



HOKKAIDO  
UNIVERSITY

第13回ウイルス学キャンプ in 湯河原

# ダニ媒介性フラビウイルスの神経病態発現機序

**好井 健太郎**

北海道大学 大学院獣医学研究科  
公衆衛生学教室

# フラビウイルス感染症

フラビウイルス科フラビウイルス属：

節足動物媒介性ウイルス

→ヒト・ウマ・家畜・鳥類・野生動物に感染



人獣共通感染症として重要なフラビウイルス感染症

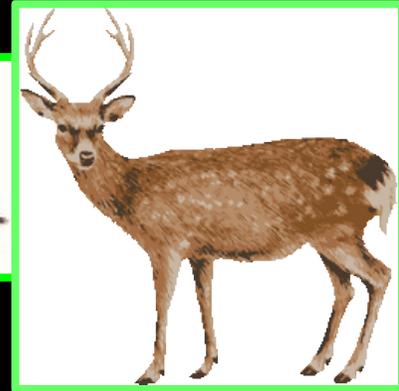
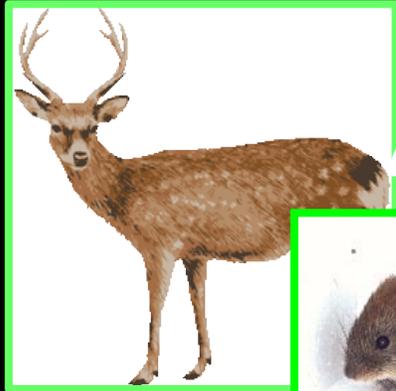
フラビウイルス	媒介節足動物	症状	病原巣動物	
ダニ媒介性脳炎 (TBE)	ダニ	脳炎	野生げっ歯類	北海道で患者発生・ 流行巣確認
日本脳炎	蚊	脳炎	豚、鳥類	日本は全国的に常在地
ウエストナイル熱	蚊	発熱、脳炎	鳥類	
黄熱	蚊	肝炎、出血熱	ヒト、サル	
デング熱	蚊	発熱、出血熱	ヒト、(サル)	
ジカ熱	蚊	発熱、小頭症？	ヒト	

# ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) の感染環

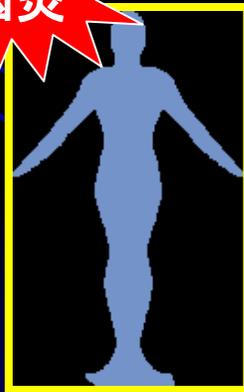
マダニ

経齢間伝達  
経卵巣伝達

野生動物



Tick bite



ヒト



Tick bite

家畜・伴侶動物  
(無症状?)

Infection via raw milk

# ダニ媒介性脳炎 (TBE) の疫学



Subtype

ヨーロッパ型

シベリア型

極東型

症状

重篤度低い  
二峰性発熱

やや重篤な脳炎  
持続感染あり

重篤度高い  
急性髄膜脳炎

致死率

1 ~ 2 %

2 ~ 3 %

20% ~

# 日本におけるダニ媒介性脳炎(TBE)

## Topic

1. 日本におけるダニ媒介性脳炎
2. TBEVによる病態発現機序の研究
  - TBEVの高病原性化に関わる因子
  - 神経細胞特異的なTBEV増殖機構



# 日本におけるダニ媒介性脳炎(TBE)

1993年 上磯町(現 北斗市)

日本で初めてのダニ媒介性脳炎患者発生



# 日本におけるダニ媒介性脳炎(TBE)

## 脳炎患者の略歴

患者:37歳、女性 酪農経営者の主婦

既往症;日本脳炎ワクチン接種歴あり(学童時)、海外渡航歴なし

## 脳炎患者の病歴

平成5年10月 39度台の発熱、吐気、頭痛、複視などの脳炎症状

痙攣発作、挿管し人工呼吸

11月 運動麻痺など後遺症を残し回復、

平成16年現在 車椅子の生活



# 脳炎患者の血液・髄液抗体検査成績

## Anti-JEV

### IgG- ELISA

Serum (day 6)	1600
Serum (day 43)	16000
Spinal fluid (52 day)	1600

- 北海道は日本脳炎非流行地域
- 蚊の活動しない季節(10月末)の事例

Dr. Morita *et al*



# 脳炎患者の血液・髄液抗体検査成績

	Anti-JEV				Anti-TBEV
	IgG-ELISA	IgM-ELISA	HI	Neutralization test	Neutralization test
Serum (day 6)	1600	<100	20	10	640
Serum (day 43)	16000	<100	160	20	2560
Spinal fluid (52 day)	1600	<10	20	NT	NT

Dr. Morita *et al*



# 日本におけるダニ媒介性脳炎(TBE)

## 脳炎患者の略歴

患者:37歳、女性 酪農経営者の主婦

既往症;日本脳炎ワクチン接種歴あり(学童時)、海外渡航歴なし

⇒ 患者は、日本国内(北海道)においてTBEVに感染した!?



# イヌを歩哨動物としたTBEの疫学調査(1995)

Dog No.	date				
	4/22	5/4	5/13	5/20	5/27
4	<20	160	80	40	80
5	<20	<20*	640	320	160
6	<20	80	80	80	80
8	<20	<20	<20	<20*	160
9	<20	<20	<20	<20*	160

\*TBEV was isolated from blood



# ヤマトマダニからのウイルス分離

ダニ種	発育 ステージ	性別	捕集 マダニ数	マダニ プール数	陽性 プール数
<i>Ixodes ovatus</i>	成ダニ	♀	300	15	2
	成ダニ	♂	300	15	0
合計			600	30	2



# 野鼠における抗体調査 (1995-1996)

種族	陽性数/総数	
	1995年	1996年
<i>Apodemus speciosus</i>	2/11	2/13
<i>Myodes rufocanus</i>	3/16	11/79
<i>Apodemus argenteus</i>	1/11	0/26
<i>Rattus norvegicus</i>	1/4	1/1
<i>Sorex unguiculatus</i>	0/2	0/4
<i>Sorex spp.</i>	ND	0/2
合計	7/44(15.9%)	14/125(11.2%)



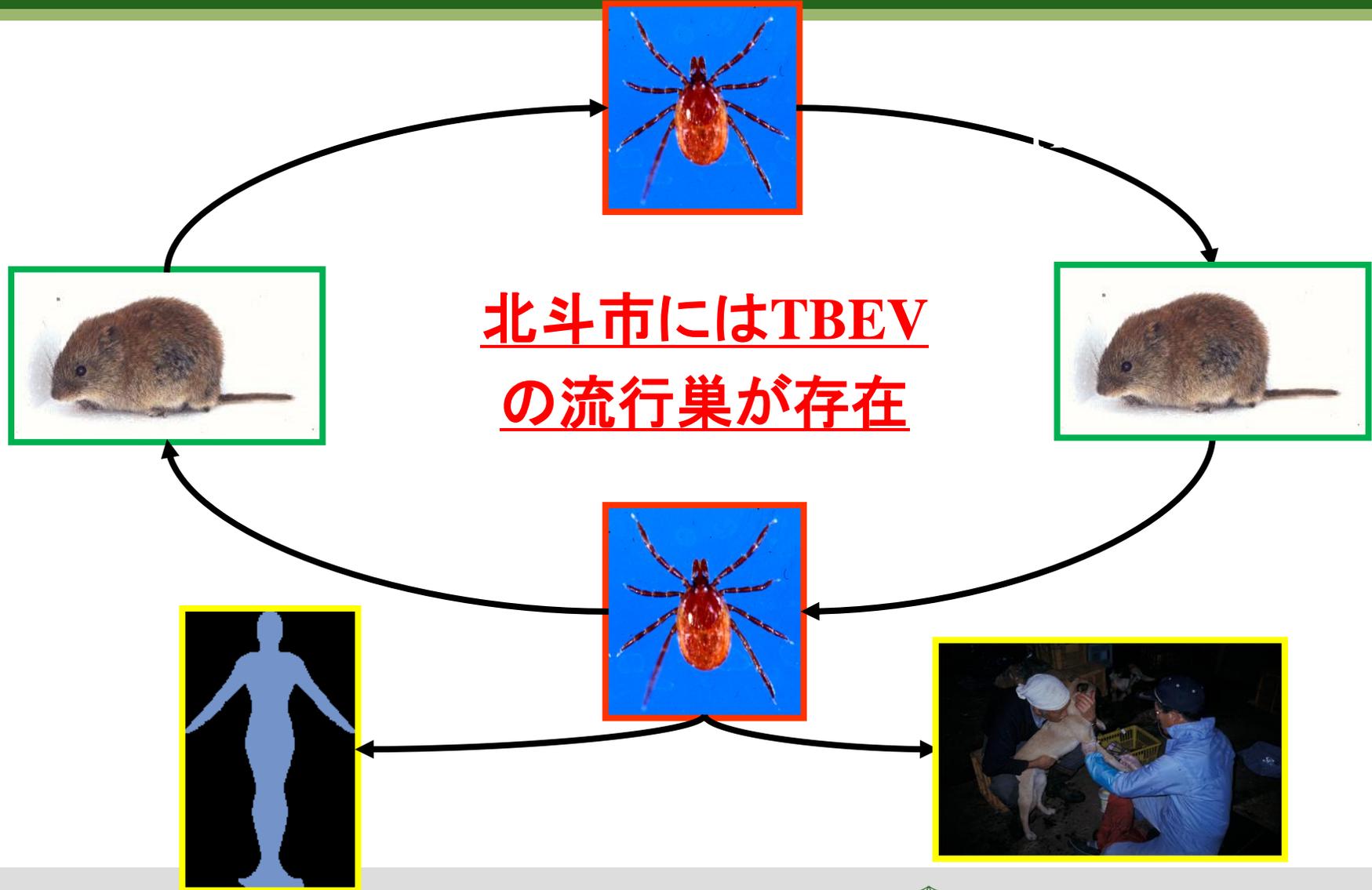
*A. speciosus*



*M. rufocanus*



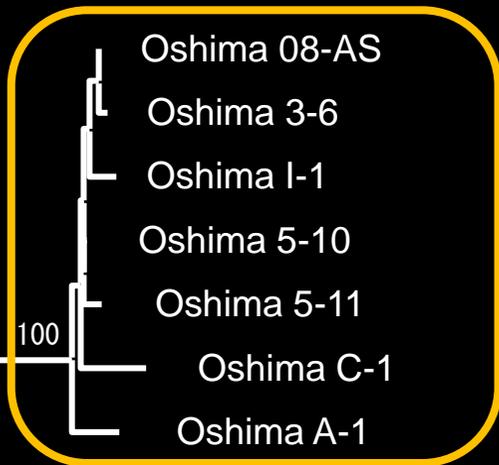
# ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)の感染環



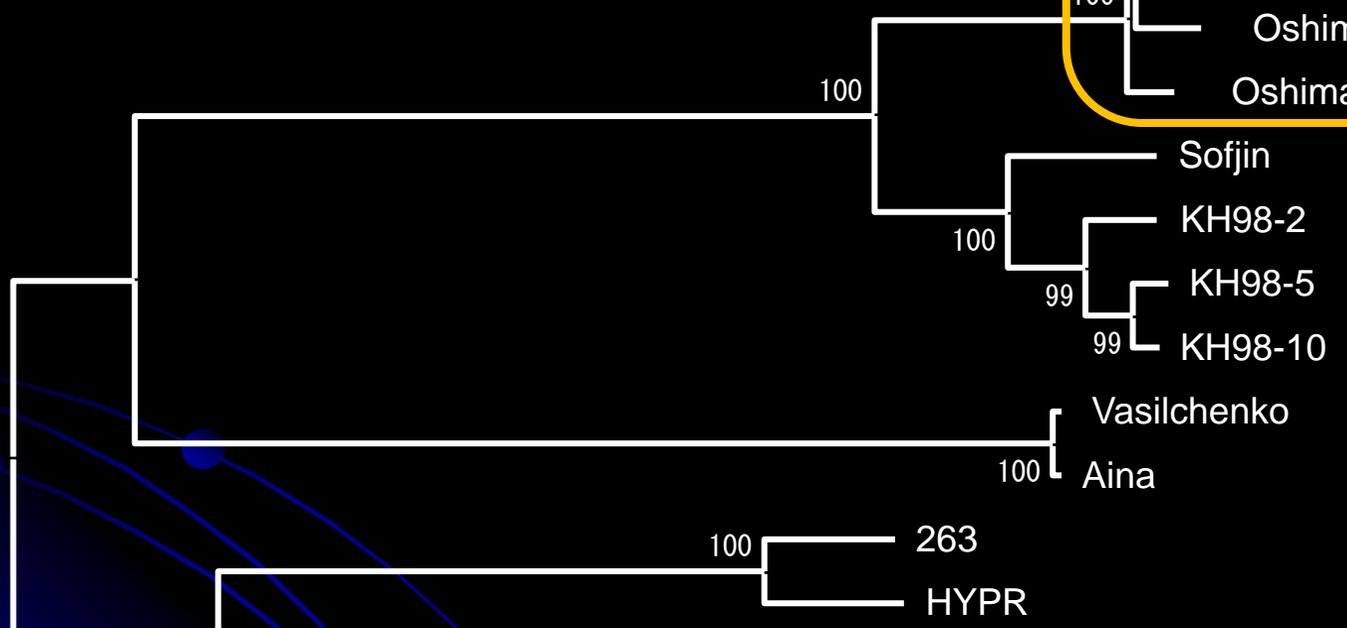
# TBEVの遺伝子RNAの系統樹

北海道分離株は病原性の高い極東型に属する

北海道分離株



極東型



シベリア型

ヨーロッパ型

跳躍病ウイルス

20

# 日本でのダニ媒介性脳炎(TBE)患者の発生:2016年

## 患者概要(北海道発表)

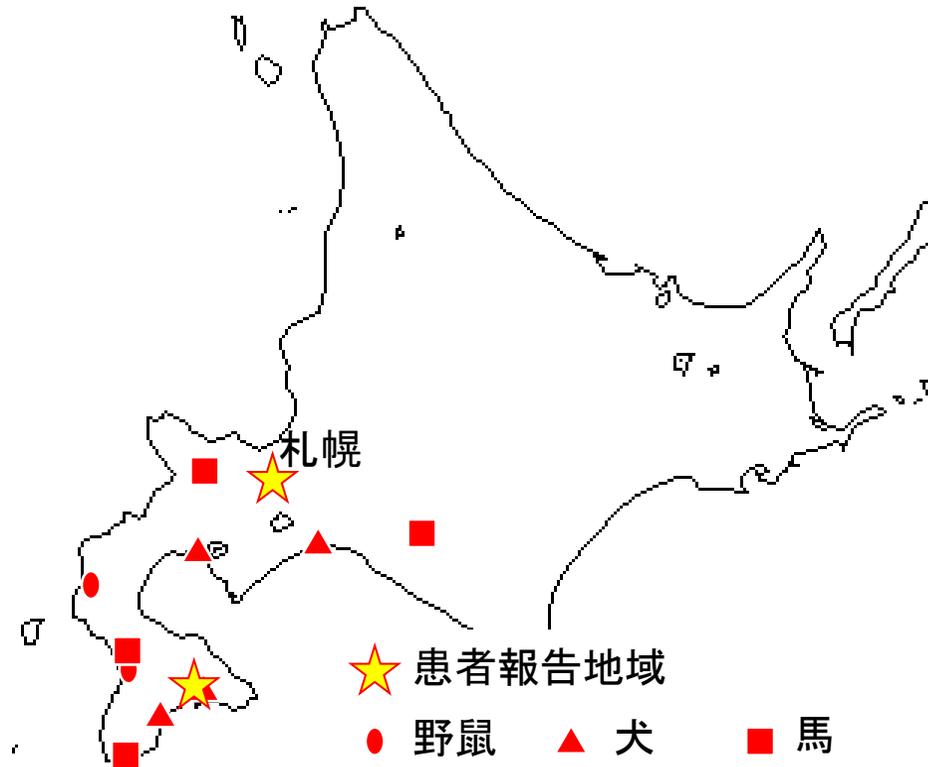
- (1) 年齢及び性別:40代(男性)
- (2) 発症経過:平成28年7月中旬、道内でダニに咬まれ、発症。
- (3) 症状:発熱、筋肉痛、麻痺、意識障害、痙攣、髄膜炎、脳炎  
→ **ダニによる吸血後、約1ヶ月後に死亡**
- (4) その他:渡航歴無し

\* 札幌市内の病院からの届出であるため、発生報告地:札幌となるが、**ダニに吸血されウイルスに感染した地域を示すわけではない。**



# 日本におけるダニ媒介性脳炎(TBE)

北海道の野鼠、馬、犬からの抗TBEV抗体陽性動物の検出地域



道央から道南にかけてTBEV流行巣の存在が示唆



# 小括：日本におけるダニ媒介性脳炎(TBE)

- 北海道：道央～道南にかけて流行巣が存在  
実際に脳炎患者も発生している。  
流行ウイルスは極東型
- 西日本にもTBEV(-like virus) の流行巣あり？

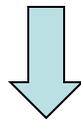
- 20年以上、北海道に流行巣は変わらず存在していて、人が感染する可能性は依然としてある。
- 何故23年間で2例しか報告がないのか？



# 何故23年間で2例しか報告がないのか？

~~実際に2人しかTBEVに感染していなくて、  
その2人共が、重症化して脳炎を呈するに至った。~~

- 他にも感染者はいたと考えるべき！  
(無症状感染者 ~ 軽症患者 ~ 重症患者)



何故、他に感染者が見つかっていないのか？



- 医療関係者も含めて認知度が低い(誰も疑わない・調べない)

- 今後は、人を対象とした感染状況の調査も行っていき、適切な予防対策(ワクチン導入等)を図るべき

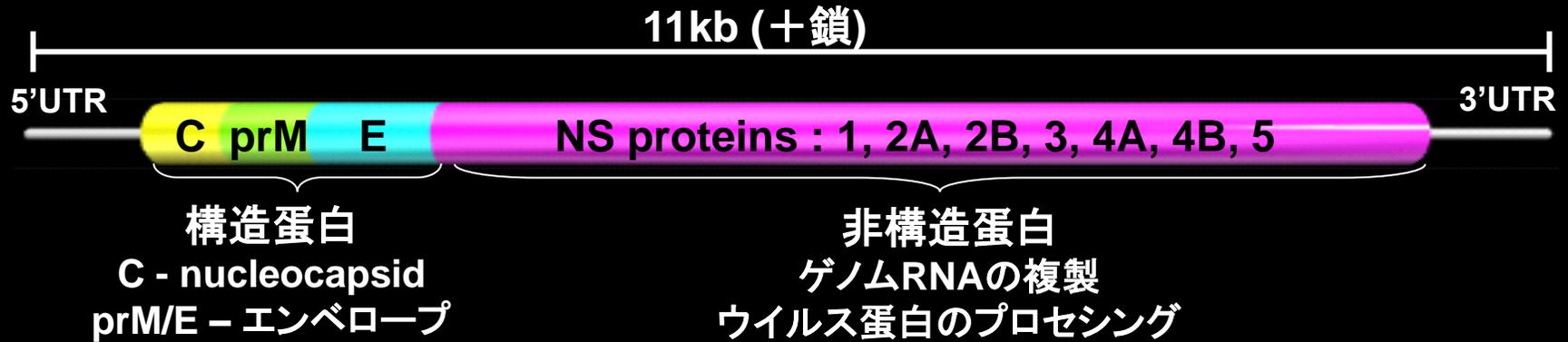
# 日本におけるダニ媒介性脳炎(TBE)

## Topic

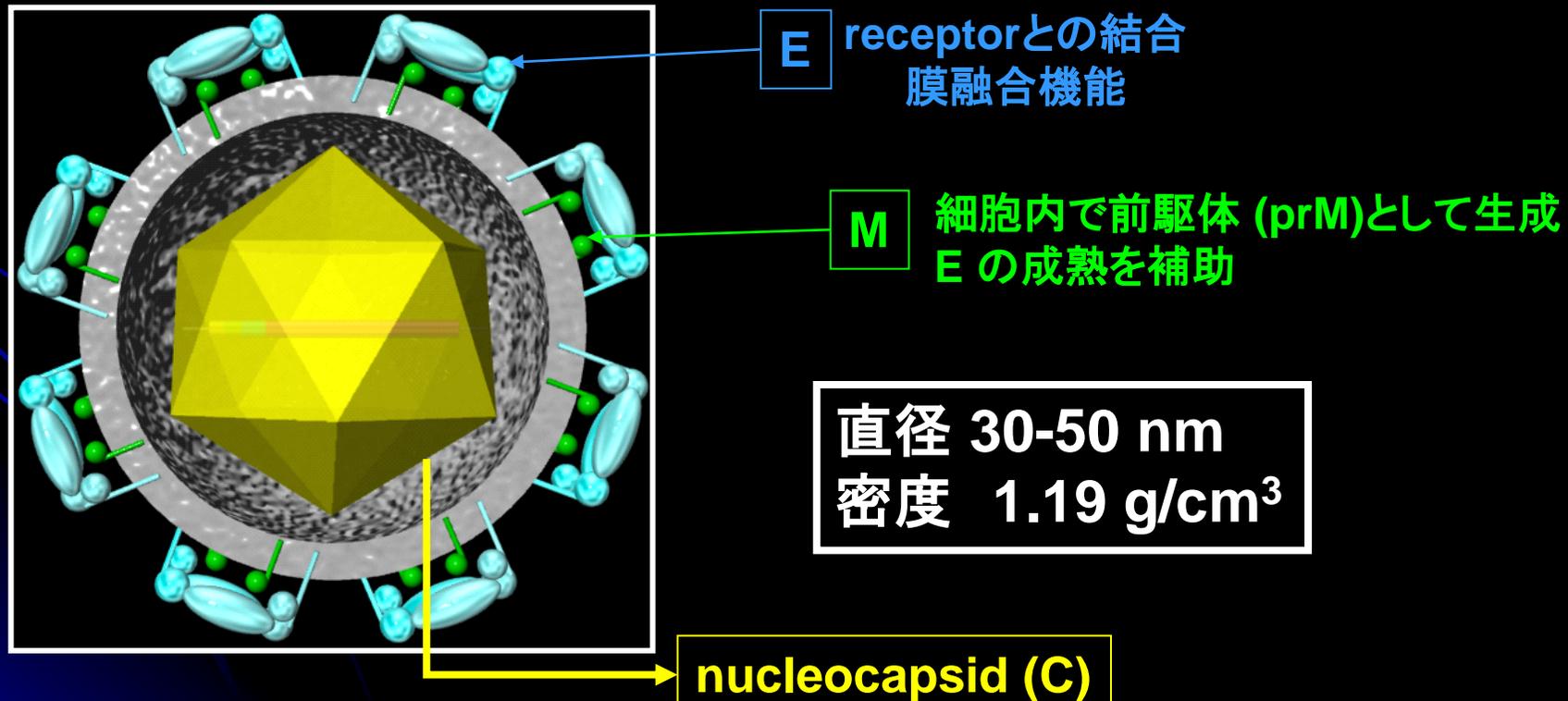
1. 日本におけるダニ媒介性脳炎
2. TBEVによる病態発現機序の研究
  - TBEVの高病原性化に関わる因子
  - 神経細胞特異的なTBEV増殖機構



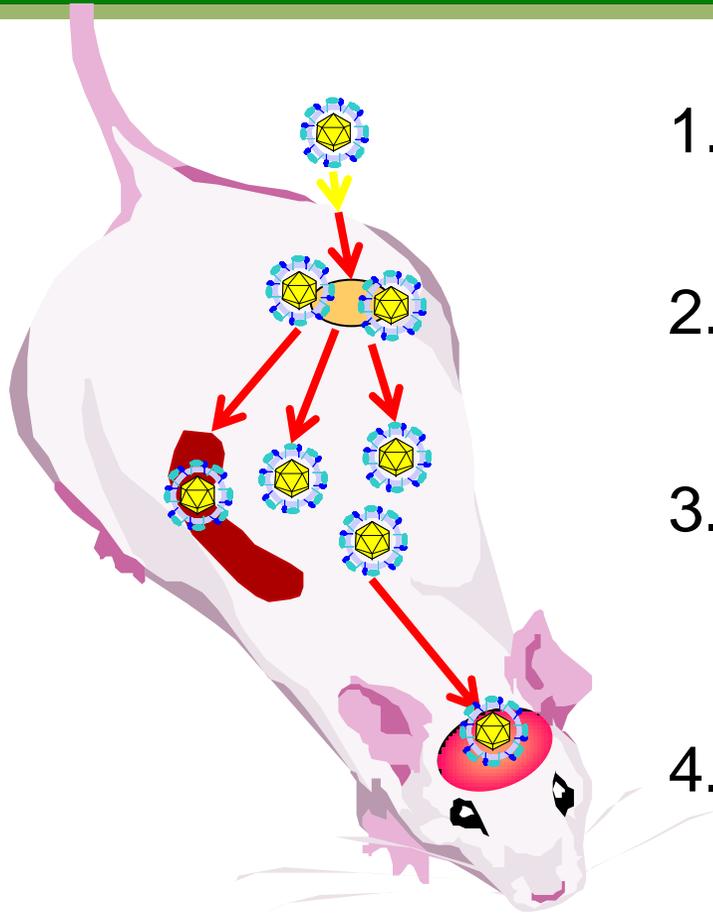
# フラビウイルスの遺伝子RNA構造



# フラビウイルスのウイルス粒子構造



# TBEV感染による病態発現



1. ウイルス感染
- ↓
2. 局所リンパ節での増殖
- ↓
3. ウイルス血症と末梢臓器での増殖
- ↓
4. 脳への侵入と増殖

中枢神経系への侵入・脳炎発症等  
詳細な病態発現機序は、ほとんど不明



# ヒト感染者由来極東型TBEVの系統樹解析

## 脳炎患者由来株



極東型

## Sofjin-HO株

1937年、ロシアのダニ媒介性脳炎患者の脳より分離。極東型標準株。

※脳炎患者由来株と近縁

## Oshima5-10株

1995年、北海道・患者発生地域の犬の血液より分離。

※不顕性感染者由来株と近縁

## 不顕性感染者由来株

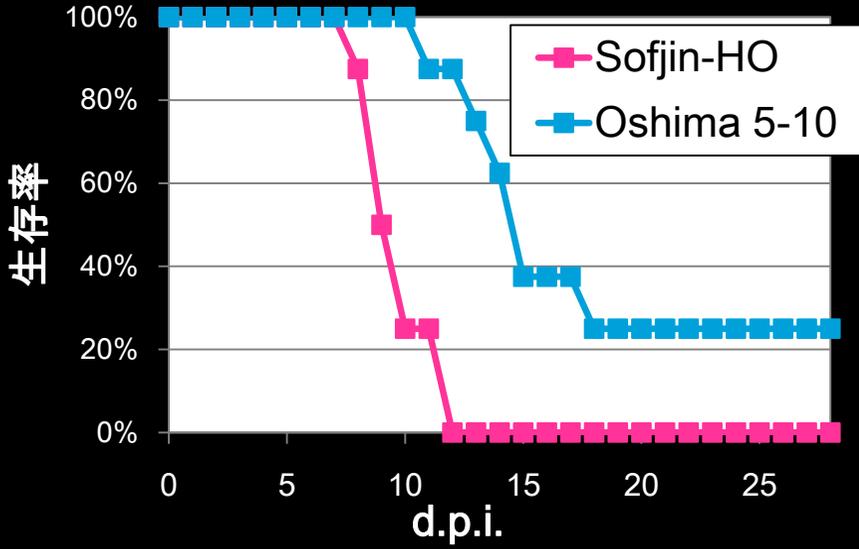


シベリア型

ヨーロッパ型

# Sofjin株およびOshima株の性状比較の成績 (Chiba et al., 1998, Vaccine.)

## マウスモデルにおける病原性



Sofjin株 > Oshima株

### Sofjin-HO



5'-UTR  
5塩基の相違

アミノ酸相違: 44ヶ所 (全3414アミノ酸中)

- 3'-UTR
- 12塩基の相違
  - Sofjin株に207塩基の欠損

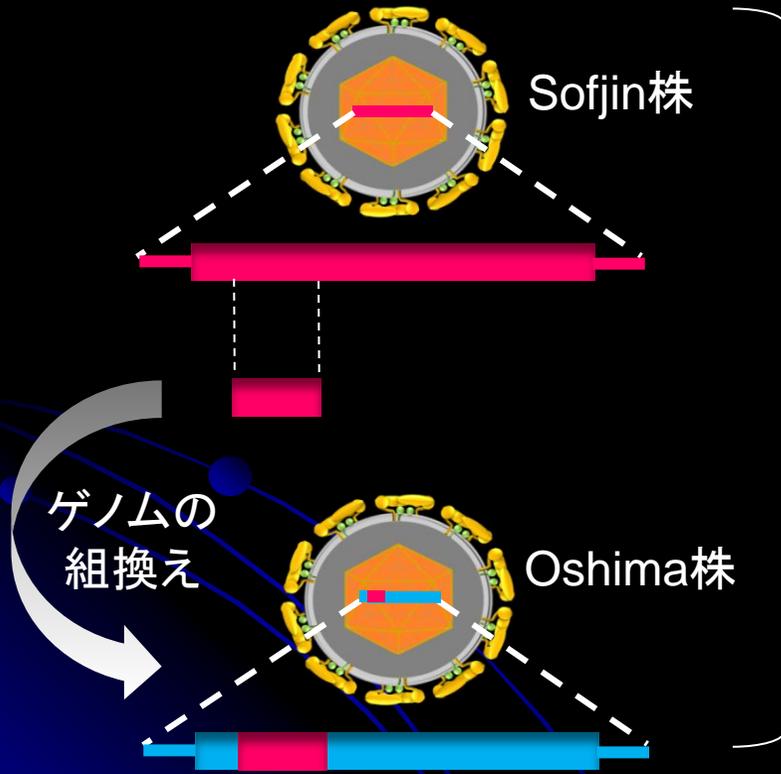


### Oshima5-10

# 実験の概要

組換えウイルス作製

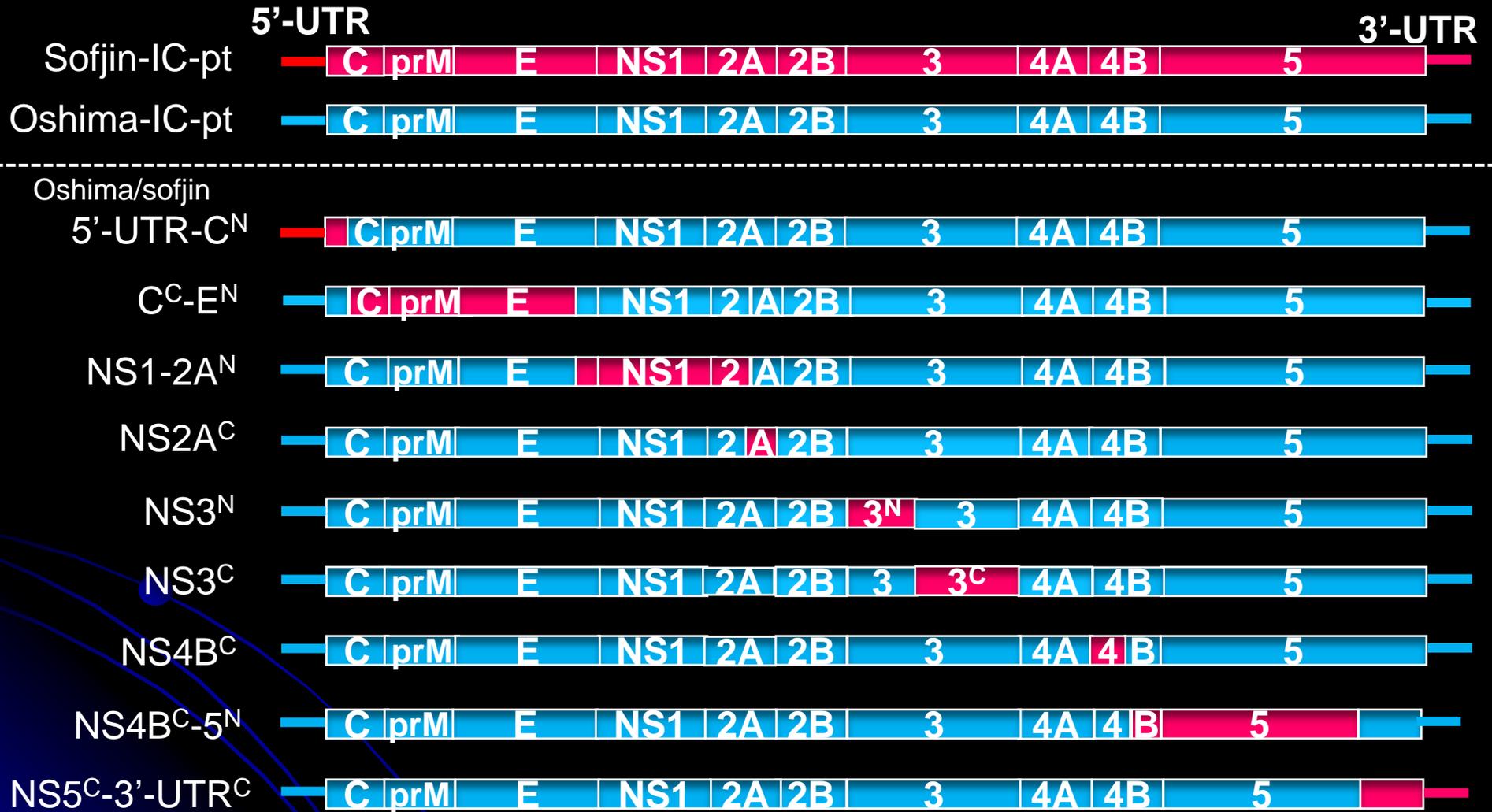
ウイルス性状解析



マウスでの病原性解析

株間の病原性の相違を決定している因子は何か？

# 組換えウイルスの作製



※ NS2B 及び NS4Aには、アミノ酸の相違がない。





# NS5のC末端及び3'-UTRの相違

Oshima/sofNS5-3'UTR



Sofjin-HO



欠損  
207 nt

2 nt

10 nt ...塩基の相違

Oshima5-10



variable  
region

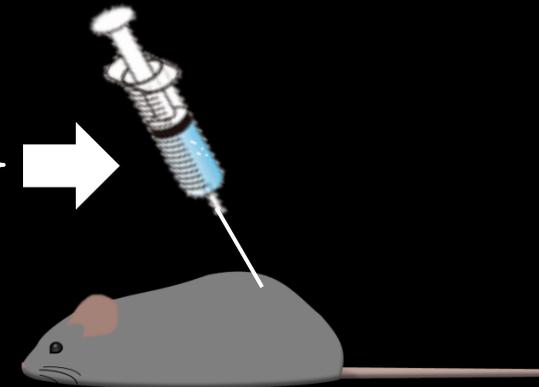
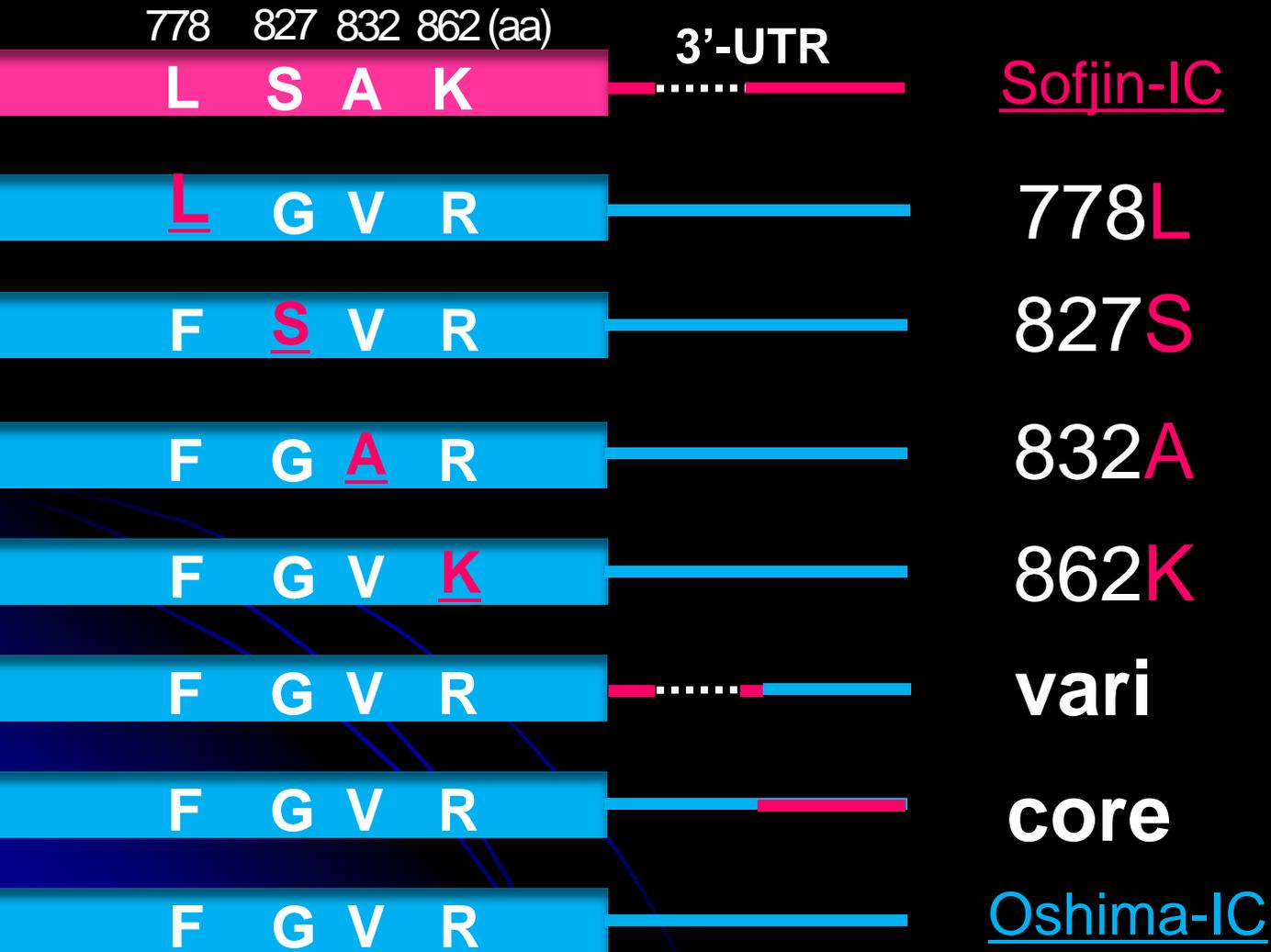
core  
element

(多様性が高い)

(保存性が高い)

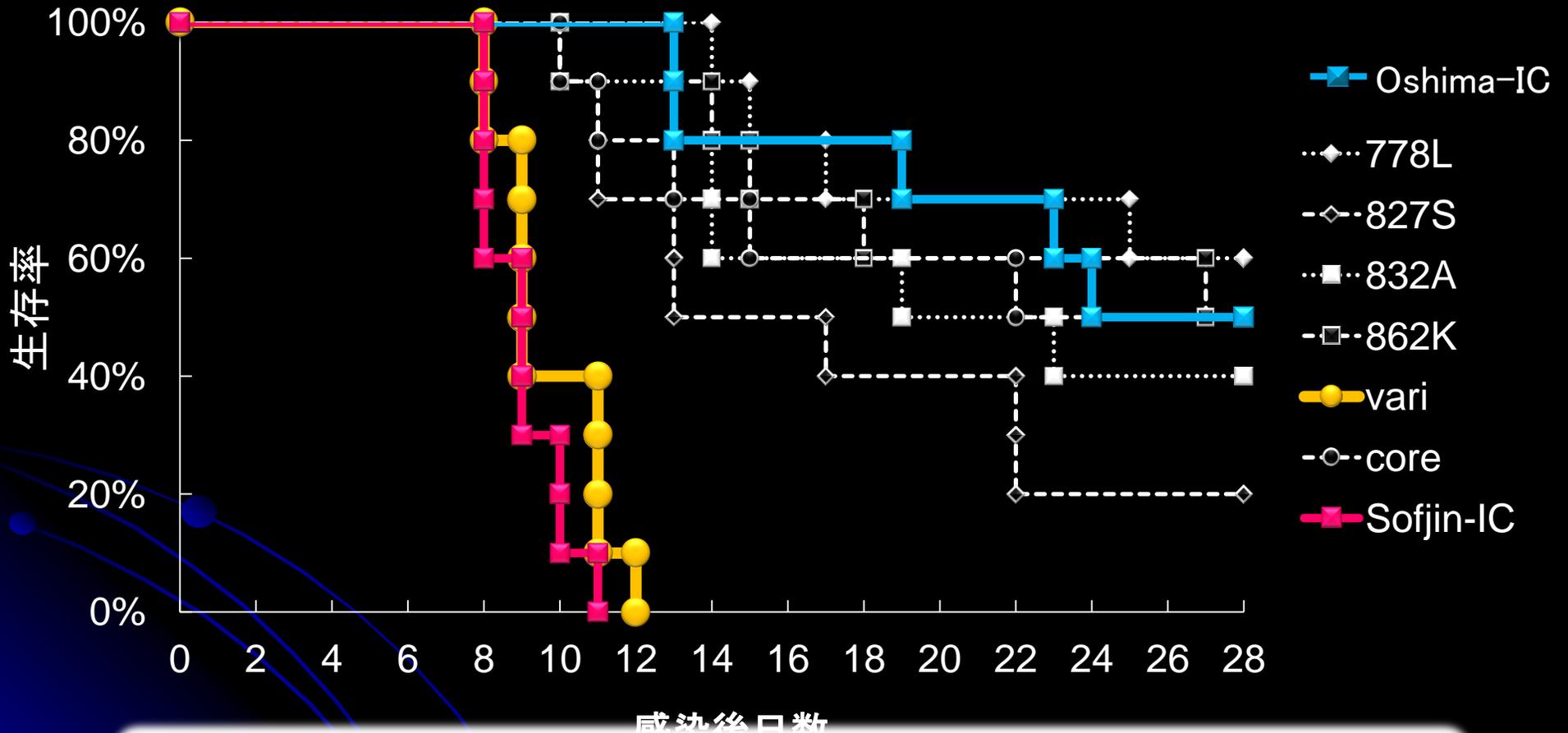
# 組換えウイルスの作製

## NS5領域及び3'UTRの組換え



# 結果② マウスへの病原性

(C57BL/6, 5週齡♀, 1,000 pfu皮下接種, n=10)



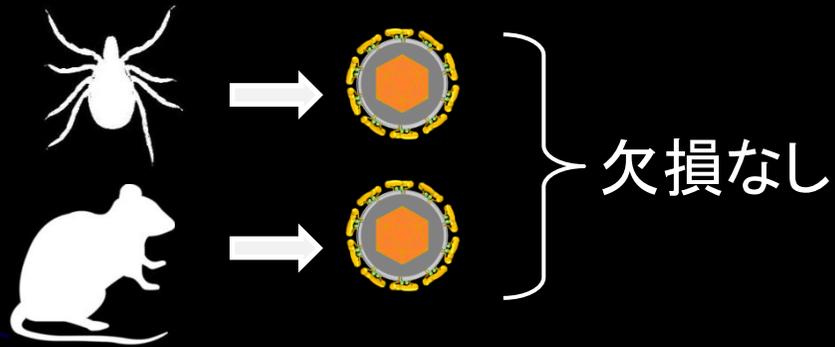
variable regionは、両株の病原性の相違に大きく影響する。

# 小括

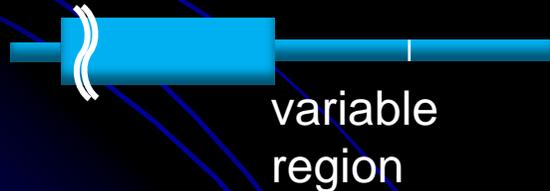
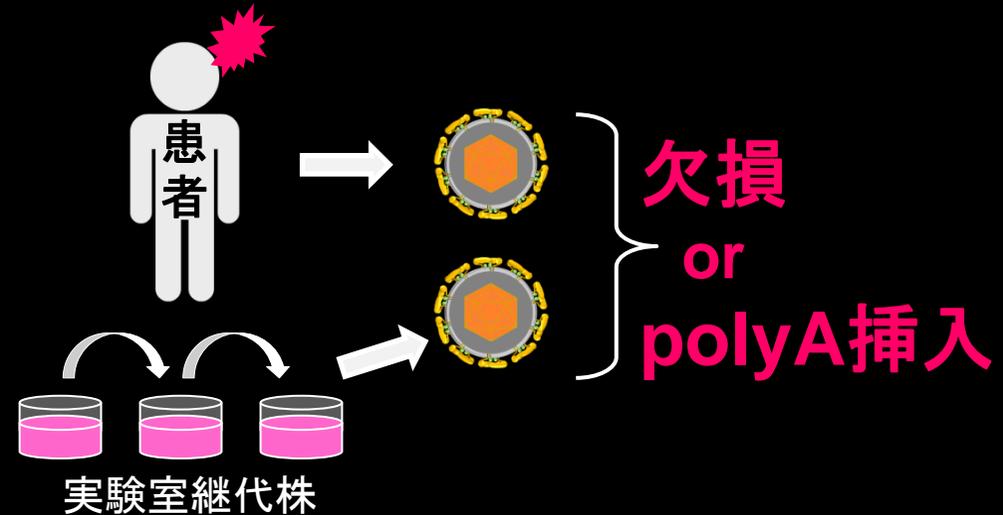
- ✓ 極東型TBEVの病原性は、複数のウイルス側因子によって決定される。
- ✓ 3'-UTRのvariable regionが、病原性に大きく影響している。

# 3'-UTR variable region

自然宿主(ダニ、野鼠)由来株



感染者由来株や実験室継代株



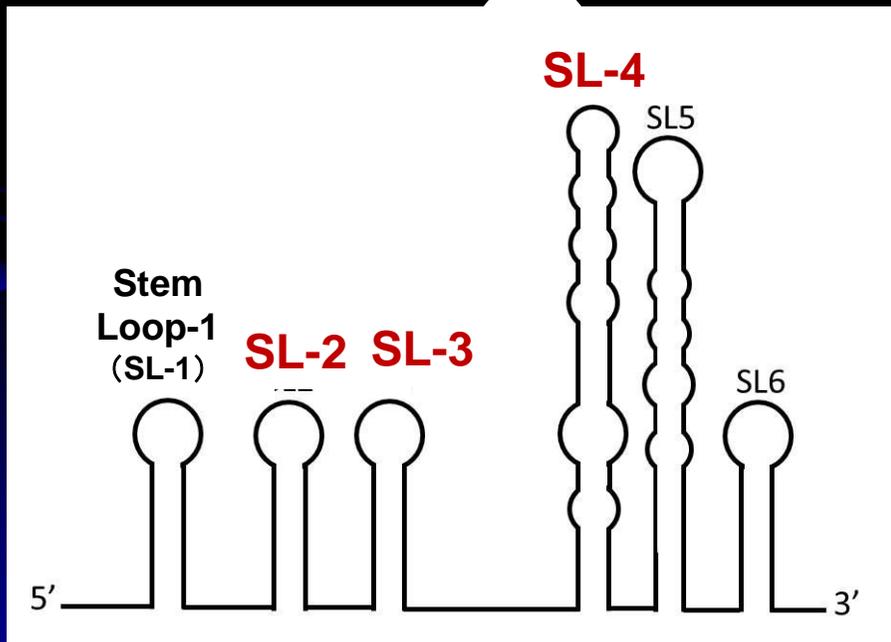
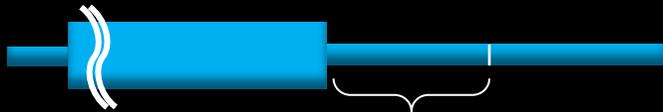
宿主への適応や病態発現に関わっている?

欠損  
or  
polyA挿入

# 3'-UTR variable regionの二次構造

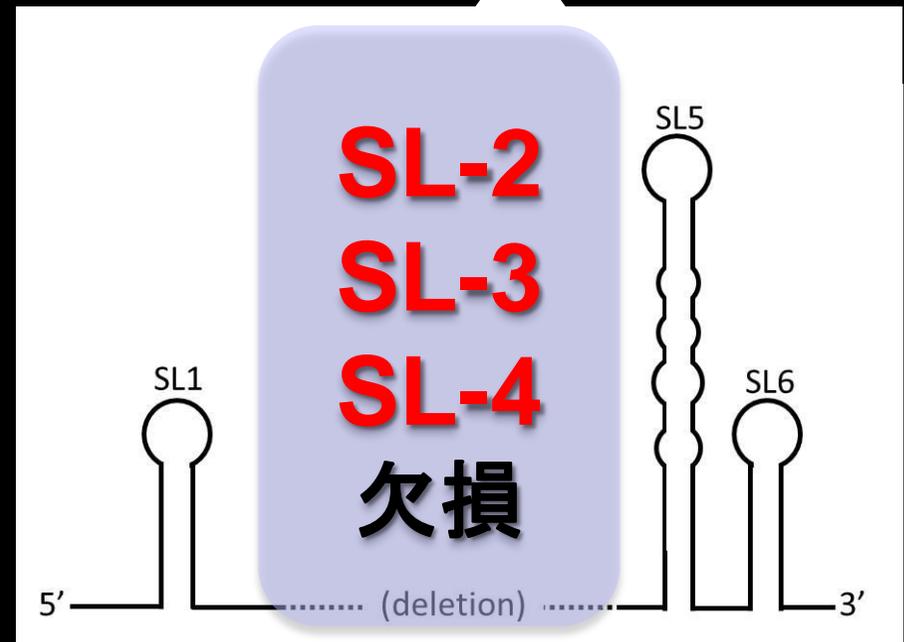
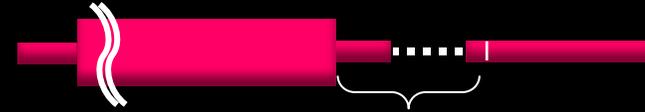
## Oshima5-10

(マウスへの病原性・**低**)

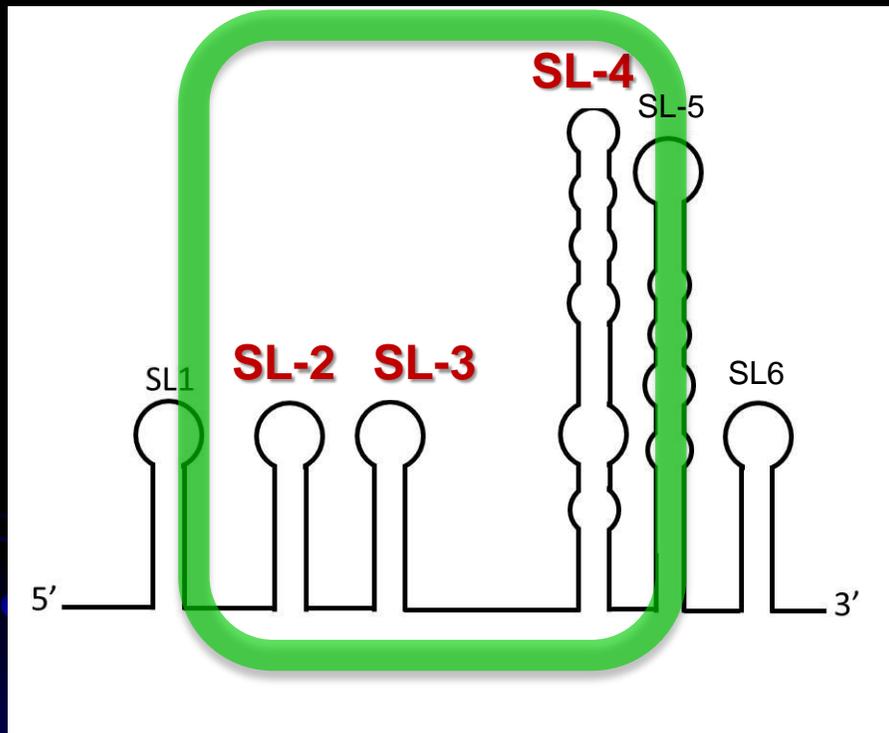


## Sofjin-HO

(マウスへの病原性・**高**)



# variable regionの高次構造が病原性に関与



Oshima5-10

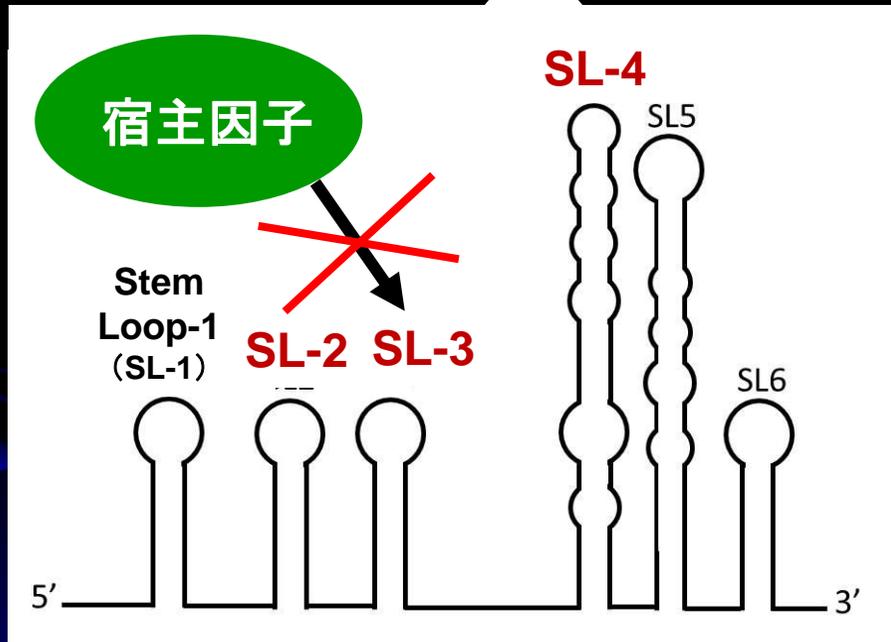
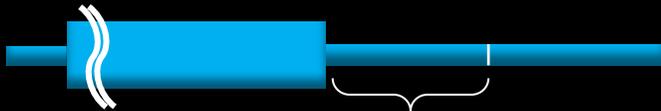
部分的欠損  
polyAの挿入 ➡ 病原性の上昇

特定の配列ではなく  
本領域の高次構造を  
特異的に認識する  
宿主側因子の関与？

病原性に影響

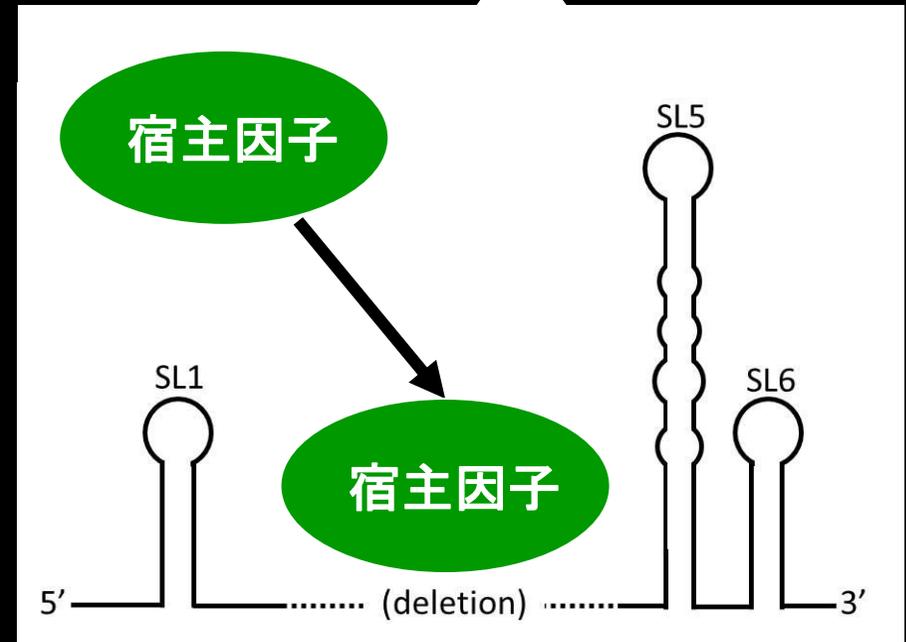
# Oshima5-10

(マウスへの病原性・**低**)



# Sofjin-HO

(マウスへの病原性・**高**)



**病態発現?**

# TBEVによる病態発現機序の研究

## ➤ TBEVの高病原性化に関わる因子 ~総括~

- ✓ 極東型TBEVの病原性は、複数のウイルス側因子によって決定される。
- ✓ 3'-UTRのvariable region領域全体が構成する高次構造が、病態発現において重要である。
- ✓ 3'-UTR variable regionは、宿主RNA結合蛋白との結合性に影響を与える

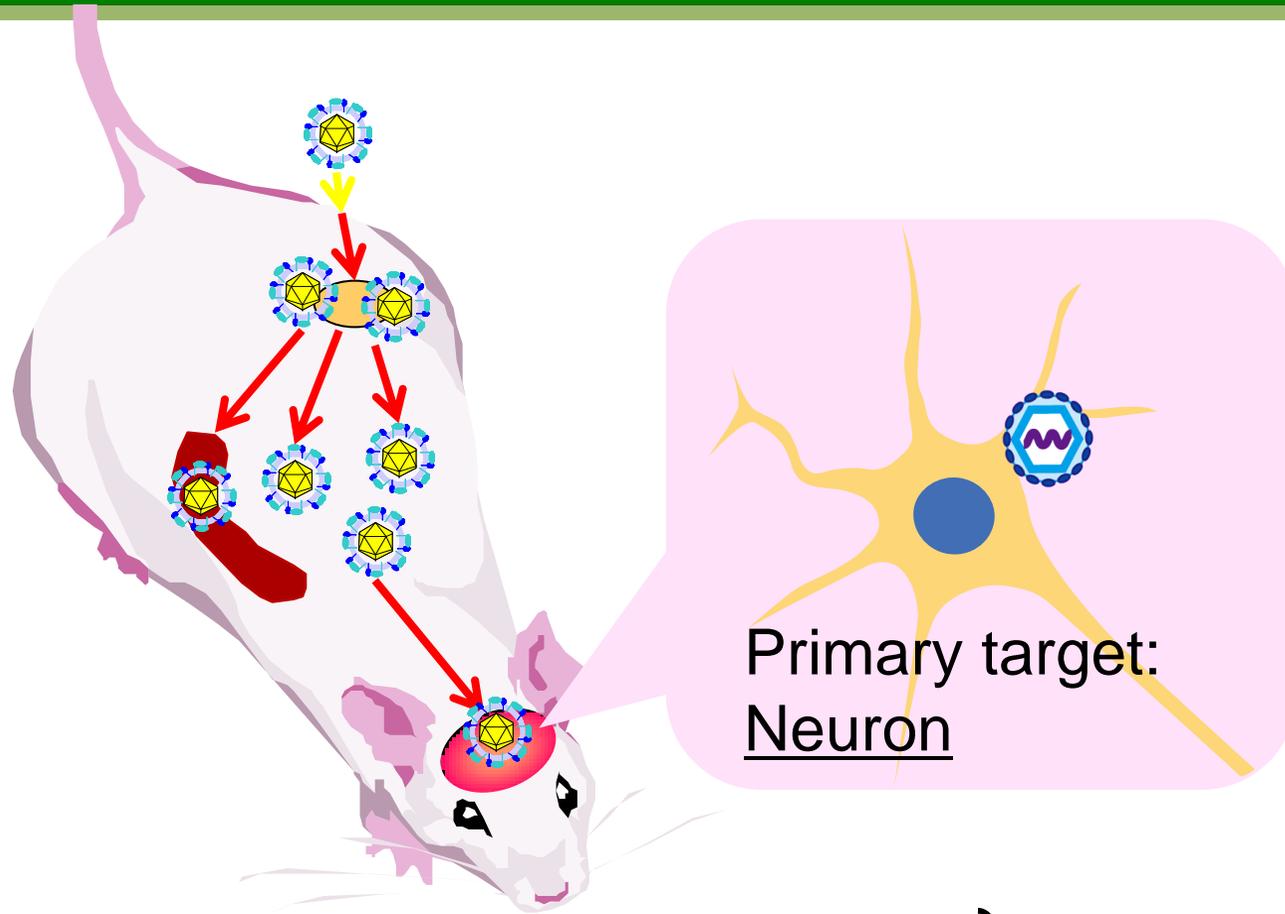
# 日本におけるダニ媒介性脳炎(TBE)

## Topic

1. 日本におけるダニ媒介性脳炎
2. TBEVによる病態発現機序の研究
  - TBEVの高病原性化に関わる因子
  - **神経細胞特異的なTBEV増殖機構**



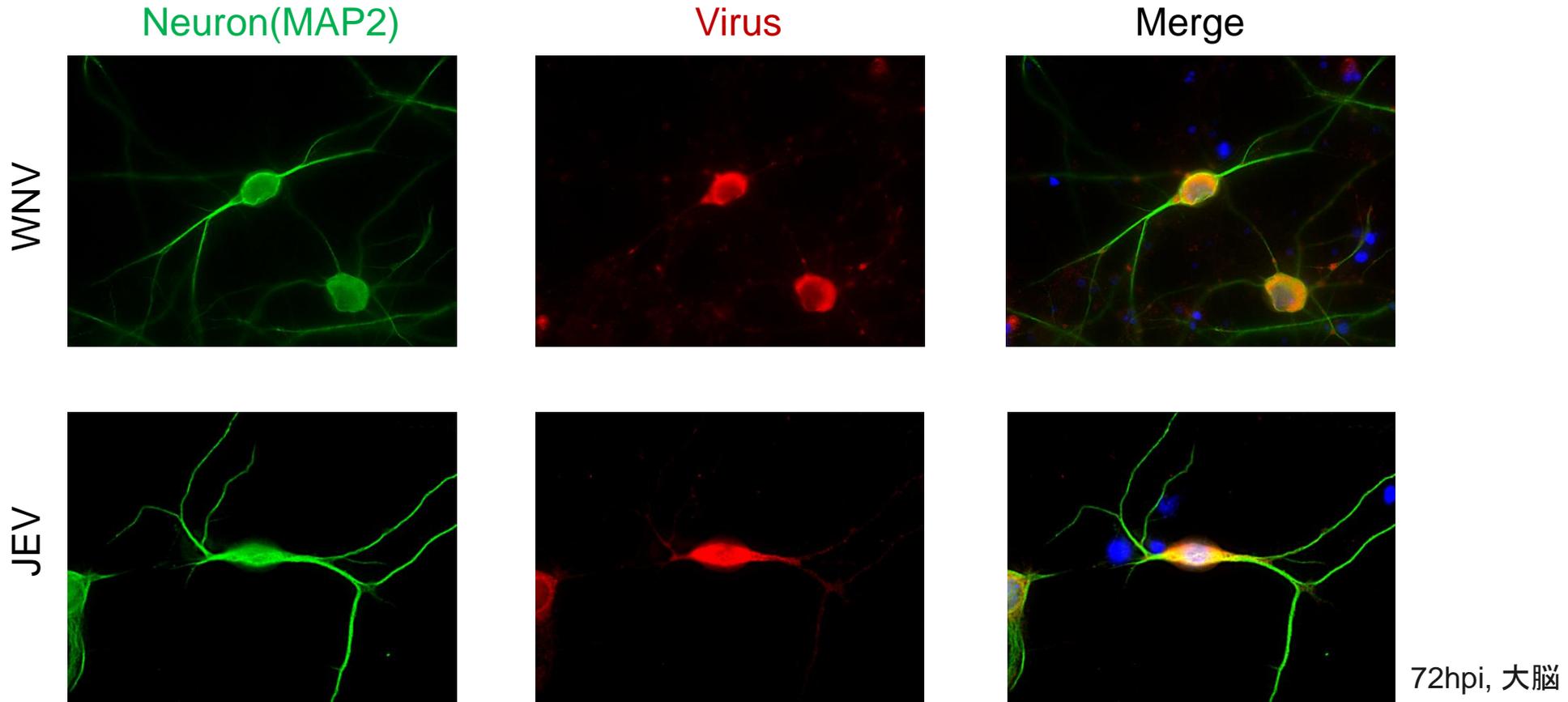
# 神経向性フラビウイルス感染による中枢神経病態発現



- 神経細胞内でのウイルスの複製機序
  - ウイルス複製が神経機能に与える影響
- } Unknown...



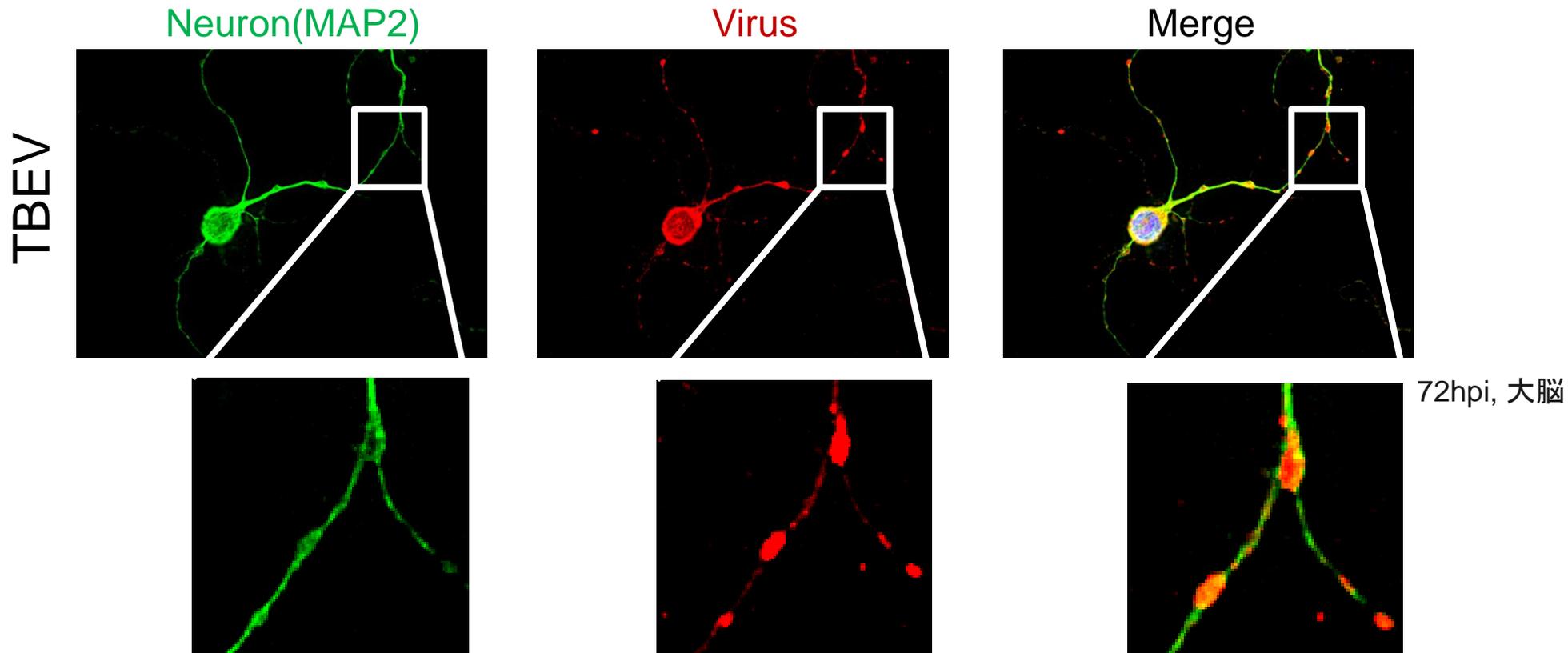
# 神経細胞内のウイルス抗原分布: Mosquito-borne Virus



Mosquito-borne Virus では樹状突起に沿って軽度に抗原分布する



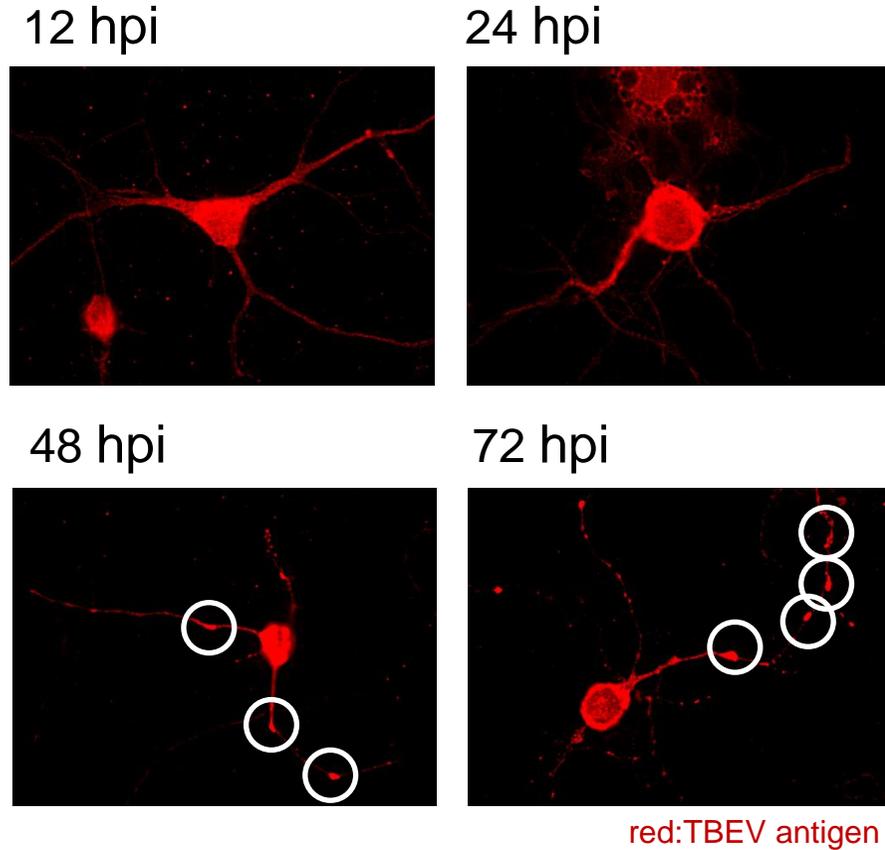
## 神経細胞内のウイルス抗原分布:TBEV



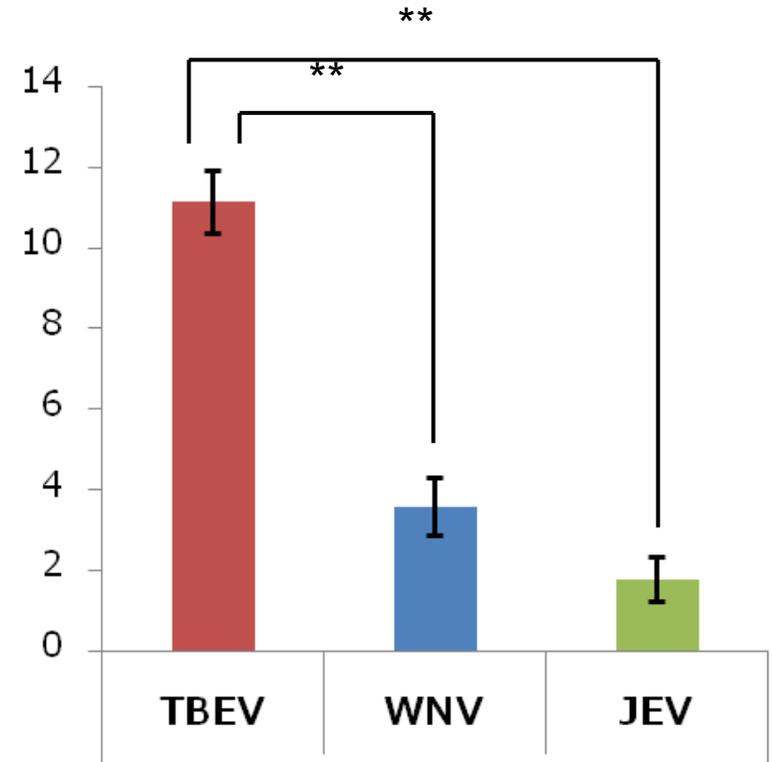
TBEV では樹状突起上に結節状の抗原集積が形成する



# TBEVの神経細胞内ウイルス抗原の経時的な動態



感染細胞あたりの抗原集積の数 (48hpi)

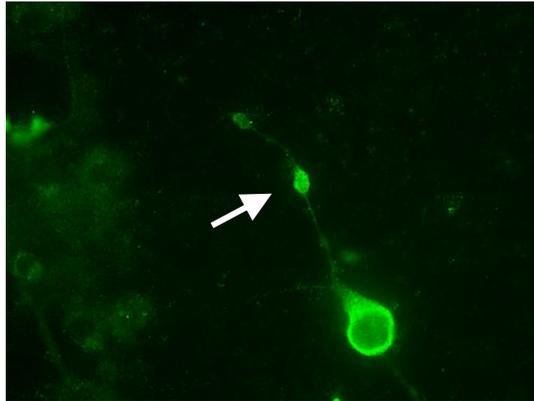


感染初期：神経細胞体中心に分布 → 時間経過とともに樹状突起上に抗原が集積

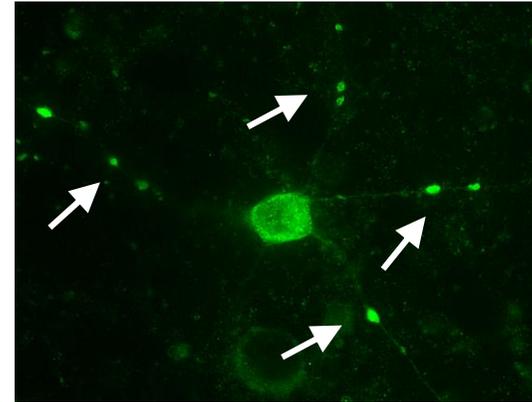


# 樹状突起上にした抗原蓄積を構成するTBEV 因子の特定

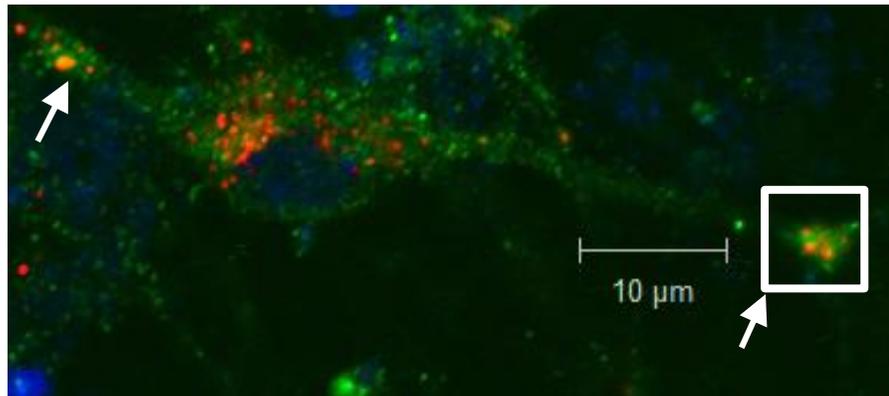
$\alpha$ -E (構造蛋白)



$\alpha$ -NS3 (非構造蛋白)

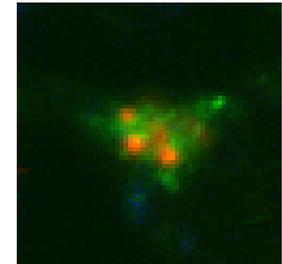
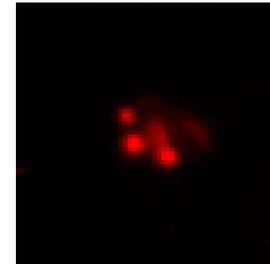
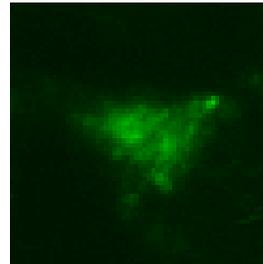


TBEV inf. 大脳  
72hpi



$\alpha$ -E  
(構造蛋白)

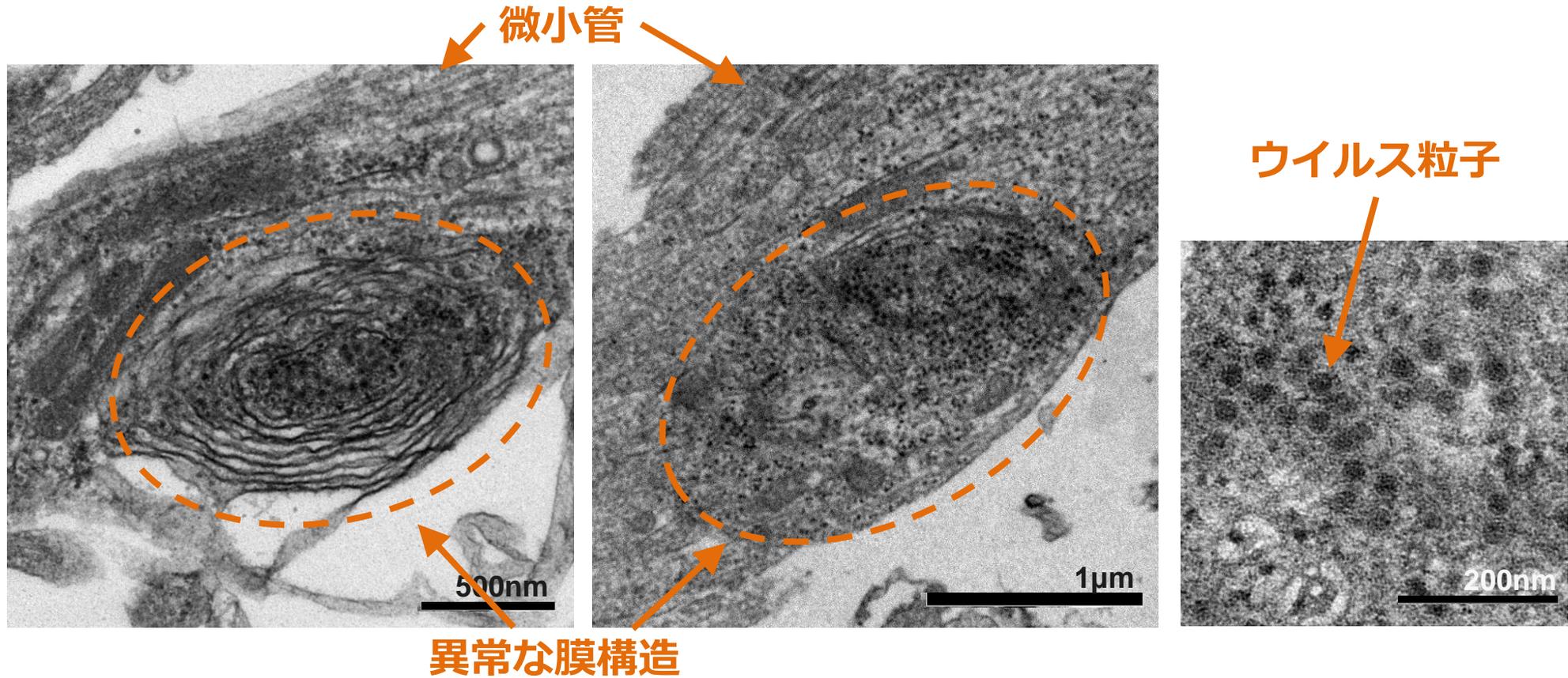
$\alpha$ -dsRNA  
(ウイルスゲノムRNA複製により形成)



樹状突起上の抗原蓄積では局所的なウイルスRNA複製が行われている



# 電子顕微鏡によるTBEV感染細胞の神経突起の観察



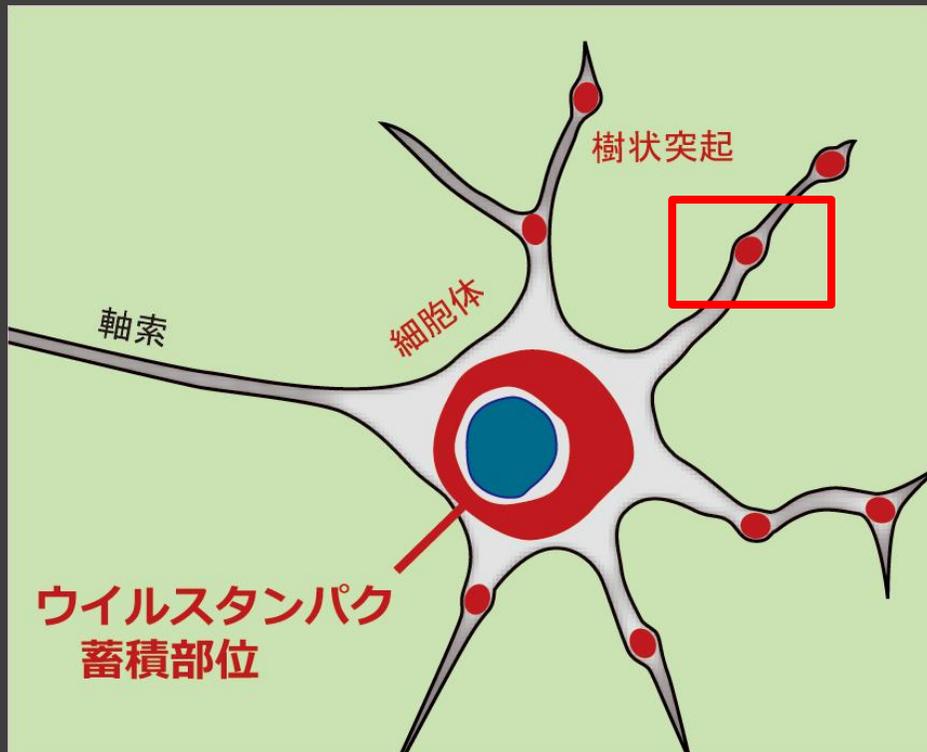
ダニ媒介性脳炎ウイルスの感染は神経突起上において内部にウイルス粒子を含む変性した膜構造を形成する



# 小括

TBEV特異的に、ウイルス感染した神経細胞の樹状突起上に**結節状のウイルス抗原**の蓄積が形成される。

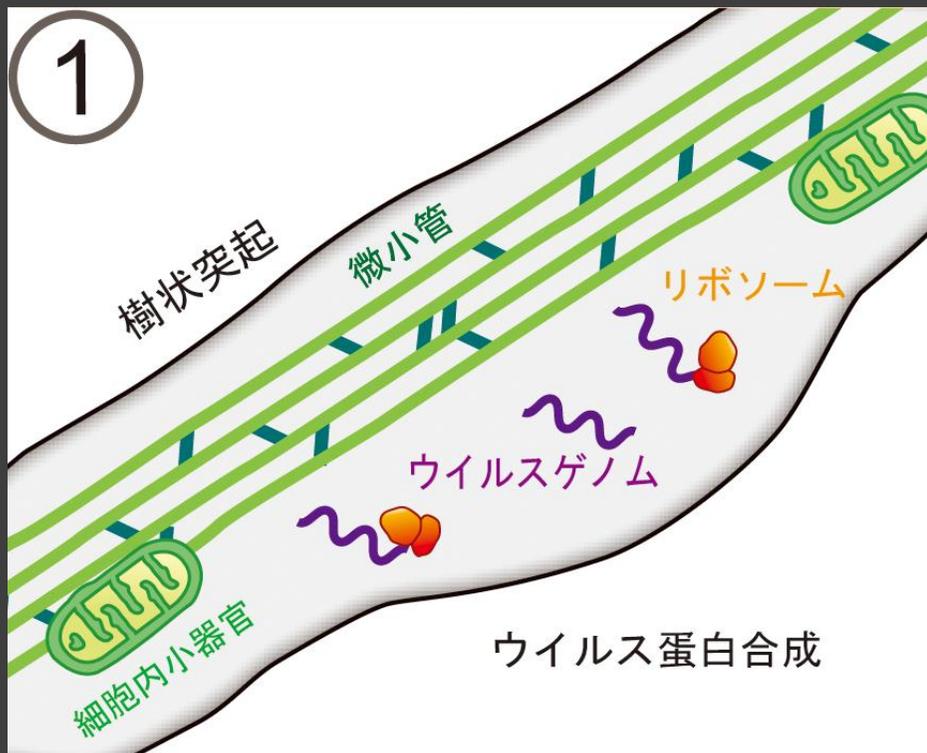
## 抗原集積形成モデル



# 小括

TBEV特異的に、ウイルス感染した神経細胞の樹状突起上に**結節状のウイルス抗原**の蓄積が形成される。

## 抗原集積形成モデル

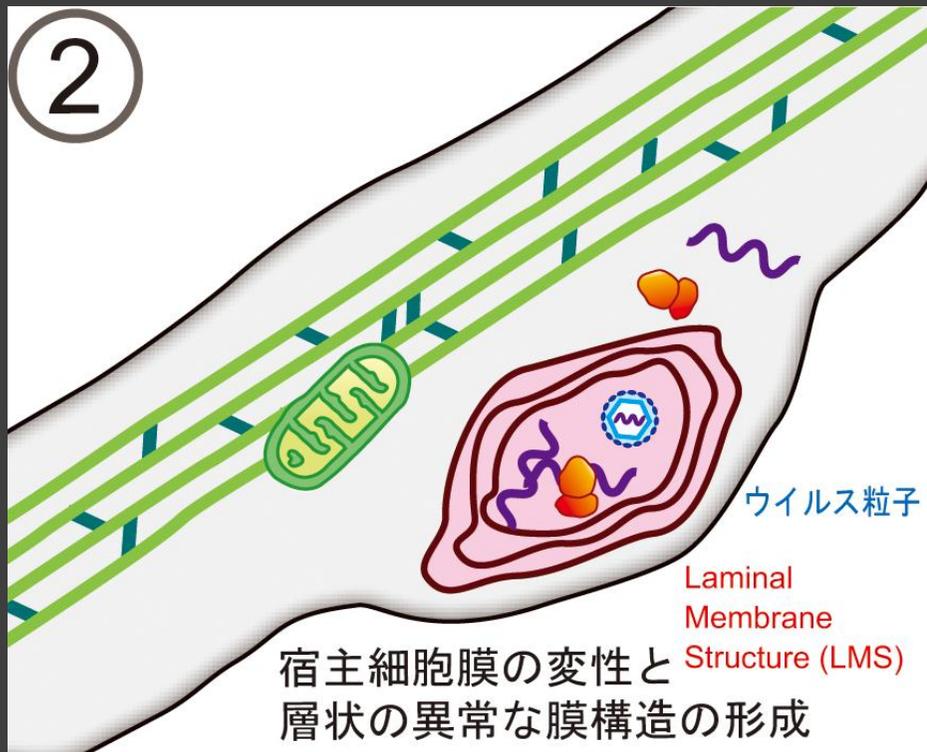


- ウイルスゲノムの樹状突起への移動・翻訳

# 小括

TBEV特異的に、ウイルス感染した神経細胞の樹状突起上に  
**結節状のウイルス抗原**の蓄積が形成される。

## 抗原集積形成モデル

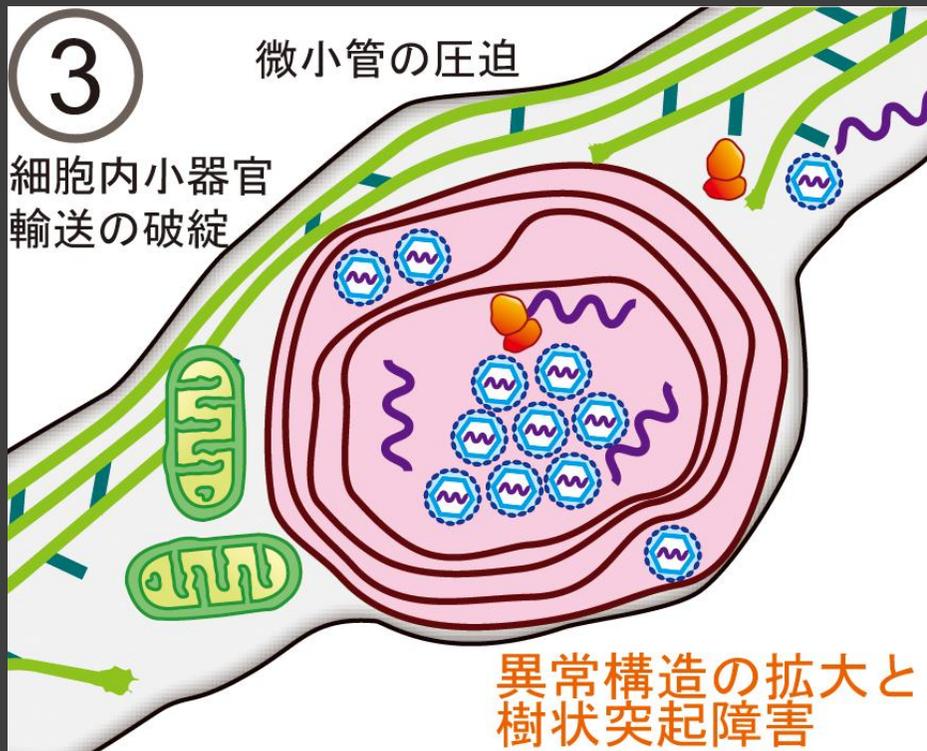


- ウイルスゲノムの樹状突起への移動・翻訳
- ゲノムレプリケーションと宿主膜構造の変性

# 小括

TBEV特異的に、ウイルス感染した神経細胞の樹状突起上に  
**結節状のウイルス抗原**の蓄積が形成される。

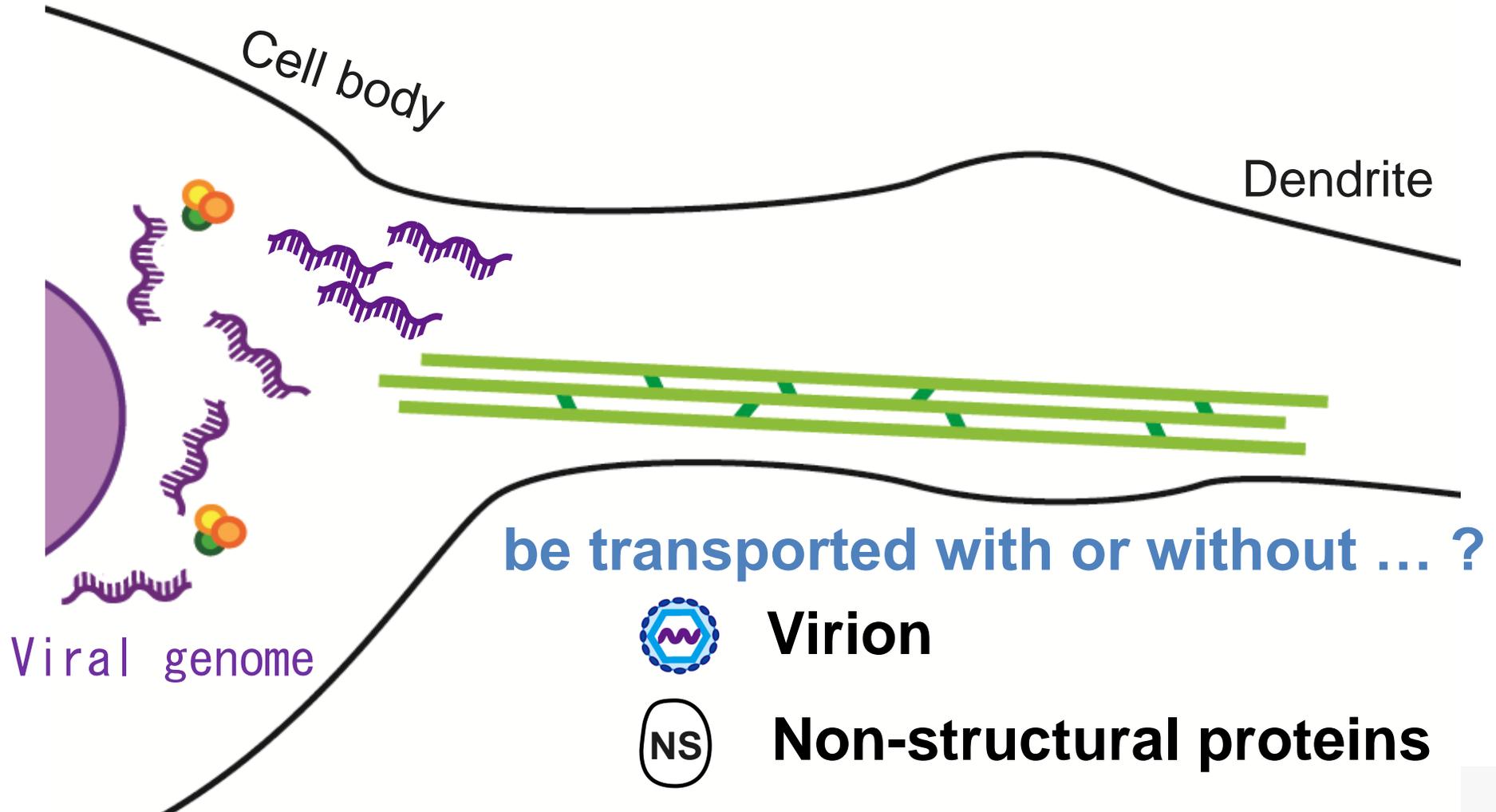
## 抗原集積形成モデル



- ウイルスゲノムの樹状突起への移動・翻訳
- ゲノムレプリケーションと宿主膜構造の変性
- ウイルスアセンブリと異常構造の拡大

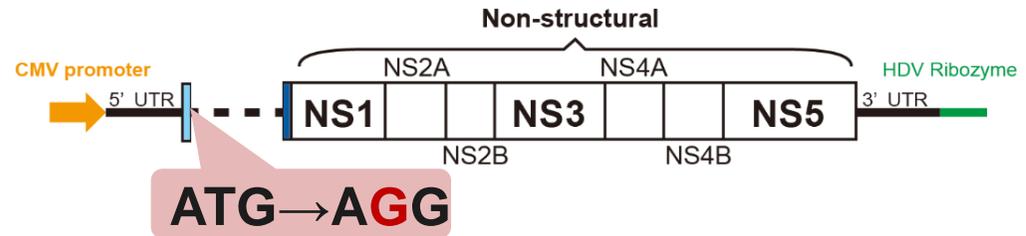
➡ 神経病原性への関与？

# TBEVのウイルスRNAはどのように神経突起上を輸送されるのか？

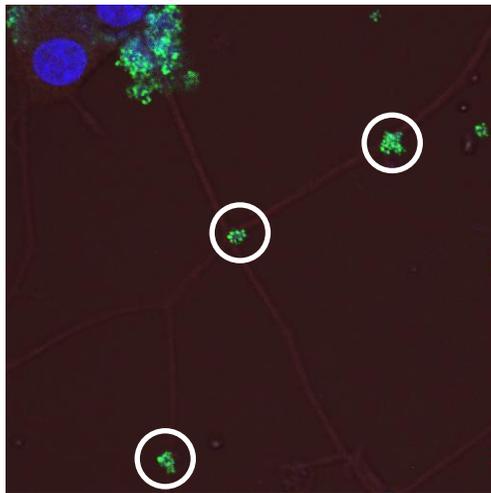


# ウイルスRNAの輸送に関わるウイルス因子の同定

DNA-based TBEV replicon  
(翻訳開始コドンを変異)



NS3  
genome



PC12 cell: Differentiate to neuronal phenotype by NGF,  
used in studies of neuronal transport

~~Structural~~

~~Non-structural~~

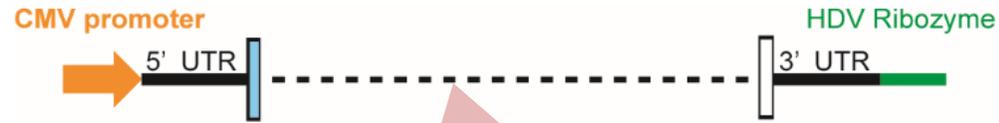
(+) strand genome



✓ ゲノムRNAの輸送にウイルス蛋白は必要ない。



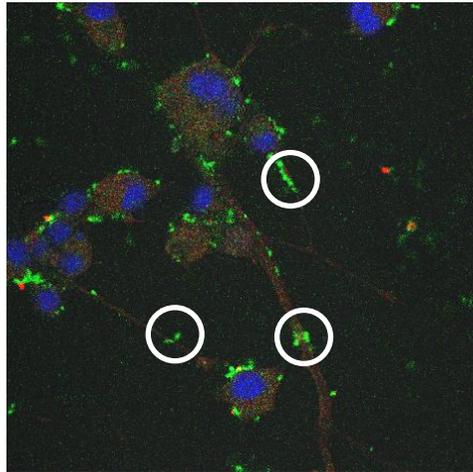
# ウイルスRNAの輸送に関わるウイルス因子の同定



Deletion of the sequence for coding region

NS3

genome



PC12 cell: Differentiate to neuronal phenotype by NGF, used in studies of neuronal transport

~~Non-structural~~

(+) strand genome

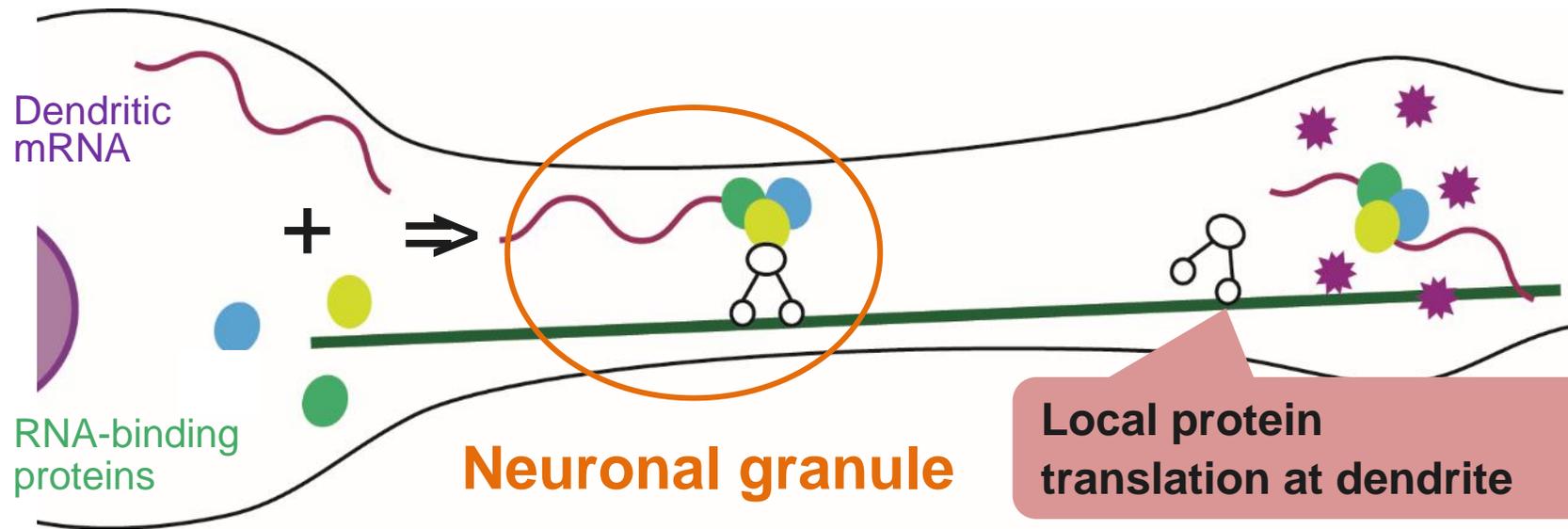


✓ ゲノムRNAの輸送には、非翻訳領域が重要(翻訳領域は不要)



# TBEV genomic RNAはどのような機序で輸送される？

神経細胞は、樹状突起上で局所的に蛋白翻訳を行う機能を持ち、  
これにより複雑な神経ネットワークの制御を行う。



(Shiina *et al*, 2005, J Neurosci)

(Bramham *et al*, 2007, Nature Rev Neurosci)

➡ **TBEV は neuronal granule の局所輸送機構を利用しているのでは？**



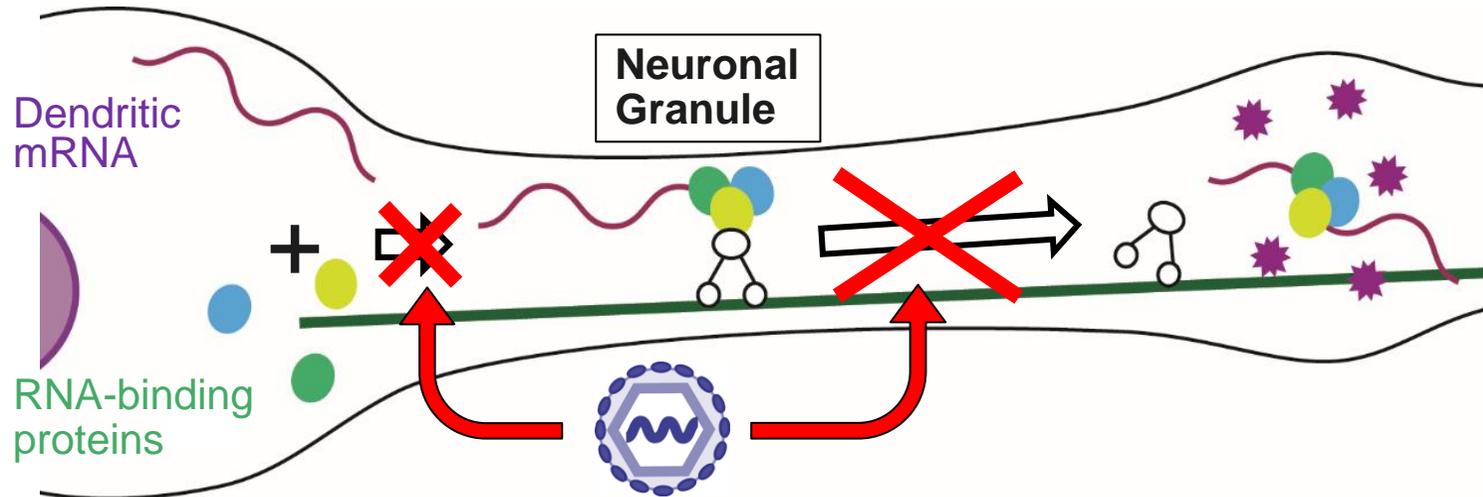
# 神経細胞特異的なTBEV増殖機構 ～まとめ～

- TBEVが感染した神経細胞では、樹状突起上でウイルスゲノム複製・翻訳が行われ、結節状のウイルス抗原の蓄積が形成される。
- 樹状突起内のTBEVゲノムRNAの輸送には、ウイルス蛋白は必要ではなく、5' UTRのSL2領域が重要な働きをしている。
- TBEV ゲノムRNAは樹状突起内で、neuronal granule構成蛋白と共局在する。



# TBEVによる中枢神経病態発現機序 ～考察～

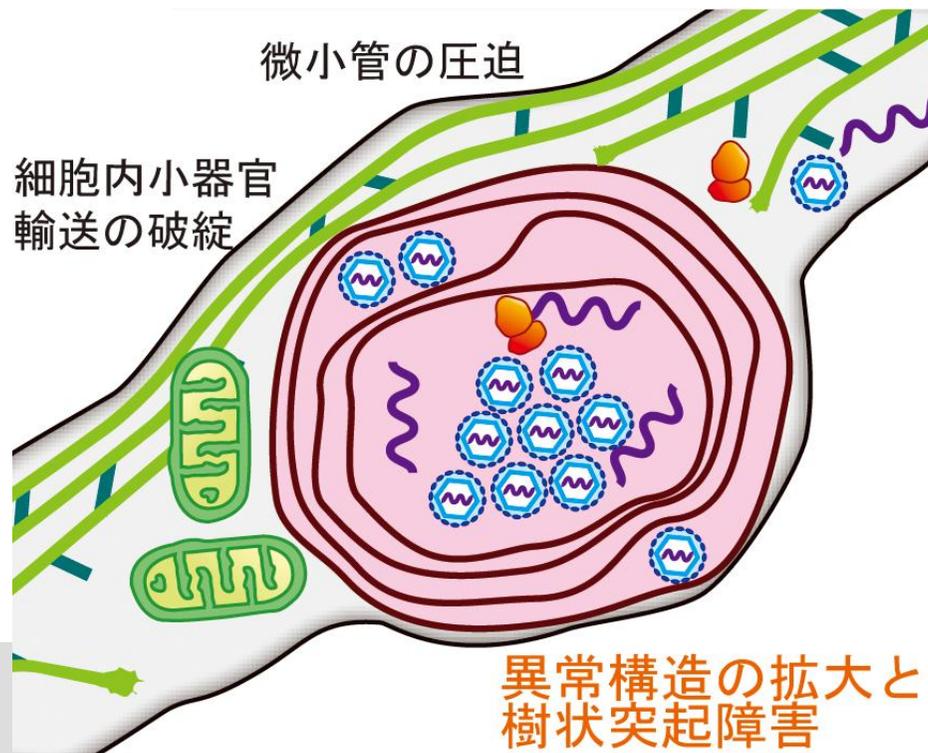
1. TBEV ゲノムRNAの輸送による、neuronal granule による神経細胞樹状突起上の局所輸送・翻訳機構の障害



2. 神経突起上におけるTBEV ゲノムRNAの複製・翻訳により誘導される宿主膜構造の変性に起因する樹状突起の障害

# TBEVによる中枢神経病態発現機序 ～考察～

1. TBEV ゲノムRNAの輸送による、neuronal granule による神経細胞樹状突起上の局所輸送・翻訳機構の阻害
2. 神経突起上におけるTBEV ゲノムRNAの複製・翻訳により誘導される宿主膜構造の変性に起因する樹状突起の障害



TBEV特異的な  
中枢神経系の病態発現へ

