

機関番号：17301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21780281

研究課題名 (和文) フラビウイルス脳炎の重症化・致死性に関わる病原性発現機序の解析

研究課題名 (英文) The mechanism of severe disease development following encephalitic flavivirus infection

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):フラビウイルス脳炎の重症化に関わる病原性発現機序を調べるために、ダニ媒介性脳炎ウイルスおよび日本脳炎ウイルスを感染させたマウスモデルを用いた解析を行った。その結果、感染個体の重症化には、ウイルスが神経細胞に感染することに加え、個体側の免疫応答が神経細胞に傷害的に働いていることが複合的に関わった結果生じていることが示唆された。

研究成果の概要(英文):To elucidate the mechanism of severe disease following encephalitic flavivirus infection, we investigated the pathogenic mechanism following Tick-borne encephalitis virus (TBEV) and Japanese encephalitis virus (JEV) infections in a mouse model. We concluded that multiple factors of CNS infection and immunopathogenicity determine the severe form of encephalitic flavivirus infection

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学 6604

キーワード：ウイルス、人獣共通感染症、免疫病原性、脳神経疾患

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 (Japanese encephalitis virus, JEV) やダニ媒介性脳炎ウイルス (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) が含まれる。これらのウイルスは蚊やマダニの吸血性節足動物によって媒介される。脳炎フラビウイルス感染の多くは不顕性もしくは熱性疾患で済むが、

髄膜炎・脳炎を発症し重傷化が進むと致死性が高く、回復しても患者の多くは後遺症が問題となる。しかしながら、重症化が進む機序については不明な点が多く、そのため特異的な予防・治療法は確立されていない。

2. 研究の目的

脳炎フラビウイルス感染後の重症化にはウ

ウイルス側および感染個体側の要因が複合的に関わっていると考えられている。申請者はマウスモデルを用いた解析により、重症化には「早い時期の致死性」と「遅い時期の致死性」がみられ、それぞれウイルス側と感染個体側の要因が関係していることを示唆してきた。特に人での自然感染でみられる症状の重症化・致死性には実際には「遅い時期の致死性」が重要と考えられる。そこで、本研究ではこの「遅い時期の致死性」に関わる病原性発現機序の詳細な解析を行い、それに伴う新しい治療法の開発のための基礎データを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TBEV Oshima株の親株中に含まれるウイルス準種を限界希釈法にてクローニングし、それぞれの準種ウイルスをB6マウスに感染させ、体重減少、症状、致死性の観察を行った。

(2) JEV JaTH株およびS982株を 10^4 PFU/mouseの量でB6マウスに感染させ、体重減少、症状、致死性の観察を行った。次いで、各組織中のウイルス量をプラークアッセイ法で測定し、サイトカイン発現量を定量的RT-PCR法で測定した。

(3) TBEV Oshima株と Sofjin株、JEV JaTH株と S982株を IL-10 KO B6 マウスに 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、感染後の中枢神経組織中のウイルス量を測定した。

(4) TBEV Oshima株と Sofjin株、JEV JaTH株と S982株を TNFAR KO B6マウスに 10^4 PFU皮下感染させ、体重減少、症状、致死性を比較した。

4. 研究成果

(1) TBEV Oshima株中に含まれるsmallおよびlarge plaque typeクローンのそれぞれをマウスに皮下感染させたところ、small plaque typeはマウスに病原性を示さなかった。一方、large plaque typeではほとんどのマウスで体重減少および臨床症状が確認されたが、そのうち一部のマウスだけが死に至り、残りは回復した。このことから、TBEV Oshima株の親株には病原性の異なる準種ウイルスが混在していることが示唆された。TBEV Oshima株は日本で見つかったウイルスであるため、日本に常在するTBEVには病原性の異なる準種ウイルスが存在することを示唆する点で重要な研究成果である。

(2) JaTH160株と JaOArS982感染後の致死率は感染後の致死率はそれぞれ100%、27%となった(図1)。

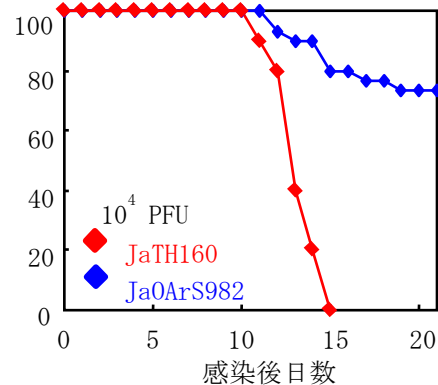


図1 JEV感染後の生存曲線

感染9日目において中枢神経組織でのウイルス増殖は JaTH160株で JaOArS982株より早く、神経細胞へのウイルス感染、炎症細胞浸潤ともに JaTH160感染で強くみられた。したがって、JaTH160感染による致死性はウイルスの神経細胞感染による神経細胞ダメージが直接関わっていると考えられた。

一方、JEV S982株感染マウスでは、ほとんどの個体が発症したが、一部の個体だけが死に至り、残りは軽症で回復した。重症個体の大脳皮質では神経細胞の脱落・壊死が顕著にみられ、大脳皮質内のウイルス量は 10^6 pfu/g組織以上であった。一方、軽症個体では神経細胞の脱落・壊死はほとんどみられなかったが、約半数の個体で重症個体と同程度の高いウイルス量を示した(図2)。

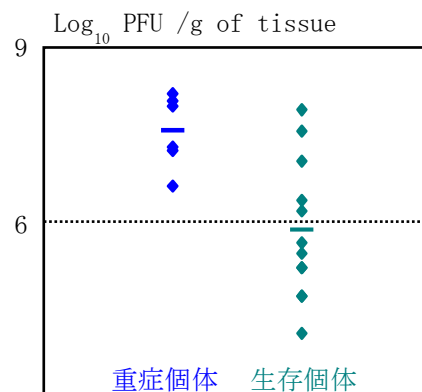


図2 JaOArS982株感染後の中枢神経組織中のウイルス量(感染13日目)

これらの結果から、JEV S982株感染による重症化にはウイルスの中枢神経感染に加えて別の要因による神経細胞のダメージが関わっていることが考えられた。

一方、重症個体は軽症個体にくらべ、大脳

皮質の GFAP、TNF alpha、IL-10 の増加、IL-2、IL-4 の低下がみられた。また、脾臓においては IL-10 の増加、TNF alpha、IFN gamma、IL-4、CD3、CD8 の低下がみられた。さらに、血清中のコルチコステロン、IL-10 の上昇がみられた。したがって、重症化には TNF alpha、IL-10 などの免疫応答が関わっていることが示唆された。

これまでの一般的な考えでは、フラビウイルス脳炎では中枢神経感染が起きることが発症・重症化・致死性に直接つながるとされていた。したがって、本研究は、中枢神経感染がある程度おきても無症状または軽症で経過し生存する場合があること、感染個体の免疫応答が重症化に関わっていることを示した点で新しい成果である。

(3) TBEV Oshima 株および JEV S982 株 (図 3) を IL-10 B6 KO マウスに感染させたところ、両ウイルスともに B6 マウスにくらべて致死性の増加がみられた。しかしながら、両ウイルスとも中枢神経組織内のウイルス量は B6 マウスにくらべて有意な差がなかったことから (図 4)、致死性の増加すなわち重症化には IL-10 KO によって生じる何らかの免疫応答が関わっている可能性が示唆された。

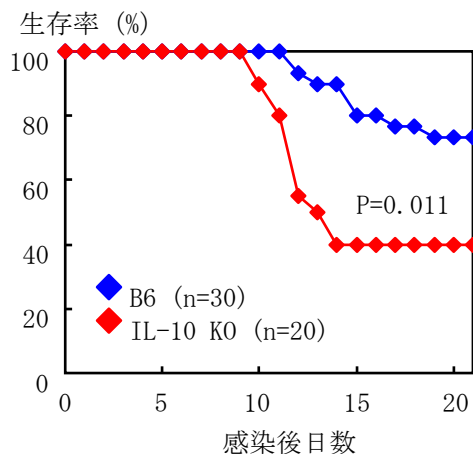


図 3 JEV S982 株 感染後の IL-10 KO マウスの生存曲線

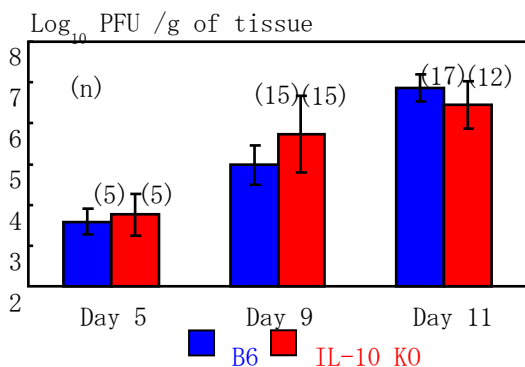


図 4 Ja0ArS982 株 10^4 PFU 感染後の IL-10 KO マウス中枢神経組織中のウイルス量

一方、TBEV Sofjin株およびJEV JaTH160株感染では、IL-10 B6 KOマウスとB6マウスに致死性の違いがなかったため、これらのウイルス感染による重症化にはIL-10応答の影響は少ないものと思われた。

(4) TBEV Oshima株およびJEV S982株をTNFR1 KOマウスに感染させたところ、TBEV Oshima株感染では致死性の増加がみられたが、JEV S982株感染では致死性に有意な差がなかった。したがって、TBEV Oshima株感染ではTNF応答が関連した感染応答が重症化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方、TBEV Sofjin株およびJEV JaTH160株感染ではTNFR1 KOマウスとB6 KOマウスに致死性の違いがなかったため、これらのウイルス感染による重症化にはTNF応答の影響が少ないものと思われた。

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 Yoshiki Fujii, Daisuke Hayasaka, Kazutaka Kitaura, Tomohiko Takasaki, Ryuji Suzuki, Ichiro Kurane. T cell clones expressing different T cell receptors accumulate in the brains of dying and surviving mice following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus. *Viral Immunology*. In press. 査読有
- ② Daisuke Hayasaka, Noriyo Nagata, Hideki Hasegawa, Tetsutaro Sata, Ikuo Takashima and Satoshi Koike. Early Mortality following Intracerebral Infection with the Oshima Strain of Tick-Borne Encephalitis Virus in a Mouse Model. *Journal of Veterinary Medical Science*. 72 : 391-396, 2010. 査読有 <http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/handle/10069/24538>
- ③ Daisuke Hayasaka, Noriyo Nagata, Yoshiki Fujii, Hideki Hasegawa,

Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Ernest A. Gould, Ikuo Takashima and Satoshi Koike. Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology* 390 : 139-150, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

- ① 早坂大輔、ミヤ ミヤツ ヌグエ トン、青木康太郎、田中香苗、森田公一、脳炎フラビウイルス感染でみられる dose-independent mortality は Type-I IFN 応答で説明できるか?、第 17 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2010 年 12 月 10 日、東京、国立感染症研究所
- ② 早坂大輔、藤井克樹、永田典代、ディン テュアン デュク、田中香苗、岩田奈緒子、北浦一孝、木下一美、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一、日本脳炎ウイルス (JEV) 感染における重症化機序の解析：第 51 回日本熱帯医学会大会、2010 年 12 月 3 日、仙台、仙台国際センター
- ③ 早坂大輔、藤井克樹、永田典代、ディン テュアン デュク、田中香苗、岩田奈緒子、北浦一孝、木下一美、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一、日本脳炎ウイルス感染における重症化機序の解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日、徳島、あわぎんホール
- ④ 藤井克樹、早坂大輔、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎、ダニ媒介性脳炎ウイルス感染時におけるマウスの生死と脳内浸潤 T 細胞クローンの相違性、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日、徳島、あわぎんホール
- ⑤ 早坂大輔、上村将夫、ディン テュアン デュク、田中香苗、永田典代、岩田奈緒子、佐多徹太郎、森田公一、日本脳炎ウイルスの株および準種の違いによる重症化の検討、第 47 回ウイルス学会九州支部総会、2010 年 9 月 3 日、宮崎、ホテルメリージュ
- ⑥ Daisuke Hayasaka、Yoshiki Fujii、Dihn Tuan Duc, Hitomi Kinoshita, Kazuki Kitaura, Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Kanae Tanaka, Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita, The mechanism of severe form of Japanese encephalitis virus infection, US-Japan 44th Joint Working Conference on Viral Diseases, 2010 年 6 月 29 日、札幌、北海道大学百年記念会館
- ⑦ 早坂大輔、上村将夫、田中香苗、森田公一：日本脳炎ウイルスの準種 (quasispecies) による病原性の検討、第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2010 年 5 月 28 日、東京 国立感染症研究所
- ⑧ 早坂大輔、藤井克樹、DUC DIN TUAN、木下一美、北浦一孝、田中香苗、鈴木隆二、森田公一、日本脳炎ウイルス感染における重症化の機序の解析、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 27 日、東京、日本獣医生命科学大学
- ⑨ 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、東京 都市センターホテル
- ⑩ 北浦一孝、藤井克樹、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎、ダニ媒介性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 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、

東京都市センターホテル

- ⑪ 早坂大輔、ディン テュアン デュク、木下一美、田中香苗、藤井克樹、鈴木隆二、森田公一、日本脳炎ウイルス感染症の重症化のメカニズム、第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月23日、東京、国立感染症研究所
- ⑫ 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性：第148回日本獣医学会学術集会、2009年9月27日、鳥取、とりぎん文化会館
- ⑬ 早坂大輔、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)をマウスに異なる経路で接種した際の発症・致死性の比較、第46回日本ウイルス学会九州支部総会、2009年9月4日、佐賀、佐賀大学
- ⑭ 早坂大輔、ダニ媒介性脳炎ウイルスをマウスに異なる経路で接種した際の発症・致死性の比較、第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月20日、千歳、丸駒温泉旅館

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：10346926

(2) 連携研究者

永田 典代 (NAGATA NORIYO)
国立感染症研究所・感染病理部・研究員
研究者番号：30270648

藤井克樹 (FUJII YOSHIKI)
独立行政法人国立病院機構・相模原病院・研究員
研究者番号：40518122