

ノダムウイルスに関する研究：組織培養細胞，マウスおよびハムスターにおけるウイルスの増殖について

著者	佐藤 平二，山崎 康人，三浦 康男，林 重美
雑誌名	鹿児島大学農学部學術報告=Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University
巻	28
ページ	91-97
別言語のタイトル	Studies on Nodamura Virus : Virus Multiplication in Variable Cell Lines, Mouse and Hamster
URL	http://hdl.handle.net/10232/2442

ノダムラウイルスに関する研究

組織培養細胞，マウスおよびハムスターに
おけるウイルスの増殖について

佐藤 平二・山崎 康人
三浦 康男*・林 重美*

(昭和52年8月30日 受理)

Studies on Nodamura Virus

Virus Multiplication in Variable Cell Lines,
Mouse and Hamster

Heiji SATO, Yasuto YAMAZAKI, Yasuo MIURA*
and Shigeyoshi HAYASHI*

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

緒 言

1972年から1974年の夏から冬へかけての季節にわが国に流行した牛の異常産の原因としては、アカバネウイルス説が定着したが^{8,6,7)}、アカバネウイルスはその発見以来¹¹⁾十数年にして漸く自然界における病原性が明らかにされたことになる。ノダムラウイルスは1956年～1957年にかけて Scherer ら^{14,15)}が東京近郊のコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) から日本脳炎ウイルス分離中日本脳炎ウイルス Getah ウイルスと共に分離された新ウイルスであるが、当時1才未満の幼豚に本ウイルスに対する中和抗体が証明されたことから動物に対する病原性が疑われながら未だに野外動物、実験動物における自然発症例が知られておらず、本ウイルスはいわゆる orphan ウイルスの一つである。ノダムラウイルスはジエチルエーテル、クロロフォルム、デゾキシコレートに抵抗性で、大きさが28～29 nm の六角形立体対称であり、細胞質マトリックスで成熟し、細胞内で結晶形の配列を示すなどから arbovirus よりは picornavirus に分類されるのではないかと考えられている^{4,9)}。また唯一の感受性動物とされる乳のみマウス¹⁶⁾における病変は四肢筋組織の炎症と変性、脊柱側方筋の変性萎縮、脊髄ノイロンの壊死と褐色脂肪化などが特徴的で、病状

の進行に伴い後軀麻痺をおこすが、これらの変状は Cocksackie B 群ウイルス、Polio ウイルスによる変化とよく似ているといわれる^{13,9)}。さらにノダムラウイルスは種々の昆虫、ダニ類の体内増殖可能であることが知られ²⁾、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) の cell line での増殖も確認されており、2種類の昆虫、ヨウシュミツバチ (*Apis mellifera*) とハチノスツヅリガ (*Galleria mellonella*) には致死感染をおこすことが知られ²⁾、ハチの麻痺ウイルスと酷似するといわれている¹⁾。

このようにノダムラウイルスは arbovirus というよりは picornavirus と考えられるのに蚊による乳のみマウス間の伝播が証明されており¹⁵⁾、節足動物、哺乳動物に病原性をもっているなど幾多の興味ある特徴をもっている。前報¹²⁾ではノダムラウイルスの血清学的診断法の諸条件について検討を行ない、感染乳のみマウスの筋乳剤の遠沈上清およびそのダイフロン処理抗原を用いる補体結合反応 (CFT) とゲル内沈降反応 (GPT) が十分に鋭敏かつ特異的な反応であることを明らかにした。本報ではこの興味あるウイルスの動物体内特に乳のみマウスまたは幼若マウス体内におけるウイルス増殖の様相を、CFT によりウイルス抗原量を定量して追跡し、あわせて培養細胞、ハムスターにおけるウイルス増殖の有無についても調べたのでそれらの結果について報告する。

* 農林省家畜衛生試験場九州支場 (鹿児島市)
Kyushu Branch Laboratory, National Institute of Animal Health, Kagoshima shi, Japan.

実験方法

1. 使用ウイルス

農林省家畜衛生試験場保存のノダムウイルスを用いた。本ウイルスは乳のみマウス感染脳および後肢筋の10%乳剤の遠沈上清を -80°C に凍結保存されたもので継代17代目に当る。

2. 使用動物および接種法

感染実験には生後3~4日のgpc系乳のみマウスとgpc系、CFW系の4~5週令マウスを用いた。接種材料は乳のみマウスの感染後肢筋の10%乳剤の3000rpm遠沈上清で、その0.2mlを腹腔内に注射した。CFT用の抗血清は、乳のみマウス後肢筋乳剤の遠沈上清を成熟gpcマウスに0.2mlづつ腹腔注射し、3週後再び0.2ml注射してから7日目にエーテル麻酔の上心臓より採血し、血液量の1/2量のPBSを加えて血清分離し、これを2倍希釈血清とし -20°C に保存した。感染動物の各組織はペロナール緩衝液VBS⁺⁺(NaCl 8.5g, 5-5 ジエチルバルビツール酸0.575g, 5-5 ジエチルバルビツール酸ナトリウム0.375g, CaCl₂ 0.028g, MgCl₂·6H₂O 0.168g, 蒸溜水1000ml)により10倍乳剤とし、その3000rpm15分間遠沈した上清をCF抗原の原液とした。

感染用ハムスターはシリアンハムスターを用い、乳のみマウス継代19代(SM 19)のウイルス液0.2mlの腹腔注射を行なった。

3. 組織培養供試細胞と培養法

実験に用いた細胞はBHK 21細胞(幼若ハムスター腎由来株化細胞), MDBK細胞(牛腎由来株化細胞), BEK-1細胞(牛胎児腎由来株化細胞), RK-13細胞(ウサギ腎由来株化細胞), HmLu-1細胞(ハムスター肺由来株化細胞), ESK細胞(豚胎児腎由来株化細胞)および牛胸腺初代培養細胞系の7種類であった。各細胞はPTE(PBS⁻にversene 0.02%, トリプシン0.1%に溶解)で消化後、増殖液(Eagle MEM 80%, トリプトーズフォスフェートブロス10%, 牛血清10%にカナマイシン100μg/ml, フラジオマイシン50μg/ml, ファンギゾン2.5μg/mlを加え, 7.5% NaHCO₃でpHを7.2~7.4に調節)に浮遊させ, 3×10^5 cell/mlとし, 250ml培養ビンに10mlづつ分注し, 37°C で静置培養を行なった。通常これらの細胞は4~5日目に完全なシートを形成するが, この時期に培養液を捨て, Hanksの塩類溶液で2回洗滌した細胞シートに10000rpm60分遠沈した10倍乳剤上清(SM 18)をビン当り1ml接種した。 37°C で

90分吸着させ, 2回洗滌し, 維持液(Eagle MEM 88%, トリプトーズフォスフェートブロス10%, 5%ウシアルブミン2%にカナマイシン100μg/ml, フラジオマイシン50μg/ml, ファンギゾン2.5μg/mlを加え, 7.5% NaHCO₃でpHを7.4~7.8に調節)を加えて 37°C で培養した。BHK 21細胞では3日間, その他の細胞では7日間CPEの観察を行ない, その後培養液と細胞に分け, 培養液は3000rpm15分遠沈して上清を分離し, 細胞は凍結融解を一回行ない原培養の1/10量のPBSを加えて3000rpm15分間遠沈し上清をとり, それぞれCFT用の抗原とし, また次の継代用とした。

4. 補体結合反応術式

全量を0.6mlとするいわゆる少量法⁵⁾を用い, 感作時間は 4°C 18時間, 希釈液はVBS⁺⁺を使用し, マウス抗血清4単位, 補体2単位, 溶血系としては, 3単位の溶血素と2.5%羊血球液の等量混合液を用いた。抗原は腹腔接種マウスの組織を経時的に採取し, 10倍乳剤の3000rpm15分遠沈上清を原液として2倍希釈を行ない, 50%溶血を指標として陽性を示す最高希釈倍数を求めた。

実験成績

1. 培養細胞におけるウイルスの増殖

各種培養細胞を用いて, ウイルス増殖の有無をCPEの発現, CFTあるいは乳のみマウスに対する病原性または抗原性の定量などにより検討した。ESK細胞では7代, HmLu-1細胞では4代, RK-13細胞およびBEK-1細胞では2代の継代を試みたが, 何れもCPEは認められなかった。CFTによっても何れの細胞の液層, 細胞層にもCF抗原は証明されず, 乳のみマウスの腹腔内接種によっても陽性の成績は得られなかった。MDBK, 牛胸腺細胞は継代を繰返さなかったが成績は陰性であった。BHK 21細胞では初代ではCPEは認められず, CFTでは細胞層の原液で50%溶血を示したが, それ以上の希釈では100%溶血し, 培養液はすべて溶血した。2継代目においてもCPEは認められずCFTは抗補体作用が出現した。3継代目の液層を乳のみマウスに腹腔内接種を行なったが発症は認められなかった。しかし同様な実験を再度繰返したところ, 2継代目, 3継代目の細胞層の乳のみマウス腹腔内接種では, 2継代目の材料で7匹中1匹が8日目に発症し, 3継代目のものでは9匹中2匹が3日目に, 1匹は6日目に発症し死亡した。

2. マウス体内における増殖

Table 1. Detection of CF antigens in gpc infected suckling mice*1

Materials	Day	Antigen dilution											
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
Hind limb	1	0	0	0	0								
	2	4	2	0	0	0	0						
	3	4	4	4	4	4	4	1	0	0	0	0	0
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	0
Liver	1	0	0	0	0								
	2	0	0	0	0								
	3	4	4	1	0	0	0						
	4	4	4	4	4	4	4	2	1	0	0	0	0
	5	4	4	4	4	4	4	4	4	3	0	0	0
Brain	1	0	0	0	0								
	2	0	0	0	0								
	3	0	0	0	0								
	4	0	0	0	0								
	5	0	0	0	0								

*1: 4 unit of mouse immune serum was employed for CFT.

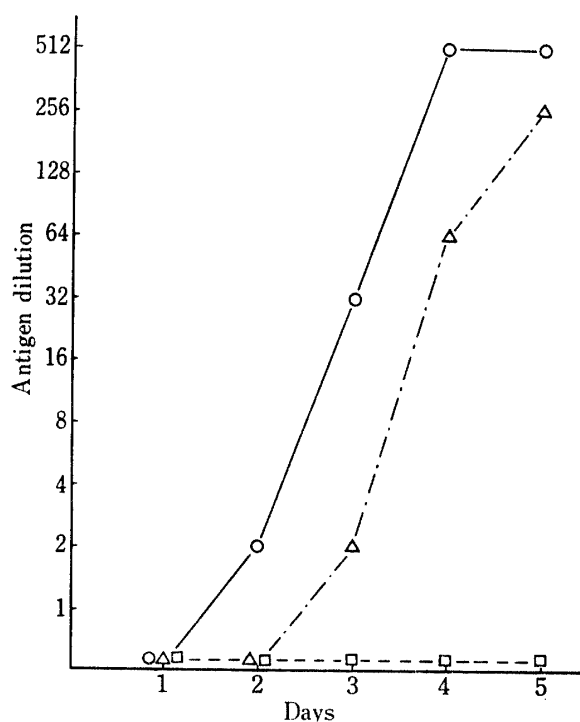


Fig. 1. Development of complement fixing antigens in gpc suckling mice. Symbols: ○—○ hind limb; △-△ liver; □-□ brain.

3～4日令の乳のみマウスの腹腔にウイルスを接種して2匹づつ経時的に各臓器をとりその乳剤中のCF抗原の推移からマウス体内のウイルス増殖を推測したところ、後肢においては接種後2日目に、肝臓では3日目にCF抗原が検出され、ほぼ全例のマウスが死亡

する5日目には後肢筋では512倍、肝臓では256倍に達する高い抗原価が得られた (Table 1, Fig. 1).

脳では使用抗血清を16単位を用いるなども試みたがCF抗原を検知し得なかった。しかし5日目の脳乳剤を乳のみマウスに腹腔接種すると後軀麻痺発症後死亡した。

また5日目のマウス体内のウイルス抗原の分布を調べた実験では Table 2 に示すように、後肢筋、前肢筋、肝臓、脾臓および弱いながら腎臓にもCF抗原が証明された。次に4～5週令のgpc系幼若マウスにウイルス材料を腹腔接種したところ6～10日にかけて後軀麻痺をおこすものが観察され、検索の結果後肢筋にCF抗原が認められた。そこで乳のみマウス同様経時的にCF抗原の検索を行なったところ、Table 3 に示すように後肢、前肢筋とも接種2日後にCF抗原が出現し、日と共に抗原価は上昇した。肝臓では3日目、4日目にある程度の抗原の上昇が認められた (Fig. 2).

生後4週のCFW系マウスでの接種実験では、5日目に Table 4 に示すような分布を示し、後肢筋、前肢筋、背筋の他腎臓にも少量のCF抗原が検知された。次にgpc系幼若マウスにおいてウイルス継代が可能かどうかを知るため継代を試みたところ、Fig. 3 に示すように14代にわたり筋乳剤による継代が可能ながことが明らかにされた。乳のみマウス継代19代目のウイルスを4週令のシリアンハムスター4匹に接種した実験では、接種後4日目に3匹のハムスターに後軀麻痺が発現し、5日目に斃死したが、残りの1匹は14日間の観察期間中異常が認められず生き残った。

Table 2. Distribution of CF antigens in variable organs of gpc suckling mice 5 days after infection*1

Materials	Antigen dilution									
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Hind limb	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
Fore limb	4	4	4	4	4	4	3	0	0	0
Liver	4	4	4	4	4	4	1	0	0	0
Spleen	4	4	2	0	0	0	0			
Kidney	2	0	0	0	0					
Brain	0	0	0	0						

*1: 4 unit of mouse immune serum was employed for CFT.

Table 3. Detection of CF antigens in gpc infected young mice*1

Materials	Day	Antigen dilution								
		1	2	4	8	16	32	64	128	
Hind limb	1	0	0	0	0					
	2	0	0	0	0					
	3	4	4	2	2	0	0	0	0	
	4	4	4	4	4	2	0	0	0	
	5	4	4	4	4	4	4	4	0	0
Liver	1	0	0	0	0					
	2	0	0	0	0					
	3	4	4	2	1	0	0	0	0	
	4	4	4	3	2	0	0	0	0	
	5	2	0	0	0	0	0			
Fore limb	1	0	0	0	0					
	2	4	4	1	0	0	0	0	0	
	3	4	4	4	3	1	0	0	0	0
	4	4	4	4	4	3	2	0	0	0
	5	4	4	4	4	4	4	3	3	0

*1: 4 unit of mouse immune serum was employed for CFT.

None of CF antigen was indicated in brain, spleen and kidney.

Table 4. Distribution of CF antigens in variable organs of young CFW mice 5 days after infection*1

Materials	Antigen dilution					
	1	2	4	8	16	32
Hind limb	4	4	4	4	2	0
Liver	0	0	0	0		
Fore limb	3	3	0	0	0	0
Spleen	0	0	0	0		
Kidney	2	2	0	0	0	0
Heart	0	0	0	0		
Dorsal muscle	4	4	0	0	0	0

*1: 4 unit of mouse immune serum was employed for CFT.

斃死ハムスターの後肢筋乳剤を乳のみマウスに接種してみたところ、3~4日後にすべて後軀麻痺をおこし、ハムスターにおいてもウイルスの増殖があり、病原性であることが想像された。

考 察

ノダムラウイルスの血清反応の手技が詳しく検討されたので¹²⁾、それを参考にして CFT を用いて培養細胞および実験動物体内のウイルス抗原を証明することにより、ウイルス増殖の有無をしらべ、さらにウイルスの宿主域について再検討を加えた。培養細胞では BHK 21 細胞においてのみ増殖が確認され、それ以外は陰性の細胞の例数を増したに止ったが、BHK 21 細胞材料による CFT がうまく行かなかった点については今後の検討が必要であると思われた。また CFT によっては抗原が証明されなかったが乳のみマウスによりウイルスの存在が明らかにされたことは、やはり乳のみマウスにくらべて CFT による検索が感度が低いことを示しているようである。ただ Bailey³⁾ の報告にくらべてわれわれの培養細胞におけるウイルスの増殖はかなり少ないようで、この原因が何によるのかは

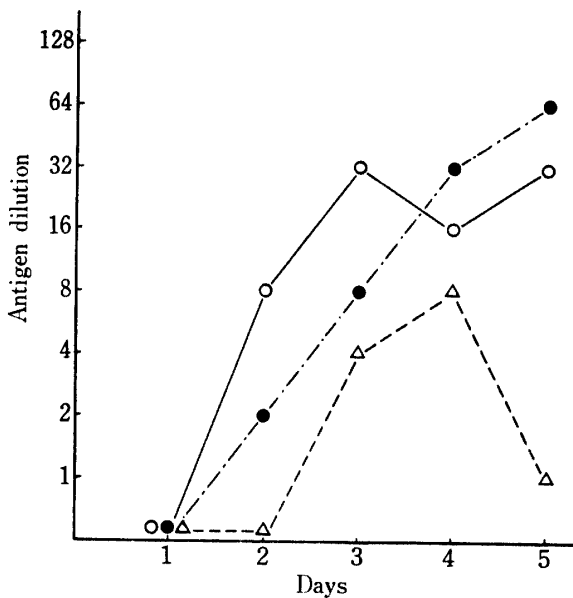


Fig. 2. Development of complement fixing antigens in gpc young mice. Symbols: ○—○ hind limb; ●- - -● fore limb; △- - -△ liver.

明らかではなかった。

乳のみマウスの腹腔にウイルスを接種したのち諸臓器のウイルス抗原量を経時的に追跡した結果は Scherer¹⁶⁾, Murphy⁹⁾ らの報告のように後肢筋、肝臓にウイルス抗原が多く、後肢では2日目より、肝臓では3日目に検知可能であった。そして4日目には前肢の抗原価は512倍に達し、肝臓では256倍に達した。感染5日目の体内のウイルス抗原の分布によれば、後肢筋、肝臓のほか、脾臓、腎臓にもウイルス抗原が証明され、脳よりは検知されなかった。Schererら¹⁵⁾は脳による継代が可能であるといい、われわれも同様な成績を得たが、その後 Schererら¹⁶⁾の報告では、心筋および中枢神経への感染像がみられない例についてのべており、ウイルスの脳での増殖または脳中ウイルスの性状についてはさらに今後の研究が望まれる。今回の実験では乳のみマウスの入手が十分でなかったため、ウイルス抗原価と乳のみマウスに対する毒力の直接的な比較は行なわれなかったが、Scherer¹⁶⁾によれば SM 10 ~ SM 12 の継代ウイルスの感染筋剤上清は最高 $10^{7.5}$ SM ic LD₅₀ を示すというから、本実験の CF 抗原価と比較して推測すれば、脾臓、腎臓におけるウイルス量は脳とくらべてもかなり大量であって、これらの臓器においてもウイルス増殖がおこっていることを想像させた。gpc系、CFW系の幼若マウスによるノダムラウイルスの感染実験の結果、CFWでもウイルスの増殖があり gpc系マウスでの継代が

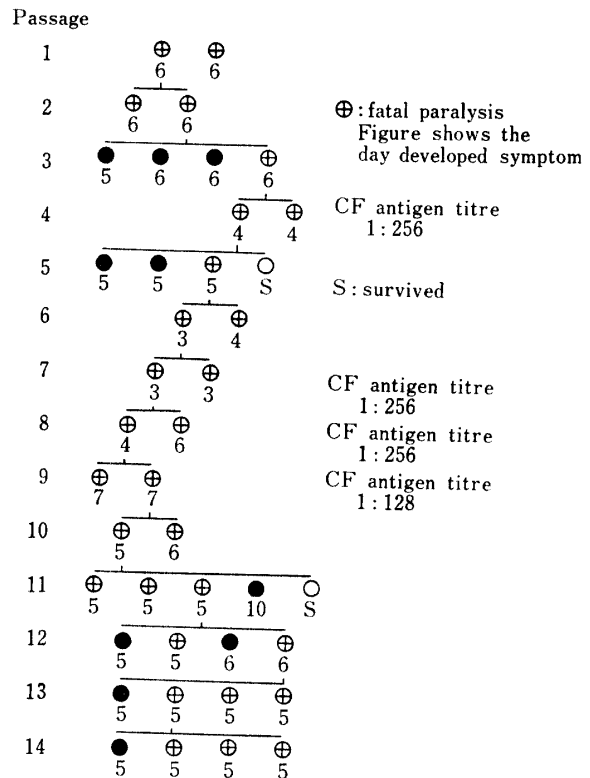


Fig. 3. Nodamura virus passage in young gpc mice. Filled circle shows mouse which died without symptom.

可能なことが明らかになった。すなわち初代より後軀麻痺を発現し、実験を停止した14代まで確実に発症せしめ、ウイルス抗原量も十分に高く、従来の乳のみマウスにしか病原性がないとする成績とは異なる結果が得られた。各臓器中のウイルス抗原量は、やはり前肢、後肢筋、肝臓に多いが興味あることに CFW系マウスでは抗原分布は gpc系の場合とやや異なり、腎臓で検知され肝臓では検知されなかったが、その原因がマウスの系統差によるのかどうかは不明であった。今後多くの系統について試験を行なってみれば適当な系統の幼若マウスが乳のみマウスに代り得ることが想像された。ハムスターによる感染実験では接種4日目に4匹中3匹に後軀麻痺が発現し、5日目には3匹とも斃死し、他は生き残った。この斃死したハムスターの後肢筋剤上清は乳のみマウスに後軀麻痺を発現させ、これを斃したことからハムスターにおいてもノダムラウイルスが継代されるのではないかと考えられた。Schererら¹⁶⁾が多くの動物種にかなり大量のウイルスを接種しながら発症、継代せしめ得なかった成績とくらべると、今回のわれわれの結果が何に起因するのかわかに説明し得ないが、本ウイルスが昆虫細胞で発育し⁹⁾、乳のみマウスでは筋細胞の他 Kupf-

fer 細胞, マクロファージュ細胞, フィibroblast で増殖する⁹⁾ こと, さらには Scherer ら¹⁶⁾ がハムスター腎細胞を用いてウイルスを増殖せしめ得なかったのを Bailey ら³⁾ が BHK 21 細胞で成功している例もあり, これらの事実から本ウイルスの細胞親和性はかなり順応性に富むことも考えられ, 各種動物による馴化継代によって親和性が変り得ることが考えられる.

結 論

ノダムウイルスの培養細胞, マウスおよびハムスターにおける増殖の有無を, CF 抗原の証明と動物病原性によってしらべた結果, 以下のような事実が明らかにされた.

1. 乳のみマウス継代 18 代目のノダムウイルスを 7 種類の培養細胞に接種してみたところ, BHK 21 細胞に CPE なしに増殖の可能性が考えられたが他の細胞ではウイルスの増殖は証明されなかった.
2. gpc 系乳のみマウスでは後肢筋, 前肢筋, 肝臓および脾臓にかなり大量の CF 抗原が証明され, 腎臓にも微量の CF 抗原が証明された.
3. gpc 系および CFW 系幼若マウスにおいても前肢筋, 後肢筋, 肝臓, 腎臓, 背筋にウイルス抗原が証明された.
4. 乳のみマウス継代 18 代目から gpc 系幼若マウスによるウイルス継代を試みたところ, 14 代にわたり継代可能であった.
5. 乳のみマウス継代 19 代目のノダムウイルスはハムスターにおいても増殖し, 後軀麻痺を発症してこれを斃した.

謝 辞

本研究遂行に当り終始多大の御協力を賜った農林省家畜衛生試験場九州支場長石原忠雄博士に深甚な謝意を表明致します.

文 献

- 1) Bailey, L., Gibbs, A. J. and Wood, B. D.: Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera*). *Virology*, **21**, 390-395 (1963)
- 2) Bailey, L. and Scott, H. A.: The pathogenicity of Nodamura virus for insects. *Nature*, **241**, 545 (1973)
- 3) Bailey, L., Newman, J. F. E. and Porterfield, J. S.: The multiplication of Nodamura virus in insect and mammalian cell culture. *J. gen. Virol.*, **26**, 15-20 (1975)
- 4) International enterovirus study group: Picornavirus group. *Virology*, **19**, 114-116

(1963)

- 5) 国立予防衛生研究所学友会編: ウイス実験学総論, 丸善, 東京 (1967)
- 6) Kurogi, H., Inaba, Y., Goto, Y., Miura, Y., Takahashi, H., Sato, K., Omori, T. and Matsumoto, M.: Serologic evidence for etiologic role of Akabane virus in epizootic abortion-arthrogryposis-hydranencephaly in cattle in Japan, 1972-1974. *Archives Virology*, **47**, 71-83 (1975)
- 7) Kurogi, H., Inaba, Y., Takahashi, E., Sato, K., Omori, T., Miura, Y., Goto, Y., Fujiwara, Y., Hatano, K., Kodama, K., Fukuyama, S., Sasaki, N. and Matsumoto, M.: Epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle: Isolation of Akabane virus from affected fetuses. *Archives Virology*, **51**, 67-74 (1976)
- 8) Miura, Y., Hayashi, S., Ishihara, T., Inaba, Y., Omori, T. and Matsumoto, M.: Neutralizing antibody against Akabane virus in precolostral sera from calves with congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome. *Archiv gesamte Vivusforschung*, **46**, 377-380 (1974)
- 9) Murphy, F. A., Scherer, W. F., Barrison, A. K., Dunne, H. W. and Gary, G. W., Jr.: Characterization of Nodamura virus, an arthropod transmissible picornavirus. *Virology*, **40**, 1008-1021 (1970)
- 10) Newman, J. F. E. and Brown, F.: Evidence for divided genom in Nodamura virus, arthropod-borne picornavirus. *J. gen. Virology*, **24**, 371-374 (1973)
- 11) Oya, A., Okuno, T., Kobayashi, I. and Matsuyama, T.: Akabane, a new arbor virus isolated in Japan. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **14**, 101-108 (1961)
- 12) 佐藤平二・山崎康人・三浦康男・林 重美: ノダムウイルスに関する研究. 血清学的診断法の検討. 鹿大農学術報告, **28**, 41-53 (1978)
- 13) Scherer, W. F.: Histopathology of Coxsackie and Coxsackie-like viruses. *Ciba found. study group No. 7. Virus meningoencephalitis*, p. 37-39, Spottiswoode, Ballantyne & Co. Ltd., London (1961)
- 14) Scherer, W. F., Funkenbush, W., Buescher, E. L. and Izumi, Y.: Sagiya virus, a new group A arthropod-borne virus from Japan. I. Isolation, immunologic classification, and ecologic observations. *Americ. J. Trop. Med. Hyg.*, **11**, 255-268 (1962)
- 15) Scherer, W. F. and Hurlbut, H. S.: Nodamura virus from Japan: A new and unusual arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. *Americ. J. Epidemiol.*, **86**, 271-

- 285 (1967)
- 16) Scherer, W. F., Verna, J. E. and Richter, R. W. : Nodamura virus, an ether and chloroform-resistant arbovirus from Japan. *Americ. J. Trop. Med. Hyg.*, **17**, 120-128 (1968)

Summary

Ever since the etiology of Akabane disease was disclosed, it has become an interesting hypothesis to pay attention onto the role of other arthropod-borne orphan virus on the forthcoming epizootic disease.

It is noted to be that Nodamura virus which was arthropod-transmissible picornavirus, and which has caused necrosis of spinal cord neurons, inflammation and degeneration of paravertebral muscles in suckling mice is eligible to be a potential pathogen for other animal species.

In the previous paper authors showed that complement fixation test with supernate of tissue emulsion and Daiflon treated supernate could be a useful serological method for both antibody and antigen detections in Nodamura virus infection.

This article records some patterns of virus multiplication in suckling mice, young mice, young hamster and variable cell lines, pointed out by CFT or by suckling mouse inoculation.

It was demonstrated that Nodamura virus, in suckling mouse passage 18, weakly multiplied in BHK 21 cells; while none of multiplication was demonstrated in other 6 cell lines. When Nodamura virus was inoculated into young mice (4 weeks of age), virus was demonstrated at the following tissues: fore limb muscle, liver, kidney and dorsal muscle as well as in suckling mice. However, virus titres were not as high as in suckling mice.

Serial passage of Nodamura virus in young gpc mouse was capable for 14 passage without any difficulty. Young hamster was susceptible to ip inoculation of Nodamura virus too.