脳内に接種後、親株 Oshima 5-10 と親株と遺伝的に同一の O-IC-pt は、接種後に 12 日以内に 100% の致死率を示した。対照的に O-IC-pt ウイルスと Ns5 遺伝子の 2ヶ所を異にする S₄₀A₃₇₈K₆₇₄T₉₉₄ (O-ICNS5-mt) ウイルスは神経毒力が低下しており、18 日目に 62.5% のマウスを死亡させた。S₄₀A₃₇₈K₆₇₄T₉₉₄ ウイルスと E-タンパクの 1ヶ所のアミノ酸が異なる P₄₀A₃₇₈K₆₇₄T₉₉₄ (O-ICE-NS5-mt) は、最も低い神経毒力を示し、25% のマウスを死亡させた。これらの成績は E タンパクの S40 → P への置換と Hs5-V₃₇₈ → A と Ns5-R₆₇₄ → K への置換が相乗的にウイルスの神経毒力の低下に影響していることを示している。

5. おわりに

ダニ媒介性脳炎の患者数はヨーロッパ諸国とロシアを中心に毎年 10,000 人前後報告されている。ヨーロッパではダニ媒介性脳炎の予防のためワクチン接種を実施している国が多い。毎年 400 万人以上の日本人旅行者がヨーロッパを訪問している。これらの日本人へヨーロッパにおけるダニ

媒介性脳炎の流行情報を正確に提供するとともに、ダニが多数生息する森林や農村地帯に滞在するハイリスクグループの人々にはワクチンの実用化が望まれる。

引用文献

- 1) Bernard KA, Klimstra WB, Johnston RE.: Mutations in the E2 glycoprotein of Venezuelan equine encephalitis virus confer heparan sulfate interaction, low morbidity, and rapid clearance from flood of mice. *Viriligy* 276: 93-103, 2000.
- 2) Calisher C, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE.: Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 30: 37-43, 1989.
- 3) Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM.: Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol* 44: 649-688, 1990.
- 4) Gojobori T, Moriyama EN, Kimura M.: Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Pro Nat Acad Sci* 87: 10015-10018, 1980.
- 5) Goto A, Hayasaka D, Yoshii K, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I.: A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness. *Vaccine* 21: 4043-4051, 2003.
- 6) Gritsun TS, Gould EA.: Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. *J Virol Methods* 76: 109-120, 1998.
- 7) Hayasaka D, Suzuki K, Kariwa H, Ivanov L, Volkov V, Demenev V, Mizutani T, Gojobori T, Takashima I.: Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia. *J Gen Virol* 80: 3127-3135, 1999.
- 8) Hayasaka D, Ivanov L, Leonova GN, Goto A, Yoshii K, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I.: Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *J Gen Virol* 82: 1319-1328, 2001.
- 9) Hayasaka D, Gritsun TS, Yoshii K, Ueki T, Goto A, Mizutani T, Kariwa H, Iwasaki T, Gould EA, Takashima I.: Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 85: 1007-1018, 2004.
- 10) Holzmann H, Stiasny K, Echer M, Kung C, Heinz FX.: Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice. *J Gen Virol* 78: 31-37, 1997.
- 11) Lee E, Lobigs M.: Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry. *J Virol* 74: 8867-8875, 2000.
- 12) Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Kunz C, Heinz FX.: Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl

- and high virulence strain Hypr. *J Gen Virol* 78: 1049-1057, 1997.
- 13) Mandl CW, Kroschewski H, Allisan SL, Kofler R, Holzmann H, Meixner T.: Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. *J Virol* 75: 5627-5637, 2001.
 - 14) Nei M, Gojobori T.: Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3: 418-426, 1986.
 - 15) Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC.: The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375: 291-298, 1995.
 - 16) Shope RE.: Medical significance of togaviruses: an overview of diseases caused by togaviruses in man and domestic and wild vertebrate animals. PP 47-82 [Schlesinger, R.W. ed] In the togaviruses. Academic Press, New York, 1980.
 - 17) Takashima I, Morita K, Chiba M, Hayasaka D, Sato T, Takezawa C, Igarashi A, Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Hashimoto N.: A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J Clin Microbiol* 35: 1943-1947, 1997.
 - 18) Takeda T, Ito T, Osada M, Takahashi K, Takashima I.: Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepidemiological survey in Hokkaido, Japan. *Am. J Trop Med Hyg*, 60: 287-291 1999.
 - 19) Takeda T, Ito T, Chiba M, Takahashi K, Niioka T, Takashima I.: Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan. *J Med Entomol* 35: 227-231, 1998.
 - 20) Wallner G, Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Stiasny K, Kunz C.: Characterization and complete genome sequences of high- and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 77: 1035-1042, 1996.

Phylogenetic analysis and pathogenicity of tick-borne encephalitis virus from Japan and far-east Russia

Ikuo Takashima, Daisuke Hayasaka, Akiko Goto, Kentarou Yoshii, Hiroaki Kariwa.

Laboratory of Public Health, Department of Environmental Veterinary Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita-18, Nishi-9, Kitaku, Sapporo 060-0818, Japan

Phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis (TBE) virus revealed that Hokkaido strain of TBE virus evolved several hundreds years ago in far-east Russia. TBE virus strains in Irkutsk area were identified as Siberian subtype of TBE virus. BHK-cell adapted mutant of TBE virus showed lower neuro-invasive virulence in mice than parent virus. The mutant carried one amino acid substitution in envelope protein which resulted in increase of positive charge of the protein. The mutant-infected mice showed lower virus titers in bloods and spleens than the parent-infected mice. Infectious c-DNA clone of TBE virus Hokkaido strain was successfully generated and was applied to examine the neurovirulence in mice. One amino acid change in envelope protein and 2 amino acid changes in Ns5 protein showed a synergistic effect on reduced neurovirulence in mice.