

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780230

研究課題名（和文） 脳炎フラビウウイルスの神経侵入性に関わる要因の研究

研究課題名（英文） A study of neuroinvasiveness of encephalitic flaviviruses

研究代表者

早坂 大輔（HAYASAKA DAISUKE）

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・主任研究員

研究者番号：10346926

研究成果の概要：

ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）の致死性に関わる病原性発現機序についてマウスモデルを用いた解析を行った。TBEV をマウスに皮下感染させると高接種量では早い時期、低接種量では遅い時期の致死性を示した。早い時期の致死性は中枢神経組織全体にわたる神経細胞へのウイルス感染が直接の致死性の原因であると考えられた。一方、遅い時期の致死性は脳炎に加えて全身性の特異的な炎症反応とストレス応答が関わっていることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物系 農学

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：人畜共通感染症、ダニ媒介性脳炎ウイルス、脳炎フラビウウイルス、マウスモデル、神経侵入性、病原性、致死性

1. 研究開始当初の背景

フラビウイルス科に分類されるウイルスの多くは節足動物の吸血により媒介され、人に様々な重篤な症状を起こす人獣共通感染症の原因となる。なかでもダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）、日本脳炎ウイルス（JEV）、ウエストナイルウイルス（WNV）などの脳炎ウイルスによる疾患は、致死率が高く回復しても多くの例で後遺症が残るため公衆衛生上非常に問題となる。これらの感染症の克服には有

効なワクチン・治療薬の開発が不可欠であり、そのためにはウイルスの病原性発現機序を解明することが非常に重要となる。

2. 研究の目的

ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）Oshima 株とその感染性クローンである 0-IC-pt を用いたマウスモデルでの解析により、脳炎フラビウウイルス感染条件の違いによる病原性、神経侵

入性に関わる病原発現機序を解析する。

3. 研究の方法

研究開始当初は TBEV Oshima 株と O-IC-pt を用いる予定であったが、予備実験により当初の予想と異なる結果が得られたため、TBEV Oshima 株のみを用いた。

C57BL マウスに TBEV Oshima 株の接種量を変えて皮下感染させ、発症率、致死率、体内でのウイルス増殖、病理組織像、神経組織での炎症反応（浸潤細胞数、炎症性サイトカイン発現量）、血中サイトカイン量の解析を行った。

4. 研究成果

(1) TBEV Oshima 株をマウスに皮下感染させると、一般的な接種量—致死率曲線にならず、接種量に依存しない致死率を示した（図 1）。ここで、 10^2 PFU 以上接種のすべてのマウスでウイルスの神経組織への侵襲・それに伴う臨床症状がみられたが、一部のマウスは回復して生き残ったため、すなわち必ずしも神経侵入性は致死性の指標とならないことが示された。この点が当初の予想と異なっており、これまで一般的に考えられていた神経侵入性＝致死性という概念を考え直すきっかけとなる有意義な結果であった。

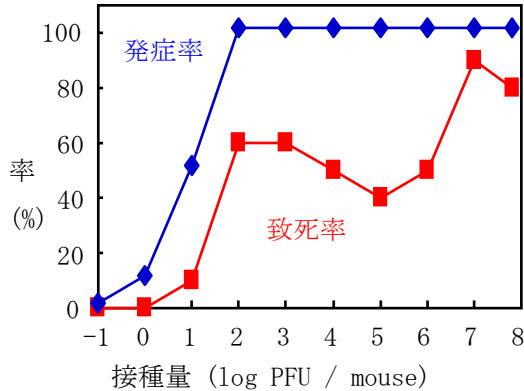


図 1 皮下接種後の接種量—致死率曲線

(2) そこで、マウスモデルにおける病原性の指標となる致死性についてさらに解析をすすめた。高接種量 (10^7 PFU) では致死率は 90% で、マウスは感染後早い時期（7 日目から）で死にはじめた。このとき、中枢神経組織全体にわたるウイルス感染（図 2）とそれに伴う神経細胞壊死が観察されたことから、ウイルス感染による広範囲な神経細胞機能障害が直接の致死性の原因であると考えられた（図 3）。

ウイルス量 (Log PFU / g tissue)

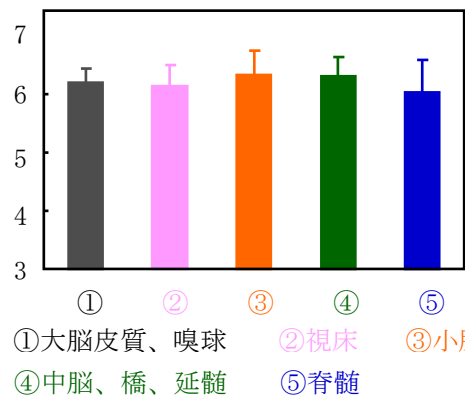


図 2 高接種量における早い時期の中枢神経組織におけるウイルス量

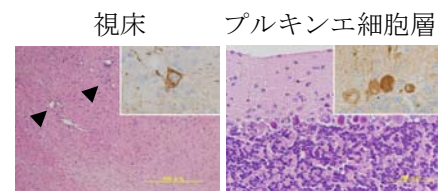


図 3 高接種量における早い時期の中枢神経組織における病理像

(3) 低接種量 (10^3 PFU) では致死率は 40% で、マウスが死ぬのは遅い時期（12 日目以降）であった。すべての感染マウスで中枢神経組織へのウイルス感染、炎症反応がみられたが、早い時期においては脳皮質に特異的なウイルス感染であったため（図 4）、高接種量の場合と異なっていた。したがって、低接種量では神経侵入性とその後の脳炎だけで致死性を決めるのではなく、それ以外の要因が致死性に関わっていることが示唆された。

ウイルス量 (Log PFU / g tissue)

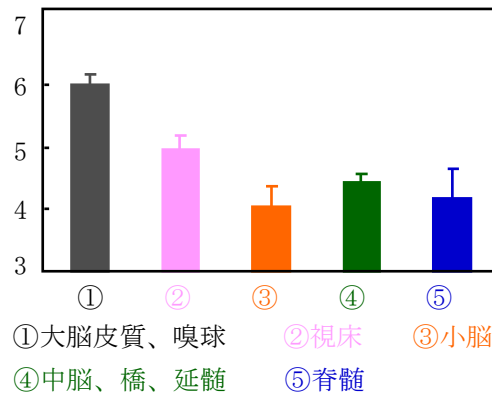


図 4 低接種量における早い時期の中枢神経組織におけるウイルス量

(4) そこで、遅い時期の致死性に関わる要因をさらに調べるために、低接種量後のマウスで体重減少率により致死マウスと回復マウスの区別がつくことを明らかにした(図5)。そして、低接種量では遅い時期において小脳に特異的なウイルス感染がみられたが(図6)、そのウイルス量、主な炎症性細胞浸潤、炎症性サイトカイン発現には致死マウスと回復マウスで有意な差はみられなかった(図7)。ただし、脳におけるTNF α の発現量は致死マウスで高かった。

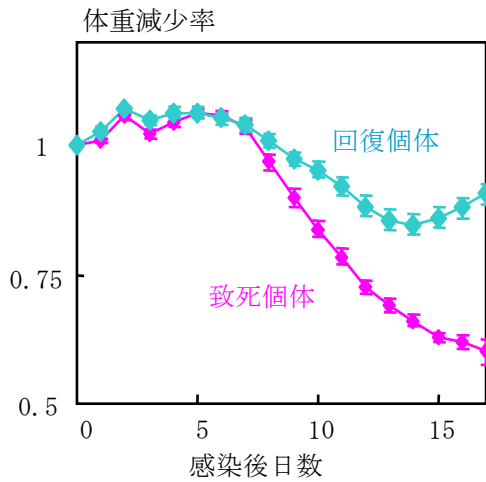


図5 低接種量における致死マウスと回復マウスの体重減少曲線

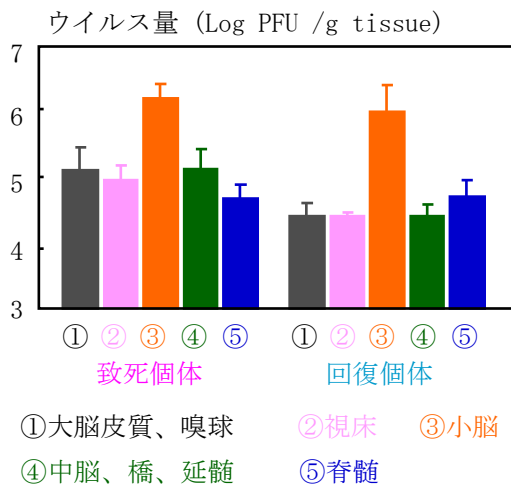


図6 低接種量における遅い時期の中中枢神経組織におけるウイルス量

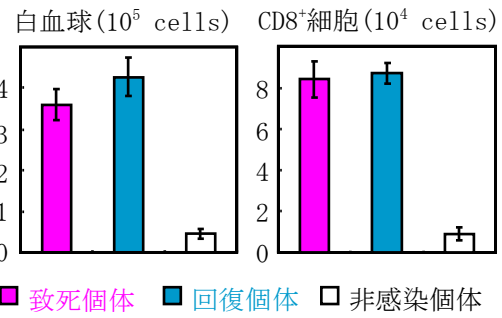


図7 低接種量における遅い時期の中中枢神経組織における炎症性細胞浸潤

(5) 次に中枢神経組織以外の組織において致死マウスと回復マウスで違いが見られないかを調べた。その結果、致死マウスでは回復マウスおよび非感染マウスにくらべ、胸腺と脾臓の著しい萎縮がみられ、胸腺細胞数および脾細胞数の減少がみられた(図8)。

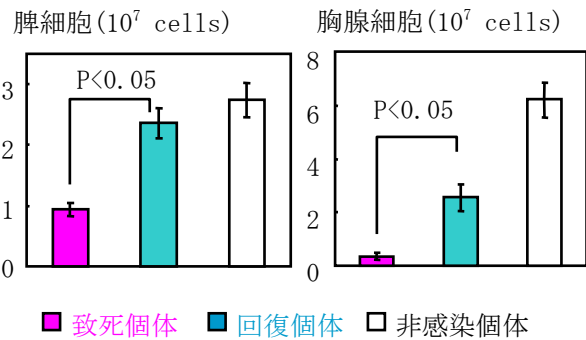


図8 低接種量における遅い時期の胸腺および脾細胞数

(6) さらに全身性の応答に違いがないかを調べるために、致死マウスと回復マウスの血中サイトカインおよびホルモン量を測定した。その結果、致死マウスにおいて血中コルチコステロン量が上昇していた(図9)。これらのことから、致死マウスでは全身性の激しいストレス応答が起きていることが明らかになった。また、致死マウスでは血中TNF α 量の上昇がみられたため(図9)、特異的な免疫反応の関与も示唆された。

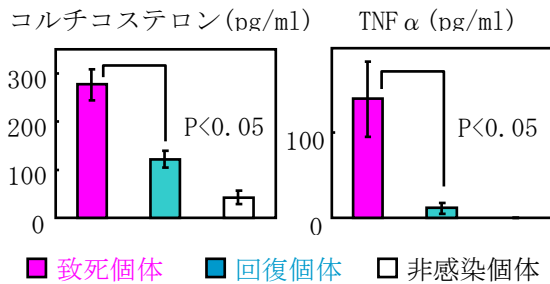


図9 低接種量における遅い時期の血中コレステロンおよびTNF α 量

(7) 本研究で示された「遅い時期の致死性」は申請者自身が明らかにした新しい概念であるため、今後のフラビウイルス脳炎研究のブレークスルーになると期待される。特に、人での病態の重症化・致死性に関して、これまでは単に脳炎が激しいためという考え方であったが、実際にはそれだけでは説明できない事象も多く、本研究で得られる情報は人での病態に深く関わるものであると考えられる。したがって、本研究で得られた研究成果をもとに今後フラビウイルス脳炎の研究がさらにすすむものと思われる。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Daisuke Hayasaka, Noriyo Nagata, Hideki Hasegawa, Tetsutaro Sata, Satoshi Koike, Mortality determinants of subcutaneous infection with Tick-borne encephalitis virus in mice model, 42nd Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program, 2008年5月28日、Nagasaki
- ② 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、小池 智、ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性発現機序の解析、第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2008年5月31日、観音寺
- ③ 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、小池 智、マウスモデルにおいてダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) 皮下接種後にみられる早い時期と遅い時期の致死性、第146回日本獣医学会学術集会、2008年9月24日、宮崎
- ④ 早坂大輔、脳炎性フラビウイルスはどこから神経組織に侵入するのか、第15回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2008

年10月25日、岡山

- ⑤ 早坂大輔、永田典代、藤井克樹、長谷川秀樹、佐多徹太郎、鈴木隆二、小池 智、ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) の皮下接種マウスモデルにみられる早い時期と遅い時期の致死性、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日、岡山
- ⑥ 藤井克樹、早坂大輔、小池 智、北浦一考、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎、フラビウイルス脳炎における脳内の生体反応の解析: 第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月27日、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂 大輔 (HAYASAKA DAISUKE)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・主任研究員
研究者番号: 10346926

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

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