

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658243

研究課題名（和文）

脳炎フラビウイルス感染による中枢神経障害の生体内リアルタイムイメージング解析

研究課題名（英文）

in vivo imaging of flavivirus encephalitis

研究代表者

早坂 大輔 (HAYASAKA DAISUKE)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：10346926

研究成果の概要（和文）：日本脳炎ウイルスおよびダニ媒介性脳炎ウイルスを感染させたマウスモデルを用いて、放射性薬剤を投与して脳機能の変化をみる分子イメージングによるウイルス脳炎の生体内イメージングを試みた。その結果、中枢神経細胞の糖代謝を指標としてウイルス感染による重篤な脳炎をイメージングできることが示された。この研究成果により、ウイルス脳炎患者において脳炎重症化の予後判定や治療方針決定に寄与する診断法の確立が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed an in vivo imaging of flavivirus encephalitis using a mouse model. We inoculated Japanese encephalitis or Tick-borne encephalitis virus in mice, and compared accumulations of  $^{18}\text{F}$ -FDG between dying and surviving mice using positron emission tomography. Dying mice showed reduced levels of  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes in a part of brains compared with surviving mice. These results will provide useful information for clinical diagnosis of flavivirus encephalitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ウイルス、脳神経疾患、獣医学、感染症、分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

脳炎フラビウイルスには日本脳炎ウイルス(JEV)やダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)などがあり、ヒトや家畜で脳炎を起こす節足動物媒介性の人獣共通感染症の原因ウイルスである。

フラビウイルス脳炎の病態解析にはヒトと類似の症状を示すマウスモデルが用いら

れてきた。しかしながら、従来の研究方法では、感染個体を安楽死させ、臓器などを取り出して感染個体でのウイルス増殖や免疫応答、病理学解析を行う必要があった。ところが、その方法では安楽死した時点においてその後各個体がどのような病態の転帰（生死）をとるかについては知ることはできなかった。

したがって、脳炎フラビウイルス感染後にみられる病態のばらつき（軽症もしくは重症経過）をより詳細に解析するためには、非侵襲的に生体内での中枢神経組織病態を把握し、経日的な病態とリンクしながら最終的に区別できる致死個体と生存個体を比較・解析する方法が必要であった。

ここで、単一光子放射断層撮影法(SPECT)とポジトロン断層法(PET)による分子（核医学）イメージングは非侵襲的に生体内の細胞や組織の機能、特に中枢神経機能をリアルタイムにイメージングできる方法である。実際に、分子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く、中枢神経機能を解析する分子イメージング薬剤も数多く開発されてきた。そこで、我々はフラビウイルス感染個体の生体内における病態を非侵襲的に解析できる研究手法として、分子イメージングによるフラビウイルス脳炎の生体内イメージング可能性を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究では、 $^{18}\text{F}$ -FDG による PET イメージングに着目した。 $^{18}\text{F}$ -FDG は代謝活性の高い細胞に取り込まれるため、中枢神経組織での集積がみられる。しかしながら、 $^{18}\text{F}$ -FDG の集積は炎症部位や癌細胞でもみられるため、脳炎フラビウイルス感染後の中枢神経障害部位すなわち脳炎部位では  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積が上昇するのか低下するかについては不明であった。

そこで本研究では、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、JEV および TBEV 感染マウスモデルを用いて PET イメージングによるフラビウイルス脳炎イメージングの可能性・有効性について検討した。

## 3. 研究の方法

C57BL/6j マウス（5 週齢、♀）に JEV Ja0ArS982 株および JaTH160 株、TBEV Oshima 株および Sofjin 株をそれぞれ  $10^4$  PFU 皮下感染させ感染後 5, 9, 13 日目に F-18 FDG (FDG スキャン®注、日本メジフィジックス) を 1 匹あたり 20MBq (1ml の生理食塩水で希釈) 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 分間頭部の PET 撮像、次いで CT 撮像を行った (n=5~10)。PET/CT 撮像は Triumph®II-PET/SPECT/CT System FX3000 プレクリニカルイメージングシステム (SII) を用いて行った。

感染マウスの症状、生死を 21 日間観察し、生存個体と致死個体に向け、PET イメージング像を経日的に比較した。

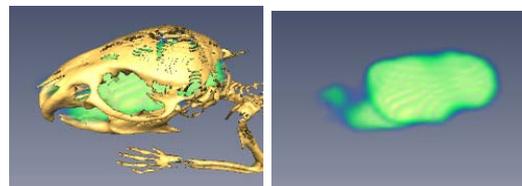
ウイルス感染実験は BSL3 実験室で行い、動物実験は長崎大学における動物実験指針に沿って行った。

## 4. 研究成果

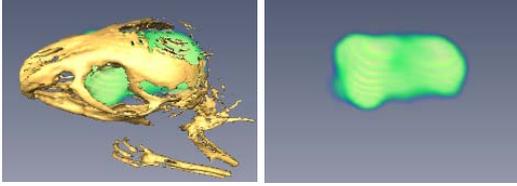
(1) JEV Ja0ArS982 株感染マウスの生存および致死それぞれの個体について、代表例のイメージング像を図 1 に示す。重症個体（感染 17 日目に致死）、軽症個体（生存）ともに感染 9 日目では明確な症状、体重減少（感染 0 日目に対しての体重比はそれぞれ 1.07, 1.00）はみられず、両個体とも脳全体にわたり  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積がみられた（図 1A, B）。一方、感染 13 日目の致死個体（体重比 0.78）では  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積に偏りがみられ、前部（大脳皮質）での集積低下、後部（小脳）での集積がみられた（図 1C）。生存個体でも前部に一部集積低下がみられたが、眼の部分では集積がみられた（図 1D）。

図 1 JEV Ja0ArS982 株感染マウスの PET イメージング

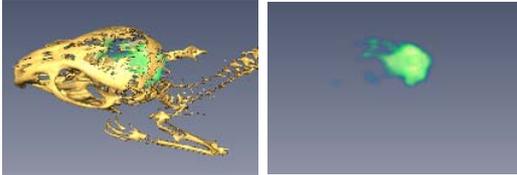
A. 致死個体（17 日目で致死）、感染 9 日目



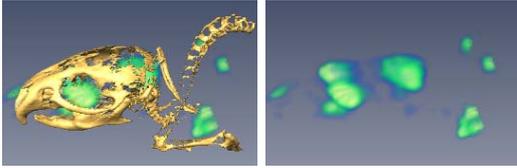
B. 生存個体、感染 9 日目



C. 致死個体 (17 日目で致死)、感染 13 日目



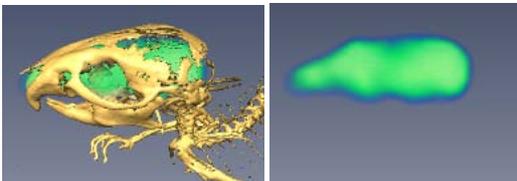
D. 生存個体、感染 13 日目



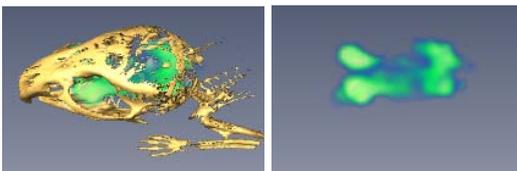
(2) TBEV Oshima 株感染マウスの生存および致死それぞれの個体について、代表例のイメージング像を図 2 に示す。JEV Ja0ArS982 株感染マウスと同様、感染 9 日目では致死、生存個体ともに脳全体での  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積がみられた (図 2A, B)。しかしながら、感染 13 日目では致死個体において  $^{18}\text{F}$ -FDG 集積の偏りがみられ、前部 (大脳皮質) での低下がみられた一方 (図 2C)、生存個体では脳全体に集積がみられた (図 2D)。

図 2 TBEV Oshima 株感染マウスの PET イメージング

A. 致死個体 (12 日目で致死)、感染 9 日目



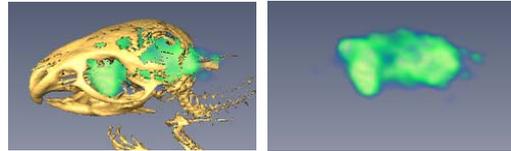
B. 生存個体、感染 9 日目



C. 致死個体 (測定後致死)、感染 12 日目



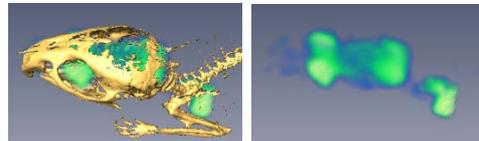
D. 生存個体、感染 13 日目



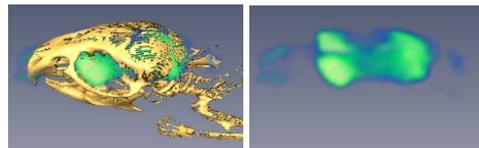
(3) JEV JaTH160 株および TBEV Sofjin 株感染マウスについて、代表例のイメージング像を図 3 に示す。これらのウイルス株感染マウスは 100% の致死率を示す。JEV JaTH160 株感染マウスの 5 日目において、脳全体に  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積がみられた (図 3A)。9 日目においても脳全体に  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積がみられたが (図 3B)、この個体は 14 日目に死に至った。一方、TBEV Sofjin 株感染マウスでは、感染 5 日目では脳全体に  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積がみられたが (図 3C)、感染 9 日目では集積に偏りがみられた (眼、前部で低下) (図 3D)。この個体は 12 日目に死に至った。また、非感染マウスでは脳全体に  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積がみられた (図 3E)。

図 3 JEV JaTH160 株感染マウスの PET イメージング

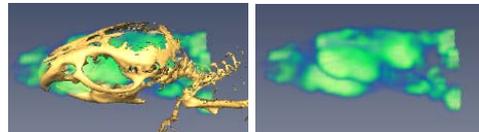
A. JEV JaTH160 株、感染 5 日目



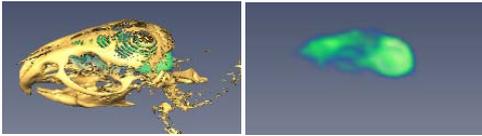
B. JEV JaTH160 株、感染 9 日目



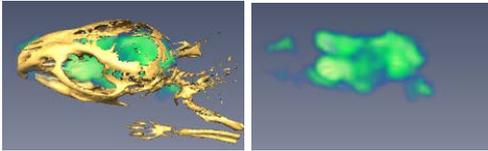
C. TBEV Sofjin 株、感染 5 日目



#### D. TBEV Sofjin 株、感染 9 日目



#### E. 非感染



これまでに得られた病理学的解析データから、JEV 感染マウスでは大脳皮質部位でのウイルス感染、炎症反応が他の部位にくらべ顕著であることが示されている。したがって、JEV 感染マウスの重症個体の脳病変部位では中枢神経機能低下による FDG の集積低下が示唆された。この現象は TBEV 感染マウスでも同様な知見が得られている。

したがって、本研究成果において、フラビウイルス感染マウスの脳炎部位では FDG 集積が低下することがはじめて確認され、この現象から重症個体でみられる脳炎重症化のイメージングができる可能性が示された。

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。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Daisuke Hayasaka、Kotaro Aoki、Kouichi Morita、Development of simple and rapid assay to detect viral RNA of tick-borne encephalitis virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification、Virology Journal、Mar

4;10:68、2013

DOI: 10.1186/1743-422X-10-68

(2) Kazutaka Kitaura、Yoshiki Fujii、Daisuke Hayasake、Takaji Matsutani、Kenji Shirai、Noriyo Nagata、Chang-Kweng Lim、Satsuki Suzuki、Tomohiko Takasaki、Ryuji Suzuki、Ichiro Kurane、High Clonality of Virus-Specific T Lymphocytes Defined by TCR Usage in the Brains of mice infected with west nile virus、Journal of Immunology、査読有、187(8)、2011、3919-3930

DOI: 10.4049/jimmunol.1100442

[学会発表] (計 11 件)

- ① フラビウイルスの分子イメージング：早坂大輔、淵上剛志、森田公一：第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、静岡 (2013 年 5 月 24 日)
- ② 白井顕治、北浦一孝、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：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：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪 (2012 年 11 月 13 日)
- ③ 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 $\alpha$  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 年 11 月 13 日)
- ④ 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 年 11 月 12 日)
- ⑤ 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 $\alpha$  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 年 9 月 15 日)

- ⑥ 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 $\alpha$  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 年 9 月 6 日)
- ⑦ 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 年 9 月 5 日)
- ⑧ 青木康太郎、早坂大輔、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 年 9 月 5 日)
- ⑨ 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 46<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases, Beppu (2012 年 6 月 20 日)
- ⑩ 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 $\alpha$  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 年 5 月 25 日)
- ⑪ 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 年 5 月 25 日)

[図書] (計 1 件)

(1) Daisuke Hayasaka, The Development of encephalitis following Tick-borne encephalitis virus infection in a mouse model, Flavivirus Encephalitis, Chapter 8, 2011, 157-166  
DOI: 10.5772/847

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早坂 大輔 (HAYASAKA DAISUKE)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号 : 1 0 3 4 6 9 2 6