

# 1. ダニ媒介性脳炎ウイルス

好井 健太郎

北海道大学 大学院獣医学研究院 公衆衛生学教室

ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) は、フラビウイルス科フラビウイルス属に属する人獣共通感染症の原因ウイルスで、自然界ではマダニによって媒介される。TBEV は野鼠等の野生動物とマダニの間で感染環が維持されているが、感染マダニの吸血により人を含めた幅広い動物種に感染し、時には脳炎といった致死率の高い重篤な症状を示す。ダニ媒介性脳炎 (TBE) はユーラシア大陸の広域で発生しており、年間1万人前後の患者が発生している、患者報告地域も拡大している。日本においては、1993年に北海道南部において、国内初のTBE確定診断症例が発生した。その後、20年以上TBE患者の発生の報告はなかったが、2016年と2017年に相次いで2例目から4例目までの患者が北海道で発生した。我々はTBEV感染に対する診断系を確立し、継続的な血清疫学調査を実施しており、北海道の広域に流行巣が分布している可能性を示している。また北海道以外においても、TBEVもしくは近縁のダニ媒介性フラビウイルスの感染を疑われる事例が示されている。

本稿では、TBEVの一般的な情報を解析するとともに、我々が行ってきたTBEの診断法やそれを応用した疫学調査やTBEVの病原性に関する研究を紹介し、TBE流行に関する課題を考察したい。

## ダニ媒介性脳炎の分類

ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) は、フラビウイルス科フラビウイルス属に属する人獣共通感染症の原因ウイルスである。フラビウイルス属には70種以上のウイルスが属しており、人に病原性を示す多くの重要なウイルスを含んでいる<sup>1)</sup>。フラビウイルス属のウイルスは、ダニ媒介性ウイルス、蚊媒介性ウイルス、ベクター不明の (no-known vector) ウイルス、節足動物固有のウイルスの4つのグループに分かれている。蚊媒介性フラビウイルスには、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス、ジカウイルス等が挙げられる。近年、これらのフラビウイルスの流行地域の拡大が報告されており、世界人口の大部分が、一つ以上のフラビウイルスの流行地に居住

している状況であり、世界的に公衆衛生上重要な問題となっている<sup>2-3)</sup>。

ダニ媒介性フラビウイルスは、哺乳動物及び海鳥を脊椎動物における宿主とするウイルスに分類される。海鳥のダニ媒介性フラビウイルスは人に病原性を示すという報告はないが、哺乳動物のウイルスには、TBEVの他にもキャサヌール森林熱ウイルス (KFDV)、オムスク出血熱ウイルス (OHFV)、ポワソンウイルス、跳躍病ウイルス等、人に病原性を示すウイルスが含まれている。これらのダニ媒介性フラビウイルスは「TBEV血清型群」と呼ばれる血清型グループを構成しており、抗原性が非常に似通っており中和試験においても交差反応性が認められる<sup>4)</sup>。

ダニ媒介性フラビウイルスは遺伝子的にも血清学的にも非常に近縁にあるにも関わらず、KFDVやOHFVのように出血熱様症状を引き起こすものと、TBEVに代表されるように神経症状を引き起こすウイルスが存在する。しかし、このような症状の違いを引き起こすウイルスの遺伝子要因等の情報は乏しい<sup>5)</sup>。

## 連絡先

〒060-0818

札幌市北区北18条西9丁目

北海道大学 大学院獣医学研究院 公衆衛生学教室

TEL: 011-706-5212

FAX: 011-706-5213

E-mail: kyoshii@vetmed.hokudai.ac.jp

## ウイルスの構造と複製機構

TBEVの属するフラビウイルス属のウイルス遺伝子は+鎖、一本鎖のRNAであり、約11,000塩基で構成される (図1)。ウイルス遺伝子RNAは1つのORFをコードしており、

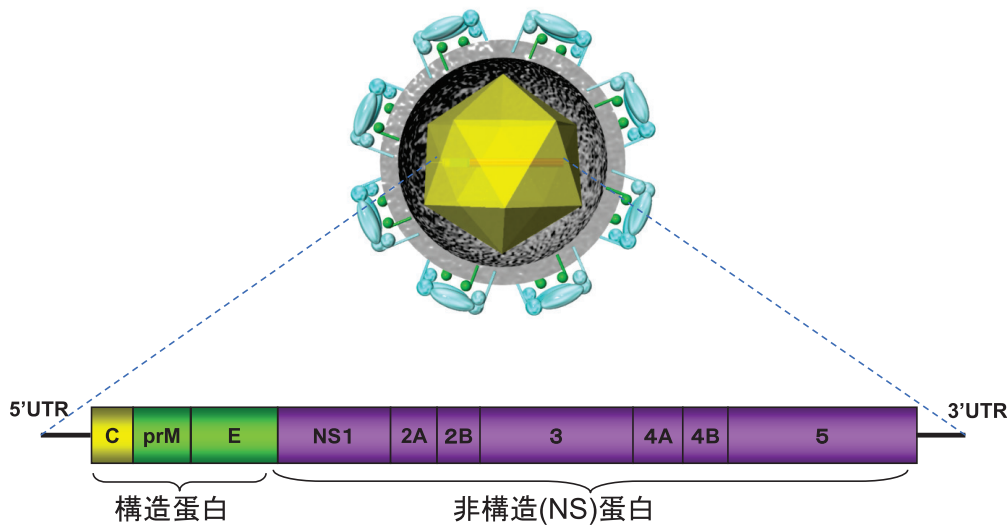


図1 フラビウイルスの遺伝子 RNA とウイルス粒子構造

ここから約 3,400 アミノ酸の一つの蛋白質として翻訳された後、宿主又はウイルスのプロテアーゼにより 3つの構造蛋白 (C, prM, E) と 7つの非構造蛋白 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) へと切断される<sup>6)</sup>。

TBEV の粒子は直径 50nm 程度の正球状の粒子でありエンベロープ膜を持つ。エンベロープ膜の内腔には C 蛋白とウイルス遺伝子 RNA からなる正 20 面体のヌクレオカプシドがある<sup>7)</sup>。ウイルスのエンベロープ膜表面は M 及び E 蛋白で構成されている。E 蛋白は糖蛋白であり、主要な抗原エピトープを持っている。またウイルスの細胞への侵入時の細胞表面のレセプターへの結合やエンドソーム膜との pH 依存性の融合にも重要な機能を果たしている。感染性ウイルス粒子の成熟過程において、M 蛋白は前駆体である prM 蛋白から切断されることにより形成される<sup>8-9)</sup>。未成熟なウイルス粒子は、細胞内での小胞輸送系を介した分泌経路を介して輸送されるが、この中で prM 蛋白は E 蛋白とヘテロダイマーを形成し、E 蛋白を保護すると考えられている<sup>10-12)</sup>。

TBEV は宿主細胞にレセプター介在性のエンドサイトーシスにより侵入するが、レセプターに関しては未だ同定されていない。ダニや幅広い種の脊椎動物に感染することから、複数のレセプターが侵入に関与しているものと考えられている。レセプターとの結合後、クラスリン被覆小胞に取り込まれ、エンドサイトーシス時の小胞の酸性化により、E 蛋白が二量体から三量体へと変化し、小胞膜と融合し、ヌクレオカプシド中のウイルス遺伝子 RNA が細胞質へと放出される。

TBEV の複製は、replication compartment (RC) と呼ばれる小胞体由来の膜構造において行われる。RC の中にウイルス遺伝子 RNA の複製に必要なウイルス・宿主因子が

集積し、複製複合体を形成する<sup>13-14)</sup>。ウイルス粒子は粗面小胞体で出芽し、ゴルジ複合体を經由して小胞輸送によって輸送され、エキソサイトーシスにより細胞外へと放出される。この過程においてエンベロープ膜上の prM 蛋白は蛋白分解酵素である furin による切断を受け M 蛋白となり、これにより E 蛋白はホモダイマーを形成し感染性のある粒子へと成熟していく<sup>15)</sup>。

### TBEV の感染環と疫学

TBEV は自然界ではマダニによって媒介されており、主に *Ixodes* 属<sup>16-19)</sup>、*Dermacentor* 属<sup>16, 20)</sup>、*Haemaphysalis* 属等<sup>21)</sup> の幅広い種のマダニが媒介可能であると報告されている。TBEV はマダニの中で、経齢間伝達<sup>22)</sup> 及び経卵巢伝達<sup>23)</sup> することが知られており、即ちマダニの中で世代を超えて長期間ウイルスが維持されることが可能である。

小型野生げっ歯類を中心に様々な野生動物とマダニの間で感染環が維持されているが、感染マダニの吸血により伴侶動物、家畜動物や人を含めた幅広い動物種に感染する。特に小型野生げっ歯類はウイルス血症を起こし、これにより吸血時のダニへの感染を引き起こすとされているが<sup>24-25)</sup>、ウイルス血症を起こしていない動物においても、感染マダニと非感染マダニが同じ場所で吸血することにより (co-feeding)、非感染マダニがウイルスを保有しうる事も知られている。さらに、TBEV に感染した家畜動物の生乳を介した人への感染がヨーロッパで報告されている<sup>26)</sup>。

ダニ媒介性脳炎 (TBE) はユーラシア大陸の広域で発生しており、年間一万人前後の患者が発生していて、患者報告地域も拡大している<sup>27)</sup>。TBEV は遺伝子性状から、ヨーロッパ型、シベリア型、極東型の 3つのサブタイプに分類される。各サブタイプの地理的分布については、重複する

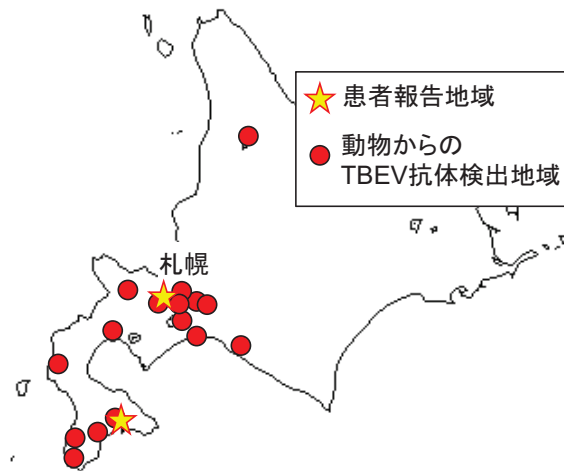


図2 北海道における抗TBEV抗体保有動物の調査。対象動物：犬、馬、野鼠、アライグマ

領域もあり、韓国でヨーロッパ型が分離されていたりする等<sup>28)</sup>、ユーラシア大陸内でのTBEVの頻繁な移動が示唆されている。

#### TBEの臨床症状とワクチン、治療法

人がTBEVを保有するダニに吸血された場合の発症率は5-30%と報告されており、通常7-14日間の潜伏期を経て発症する<sup>29-30)</sup>。発症初期は頭痛、発熱、関節痛や筋肉痛等の症状が見られ<sup>31)</sup>、重症化した場合、髄膜脳炎により精神錯乱・昏睡・痙攣及び麻痺等の中枢神経症状が認められる<sup>32-33)</sup>。致死率は数%~数十%との報告がされている<sup>26)</sup>。脳炎から回復後も40-60%の患者で知覚障害、運動障害などの後遺症が残る。またウイルス特異的な治療法はなく、過去にTBE特異的人免疫グロブリン製剤が有効として使われてきたが、近年の研究では副作用の懸念がされており推奨はされていない<sup>34)</sup>。従って、TBE患者への対応には対症療法が中心となる。

TBEの予防のためのワクチンは海外で数社から製造されている。その中でもPfizer株式会社やNovartis社から製造されているワクチンは信頼性も高く、疫学的にもワクチン接種による患者数減少の効果がオーストリアでの研究において示されている<sup>35)</sup>。これらのワクチンは日本で分離されたTBEVにも防御効果があることが、ワクチン接種者血清の日本分離TBEV株に対する中和試験や、マウスモデルを用いた感染防御試験により報告されている<sup>36)</sup>。しかしこれらのワクチンは日本では未認可であり、一部のトラベルクリニック等において保健適用外でのみ接種可能である。

#### 日本におけるダニ媒介性脳炎

日本においては、1990年代前半までTBEVは存在しな

いと考えられてきた。しかし戦後間もない時期に、東京近辺においてTBE患者が発生した疑いが持たれている。1948年、東京近辺において日本脳炎の流行があり、この時に日本脳炎疑い患者293例から26株のウイルスが分離された。この内24株は日本脳炎ウイルス(JEV)と同定されたが、2株は血清学的にJEVではなくTBEVに近縁の抗原性を示した<sup>37)</sup>。その後40年以上経って、分離されたウイルスは、遺伝子解析によりTBEVの一遺伝子型である跳躍病ウイルスに分類されることが明らかになり<sup>38)</sup>、TBEVの感染者が戦後間もない時期に本州において発生していた事が示された。

1993年に北海道南部の渡島地方において、国内初のTBE確定診断症例が発生した。患者は30代の女性で、発熱、髄膜刺激症状、全身痙攣、意識障害等の脳炎症状を呈した。当初、ヘルペスウイルス性脳炎を疑われたが陰性で、除外診断として行われたJEVに対するIgG-ELISA及びHI試験による抗体検査では、急性期から回復期にかけて有意な抗体の上昇が認められた。しかし、日本脳炎非流行地の函館で、しかも媒介蚊の活動しない10月末に日本脳炎患者が発生することは考えにくかったため、さらに詳細な抗体検査が行われた。その結果、JEVに対する中和抗体価は低値であったのに対し、TBEVに対する高い中和抗体価が認められ、かつ有意に上昇していたため、TBEVに感染していたと診断された<sup>39)</sup>。

この患者は海外渡航歴も無いことから、国内における感染が疑われた。そのため、高島らは患者発生地域近辺における哺乳動物やマダニを対象とした調査を行い、抗TBEV抗体保有動物(犬、野生げっ歯類)を検出するとともにTBEVを分離することで、同地域に極東型TBEVの流行巣が存在することが示してきた<sup>18,40-43)</sup>。

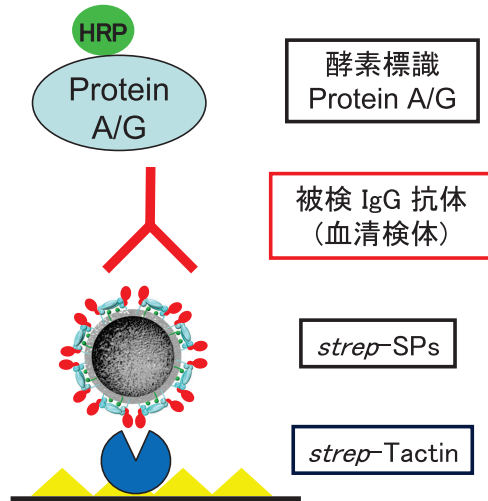


図3 ウイルス様粒子 (SPs) を用いた幅広い動物に適用可能な IgG-ELISA の確立

strep-tag を粒子の表面に発現するようにした SPs (strep-SPs) を strep-tactin により捕捉して、被検血清を反応させ、抗 TBEV IgG 抗体を酵素標識 Protein A/G により検出する。TBE 流行地域の疑い患者や捕獲野鼠中の抗体を ELISA 及び中和試験により検出し比較した。

その後 23 年間、TBE 患者の報告は無かったが、2016 年 8 月に北海道で 2 例目となる TBE 確定診断症例が発生した。患者は道内でダニに吸血され、1 週間程の潜伏期間を経て、発熱、筋肉痛、麻痺、意識障害、痙攣等の脳炎症状を呈し、ダニによる吸血から約 1 ヶ月後に亡くなった。当初、ライム病を疑われたが陰性で、その後、TBE に対する診断が行われた。PCR による遺伝子検査は陰性で、抗体検査において、簡易検査である蛍光抗体法では抗 JEV、TBEV 抗体ともに陽性であったが、中和試験では TBEV 特異的に抗体価の陽転が認められたため、TBE と確定診断された<sup>44)</sup>。さらに、2017 年には函館市及び札幌市において、3、4 例目となる TBE 確定診断症例が発生している。

我々は国内初の TBE 確定診断症例の発覚以来、継続的に動物を対象とした血清疫学調査を行ってきているが、北海道では広範な地域において、抗 TBEV 抗体を保有する動物が生息している事を明らかにしており、広範囲に TBEV の流行巣が存在していることを示してきている<sup>40-41, 43)</sup> (図 2)。また道外においても、西日本を中心に TBEV もしくは TBEV 近縁のウイルスに対する抗体を保有している野生動物を検出しており、これらのウイルスの流行巣が存在している可能性が示唆されている。

**TBEV の診断の問題点と新規診断法の開発**

TBE は日本では感染症法の定める所の 4 類感染症にあたり、診断の検査基準としては、分離・同定による TBEV

**ヒト: 流行地域のTBE疑い患者**

| 中和試験               | SP-ELISA |    | total |
|--------------------|----------|----|-------|
|                    | +        | -  |       |
| +                  | 78       | 4  | 82    |
| -                  | 1        | 24 | 25    |
| 感度=95.1% 特異度=96.0% |          |    |       |

**野鼠: TBE流行地域で捕獲**

| 中和試験               | SP-ELISA |    | total |
|--------------------|----------|----|-------|
|                    | +        | -  |       |
| +                  | 30       | 1  | 31    |
| -                  | 1        | 42 | 43    |
| 感度=96.8% 特異度=97.7% |          |    |       |

の検出、PCR 法による TBEV 遺伝子の検出、IgM 抗体の検出、及び中和試験による抗体の検出 (ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意の上昇) の 4 つが挙げられている。しかし TBEV の感染した患者の体内で、発症後にウイルス血症が認められることは殆ど無く、また髄液中からウイルスが検出される時期も限られるため<sup>45-46)</sup>、TBE の診断は血清学的診断法による特異的抗体の検出がメインとなる。

不活化 TBEV を用いた IgG-ELISA、蛍光抗体法、HI 試験等による抗体検出法は簡便ではあるが、感度・特異度が十分ではなく、また他のフラビウイルスに対する抗体との交差反応性も示してしまう<sup>47)</sup>。そのため確定診断には IgM-ELISA 又は中和試験が必要となり、これらは感染症法の規定する診断法にも挙げられている。不活化 TBEV を抗原とした IgM-ELISA キットはヨーロッパにおいて販売されている。IgM-ELISA は陽性反応適度は高いが、IgM 抗体であるため検査の時期によっては感染していても検出されないことがあるため、陰性であっても TBE 感染を否定することはできない。従って中和試験が標準的な診断法として用いられることが多く、高い信頼性とウイルス特異性を持っている。しかし中和試験では生ウイルスを使わなければならない、TBEV は三種病原体に当たり取り扱いは厳しい基準があり、使用には BSL-3 の実験施設が必要となる。このような制約から、日本国内で TBE の診断が可能な施設は国立感染症研究所や北海道大学を含む数

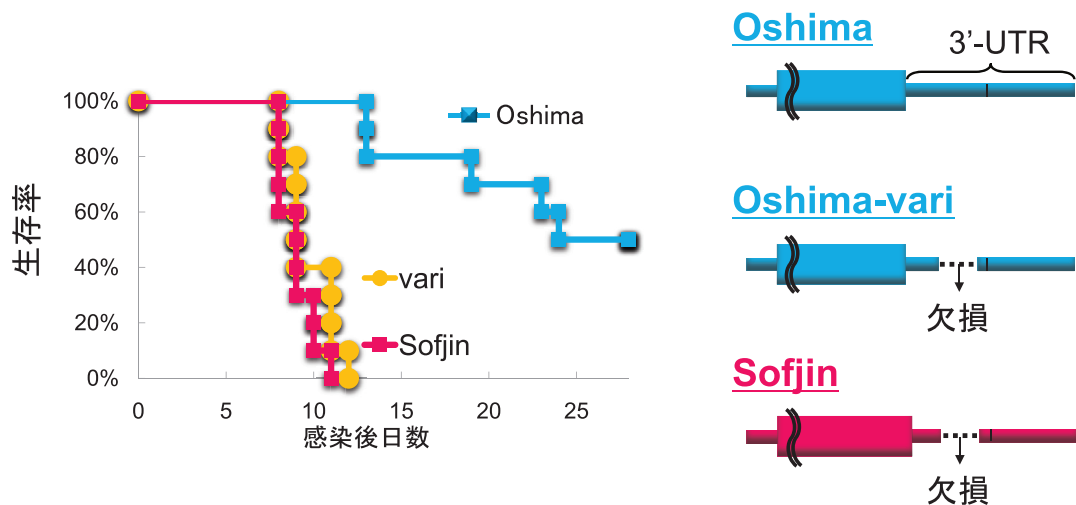


図4 3'-UTR内の欠損はTBEVの病原性を高める。

TBEV Oshima株に高病原性株であるSofjin株に認められる3'-UTR内の欠損を導入し(Oshima-vari), B6マウスに1,000 pfu皮下接種し, 経過を観察した。

カ所に限られている。

そこで我々は, 通常の実験室でも実施可能な中和試験の代替となる診断法の開発に関する研究を進めてきた。フラビウイルス属のウイルスの粒子は, エンベロープ膜を持つ小型球状であり, prM及びE蛋白がエンベロープ膜を構成している。このprM及びE蛋白を哺乳動物細胞で発現させると, エンベロープ膜のみで構成される, 中空のウイルス様粒子(Subviral particles: SPs)が分泌される<sup>48)</sup>。我々はこのSPsを用いて, 幅広い哺乳動物種に適用可能なELISAによるTBEV特異抗体検出系を構築してきた<sup>49-50)</sup>。構築したELISAは中和試験の成績と比較して高い感度及び特異性を示し, 中和試験の代替法として有効であることが明らかになっている(図3)。

#### 日本国内のTBEVの病原性(TBEVの高病原性化に関わる因子)の解析

北海道の流行巣に存在しているTBEVは極東型であることが明らかになっている<sup>40, 42)</sup>。1995年に北海道南部の一例目の患者発症地域の犬より分離されたOshima 5-10株は, ロシアのTBE患者の脳より分離され極東型TBEVの標準株として使われているSofjin-HO株と比較して, マウスモデルにおいて弱い病原性を示した<sup>51)</sup>。両株の遺伝子配列の全長を比較した所, 塩基配列にして95.8%, アミノ酸配列にして98.6%の高い相同性を示した<sup>52)</sup>。両株の病原性の相違を決定するウイルスの遺伝子配列を特定するために, 我々が開発してきたTBEVのリバースジェネティクス法により<sup>53-54)</sup>, Oshima株, Sofjin株間での組換えキメラウイルスを作製し解析を行った。その結果, Sofjin株の3'非翻訳領域(UTR)には約200塩基の欠損があり, 同

じ欠損をOshima株に導入した場合, マウスモデルにおいてSofjin株と同程度の強い病原性を示した(図4)。これらの結果により, 3'UTRに生じる欠損が病原性に大きく影響を与えることが明らかになった<sup>55)</sup>。

通常, 自然界でダニを中心とした感染環の中で維持されているTBEVには, このような3'UTRに欠損が生じるような事は殆ど認められず, 脳炎を発症したTBE患者の脳から分離されたウイルスや, 哺乳動物において実験的に継代したウイルスにおいて欠損が認められることがある<sup>56-57)</sup>。これらのことより, 3'UTRに生じる欠損は, 自然宿主から人への感染・適応する際に生じ, これにより人における病原性を上昇させているのではないかと考えられている。従って, 北海道分離株であるOshima株においても, 人に感染した際に同様の欠損が生じ, 高い病原性を示すようになる可能性が考えられるため, 予断を持たずに継続的な調査を行い注視する必要がある。

#### 最後に

上述のように, 日本においてTBEは北海道を中心に常在している感染症であり, 道外にもTBEVもしくは近縁のウイルスの流行巣が存在している可能性が示唆されており, 人がTBEVに感染する可能性は依然としてあると考えられる。これまでに報告のある重症患者以外にTBEV感染者がいなかったとは考えにくく, 無症状感染者や軽症感染者, 及び, 脳炎などの重症患者であったが診断がつかなかった感染者は少なからずいるものと考えられる。この原因として医療関係者も含めてTBEに対する認知度が低く, そのため感染者が見過ごされているためだと考えられる。TBEの国内における流行を制御するためにも, TBE

に関する十分な周知・啓蒙活動を行うとともに、診断体制を確立し、人における感染状況の詳細を明らかにするとともに、ワクチン等による適切な予防対策を図っていくのが重要である。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

#### 参考文献

- 1) Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371: 500-9.2008.
- 2) Hollidge BS, Gonzalez-Scarano F, Soldan SS. Arboviral encephalites: transmission, emergence, and pathogenesis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5: 428-42.2010.
- 3) Wilson MR. Emerging viral infections. *Curr Opin Neurol* 26: 301-6.2013.
- 4) Ergunay K, Tkachev S, Kozlova I, Ruzek D. A Review of Methods for Detecting Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Tick, Animal, and Human Specimens. *Vector borne and zoonotic diseases* 16: 4-12.2016.
- 5) Lindquist L. Tick-borne encephalitis. *Handb Clin Neurol* 123: 531-59.2014.
- 6) Heinz FX, Mandl CW. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. Review article. *APMIS* 101: 735-45.1993.
- 7) Slavik I, Mrena E, Mayer V. Studies on Tick-borne encephalitis virus. II. Virus morphology and some data on virus structure. *Acta Virol* 14: 8-16.1970.
- 8) Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71: 8475-81.1997.
- 9) Elshuber S, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 84: 183-91.2003.
- 10) Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol* 69: 695-700.1995.
- 11) Wengler G. Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J Virol* 63: 2521-6.1989.
- 12) Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 76: 5480-91.2002.
- 13) Mandl CW. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus research* 111: 161-74.2005.
- 14) Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* 98: 192-208.2013.
- 15) Kroschewski H, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 308: 92-100.2003.
- 16) Demina TV, Dzhiyev YP, Verkhozina MM, Kozlova IV, Tkachev SE, Plyusnin A, Doroshchenko EK, Lisak OV, Zlobin VI. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J Med Virol* 82: 965-76.2010.
- 17) Suss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks and tick-borne diseases* 2: 2-15.2011.
- 18) Takeda T, Ito T, Chiba M, Takahashi K, Niioka T, Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan. *Journal of medical entomology* 35: 227-31.1998.
- 19) Lichard M, Kozuch O. Persistence of tick-borne encephalitis virus in nymphs and adults of *Ixodes arboricola* and its transmission to white mice. *Acta Virol* 11: 480.1967.
- 20) Kozuch O, Nosek J. Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks. *Acta Virol* 15: 334.1971.
- 21) Yun SM, Lee YJ, Choi W, Kim HC, Chong ST, Chang KS, Coburn JM, Klein TA, Lee WJ. Molecular detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome and tick-borne encephalitis viruses in ixodid ticks collected from vegetation, Republic of Korea, 2014. *Ticks and tick-borne diseases* 7: 970-978.2016.
- 22) Danielova V, Daniel M, Schwarzova L, Materna J, Rudenko N, Golovchenko M, Holubova J, Grubhoffer L, Kilian P. Integration of a tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato into mountain ecosystems, following a shift in the altitudinal limit of distribution of their vector, *Ixodes ricinus* (Krkonoše mountains, Czech Republic). *Vector borne and zoonotic diseases* 10: 223-30.2010.
- 23) Radda A, Hofmann H, Pretzmann G. Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol* 13: 74-7.1969.
- 24) Rosa R, Pugliese A, Norman R, Hudson PJ. Thresholds for disease persistence in models for tick-borne infections including non-viraemic transmission, extended feeding and tick aggregation. *J Theor Biol* 224: 359-76.2003.
- 25) Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, Kozuch O, Fuchsberger N, Lysy J, Nuttall PA. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219: 357-66.1996.
- 26) Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases* 3: 430-41.2015.
- 27) Suss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond-the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 13.2008.
- 28) Kim SY, Jeong YE, Yun SM, Lee IY, Han MG, Ju YR. Molecular evidence for tick-borne encephalitis virus in ticks in South Korea. *Medical and veterinary entomology* 23: 15-20.2009.
- 29) Kaiser R. Tick-borne encephalitis. *Infect Dis Clin North Am* 22: 561-75, x.2008.

- 30) Mickiene A, Laiskonis A, Gunther G, Vene S, Lundkvist A, Lindquist L. Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: disease severity and long-term prognosis. *Clin Infect Dis* 35: 650-8.2002.
- 31) Dorrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. Tickborne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med Infect Dis* 8: 213-22.2010.
- 32) Gunther G, Haglund M, Lindquist L, Forsgren M, Skoldenberg B. Tick-borne encephalitis in Sweden in relation to aseptic meningo-encephalitis of other etiology: a prospective study of clinical course and outcome. *J Neurol* 244: 230-8.1997.
- 33) Logar M, Bogovic P, Cerar D, Avsic-Zupanc T, Strle F. Tick-borne encephalitis in Slovenia from 2000 to 2004: comparison of the course in adult and elderly patients. *Wien Klin Wochenschr* 118: 702-7.2006.
- 34) Broker M, Kollaritsch H. After a tick bite in a tickborne encephalitis virus endemic area: current positions about post-exposure treatment. *Vaccine* 26: 863-8.2008.
- 35) Heinz FX, Holzmann H, Essl A, Kundi M. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 25: 7559-67.2007.
- 36) Chiba N, Osada M, Komoro K, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Protection against tick-borne encephalitis virus isolated in Japan by active and passive immunization. *Vaccine* 17: 1532-9.1999.
- 37) Ando K, Kuratsuka K, Arima S, Hironaka N, Honda Y, Ishii K. Studies on the viruses isolated during epidemic of Japanese B encephalitis in 1948 in Tokyo area. *Kitasato Arch Exp Med* 24: 557-62; English transl 429-41.1952.
- 38) Venugopal K, Buckley A, Reid HW, Gould EA. Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein of Negishi virus shows very close homology to louping ill virus. *Virology* 190: 515-21.1992.
- 39) Morita K, Igarashi A, Sato T, Takezawa T. A suspected case of tick-borne encephalitis in Hokkaido. *Infectious Agents Surveillance Report* 15.1994.
- 40) Takashima I, Morita K, Chiba M, Hayasaka D, Sato T, Takezawa C, Igarashi A, Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Hashimoto N. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *Journal of clinical microbiology* 35: 1943-7.1997.
- 41) Takeda T, Ito T, Osada M, Takahashi K, Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepizootologic survey in Hokkaido, Japan. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 60: 287-91.1999.
- 42) Kentaro Y, Yamazaki S, Mottate K, Nagata N, Seto T, Sanada T, Sakai M, Kariwa H, Takashima I. Genetic and biological characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from wild rodents in southern Hokkaido, Japan in 2008. *Vector borne and zoonotic diseases* 13: 406-14.2013.
- 43) Yoshii K, Mottate K, Omori-Urabe Y, Chiba Y, Seto T, Sanada T, Maeda J, Obara M, Ando S, Ito N, Sugiyama M, Sato H, Fukushima H, Kariwa H, Takashima I. Epidemiological study of tick-borne encephalitis virus infection in Japan. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 73: 409-12.2011.
- 44) Yoshii K, Tajima Y, Bando K, Moriuchi R. A confirmed case of tick-borne encephalitis in Hokkaido in 2016. *Infectious Agents Surveillance Report* 38: 126.2016.
- 45) Puchhammer-Stockl E, Kunz C, Mandl CW, Heinz FX. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin Diagn Virol* 4: 321-6.1995.
- 46) Saksida A, Duh D, Lotric-Furlan S, Strle F, Petrovec M, Avsic-Zupanc T. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *J Clin Virol* 33: 331-5.2005.
- 47) Holzmann H, Kundi M, Stiasny K, Clement J, McKenna P, Kunz C, Heinz FX. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J Med Virol* 48: 102-7.1996.
- 48) Yoshii K, Hayasaka D, Goto A, Obara M, Araki K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Ivanov L, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *Journal of virological methods* 108: 171-9.2003.
- 49) Inagaki E, Sakai M, Hirano M, Muto M, Kobayashi S, Kariwa H, Yoshii K. Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles. *Ticks and tick-borne diseases* 7: 723-9.2016.
- 50) Obara M, Yoshii K, Kawata T, Hayasaka D, Goto A, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of tick-borne encephalitis using subviral particles. *Journal of virological methods* 134: 55-60.2006.
- 51) Chiba N, Iwasaki T, Mizutani T, Kariwa H, Kurata T, Takashima I. Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. *Vaccine* 17: 779-87.1999.
- 52) Goto A, Hayasaka D, Yoshii K, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Genetic and biological comparison of tick-borne encephalitis viruses from Hokkaido and far-eastern Russia. *The Japanese journal of veterinary research* 49: 297-307.2002.
- 53) Takano A, Yoshii K, Omori-Urabe Y, Yokozawa K, Kariwa H, Takashima I. Construction of a replicon and an infectious cDNA clone of the Sofjin strain of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Archives of virology* 156: 1931-41.2011.
- 54) Hayasaka D, Gritsun TS, Yoshii K, Ueki T, Goto A, Mizutani T, Kariwa H, Iwasaki T, Gould EA, Takashima I. Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 85: 1007-18.2004.

- 55) Sakai M, Muto M, Hirano M, Kariwa H, Yoshii K. Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR. *Virus research* 203: 36-40.2015.
- 56) Formanova P, Cerny J, Bolfikova BC, Valdes JJ, Kozlova I, Dzhioev Y, Ruzek D. Full genome sequences and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus strains isolated from human patients. *Ticks and tick-borne diseases* 6: 38-46.2015.
- 57) Mandl CW, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stadler PF, Allison SL, Heinz FX. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J Virol* 72: 2132-40.1998.

## Tick-borne encephalitis

**Kentaro YOSHII**

Laboratory of Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University  
Kita-18 nishi-9 kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0818, Japan

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) belongs to the *Flaviviridae* family and *Flavivirus* genus. TBEV is maintained in transmission cycles between *Ixodid* ticks and wild mammalian hosts, particularly rodents. A wide range of animal species are also infected with TBEV by the bite of infected ticks, and TBEV infection causes fatal encephalitis in humans. TBEV is endemic widely in the Eurasian continent, and more than 10,000 cases of the disease are reported annually. In Japan, the 1<sup>st</sup> confirmed case of TBE was reported in the southern area of Hokkaido in 1993, and after 20 years, the 2<sup>nd</sup> to 4<sup>th</sup> cases were reported in Hokkaido in 2016 and 2017. Our sero-epizootiological survey indicated endemic foci of TBEV are widely distributed in Hokkaido and that those of TBEV or tick-borne flavivirus outside Hokkaido.

In this review, I introduced recent topics of TBEV including newly developed diagnostic methods, epidemiology and pathogenesis of TBEV.