

Yezoウイルスについて

松野 啓太 (まつの けいた)

北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所
危機分析・対応部門



Yezo (エゾ) ウイルスはコッホの原則を (ある程度) 満たす新規病原体

- 北海道内でマダニ咬傷後にSFTS様症状を発症した患者より、新規ダニ媒介性ナイロウイルス, エゾウイルスを発見した。
- 同様の症状が見られた患者複数名 (後方視的調査含む) より、エゾウイルスが検出された。
- エゾウイルスをマウスに接種したところ、体重減少等が認められた。
- 感染マウスからウイルスが分離された。

1. 自己紹介と背景

2. エゾウイルスの発見と検査方法樹立

3. エゾウイルスの性状解析

4. エゾウイルスの近縁ウイルス



自己紹介

- ペーパー獣医師
- ウイルス学博士
(虫博士ではない・・・)
- 主な研究対象：ダニ媒介性ウイルス



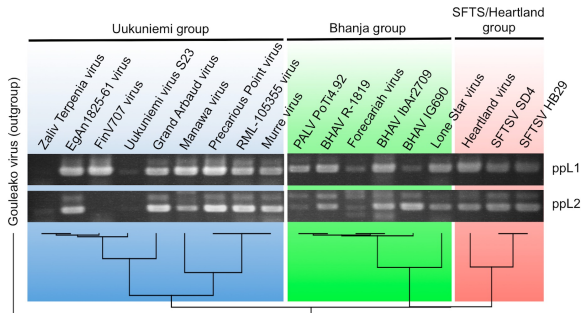
Sasaki Hakusensha 1988



背景① ダニ媒介性ウイルスの研究

ダニ媒介性フレボウイルス*を網羅的に検出可能なRT-PCR法の開発

*最新の分類法ではフェヌイウイルス



Matsuno et al. J Virol 2015

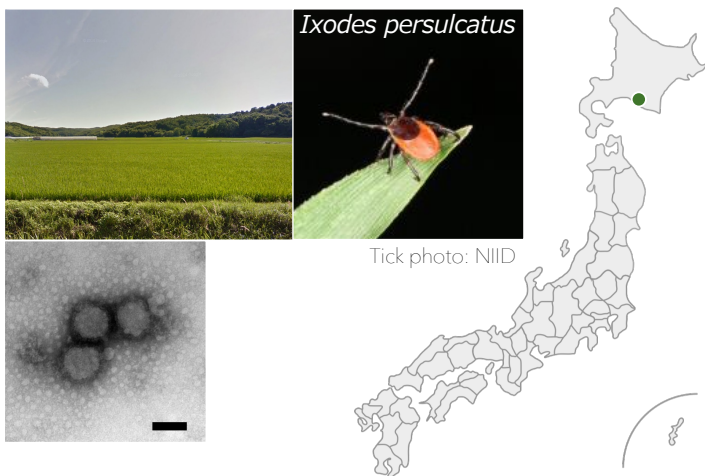
様々な国の研究者が本法を用いてマダニ中の新規ウイルスを発見

Articles include: Molecular identification of novel phlebovirus sequences in European ticks; Novel phlebovirus detected in Haemaphysalis parva ticks in a Greek island; Detection of a novel putative phlebovirus and first isolation of Dugbe virus from ticks in Accra, Ghana; Multiple Phlebovirus (Bunyaviridae) genetic groups detected in Rhipicephalus, Hyalomma and Dermacentor ticks from southern Portugal; Novel phleboviruses detected in ticks, Greece; Detection and phylogenetic analysis of phlebovirus, including severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, in ticks collected from Tokyo, Japan.

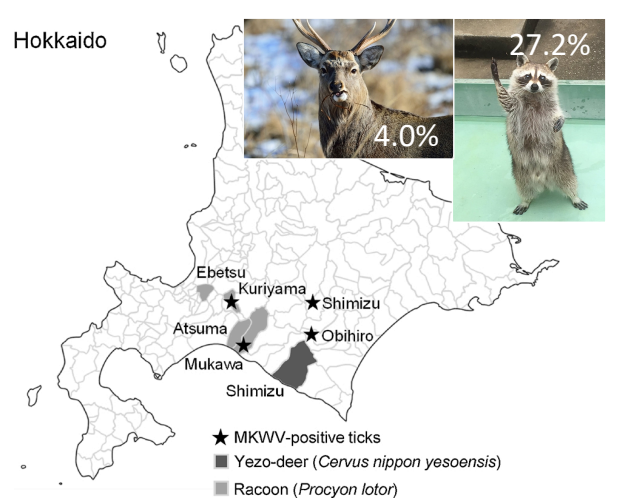
背景② 北海道における新規ダニ媒介性フレボウイルスの発見

北海道むかわ町で採集したシュルツェマダニから新規ウイルス (Mukawa virus) を発見

北海道のシュルツェマダニ-野生動物間で成立しているMukawa virusの生活環



Matsuno and Kajihara et al. mSphere 2018



Torii et al. Ticks Tick-borne Dis 2019

地道な研究と論文発表の重要性

- 「北海道」「マダニ」「ウイルス」などをキーワードに論文が検索可能だったために臨床医から研究者へのアクセスができた。

1. 自己紹介と背景

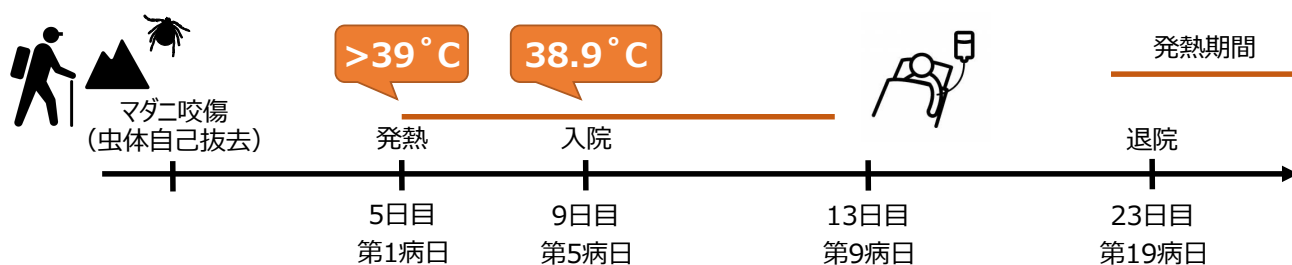
2. エゾウイルスの発見と検査方法樹立

3. エゾウイルスの性状解析

4. エゾウイルスの近縁ウイルス



症例① 入院までの経緯



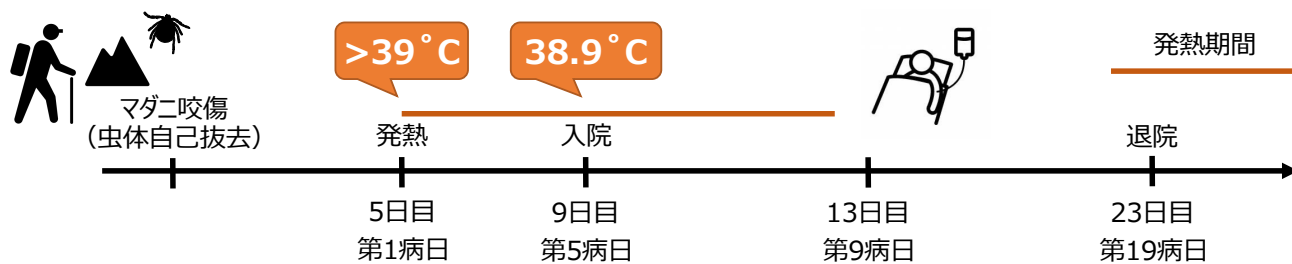
- 高尿酸血症，高脂血症の既往歴がある札幌市在住の40代男性。
- 5月中旬（刺咬当日）道央圏域の山林にて約4時間滞在し山菜採取を行った。
- 刺咬翌日の夕方，右側腹部に米粒大の虫刺咬に気づき自己抜去した。
- 刺咬後5日目の朝から39°C台の発熱が出現し，刺咬後7日目には両下肢痛のため歩行困難となった。
- 刺咬後9日目、精査・加療目的に札幌市内の病院に入院した。

症例① 入院時の所見



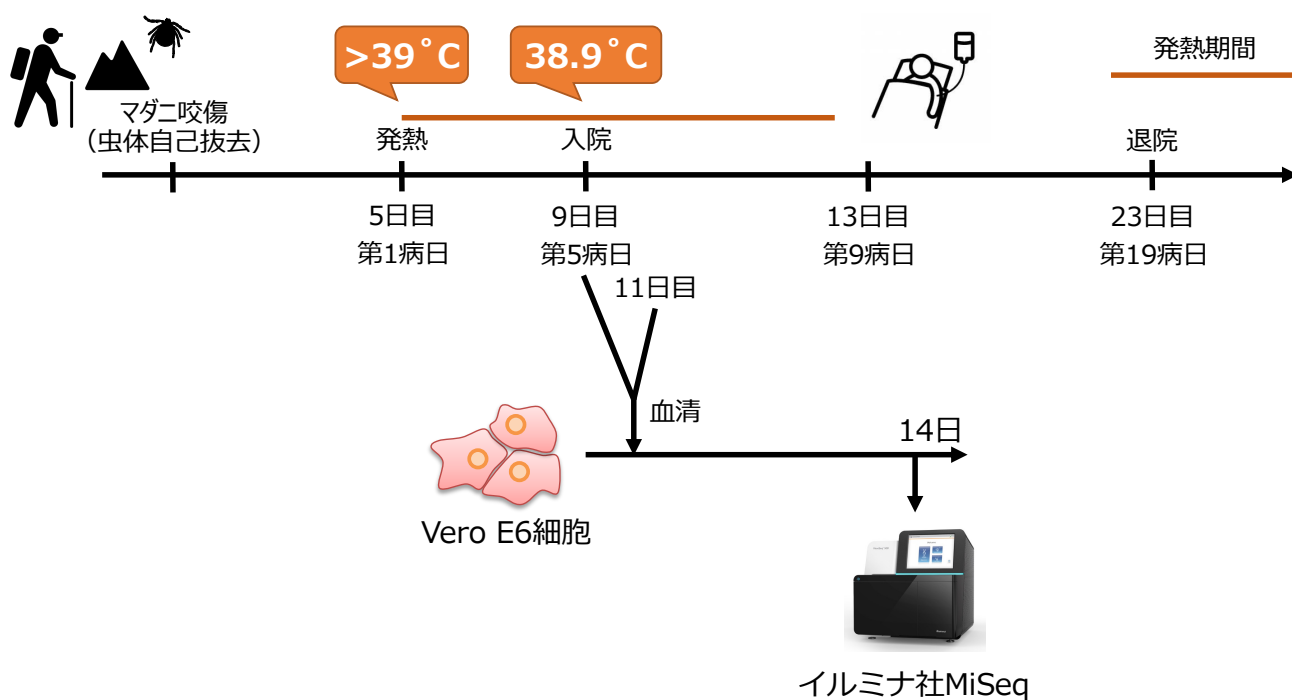
- 血圧138/96 mmHg，脈拍99/分，体温38.9°C。
- 右下腹部に虫刺咬痕と思われる小丘疹とその周囲の発赤を認めた。
- その他身体所見に明らかな異常は認めなかった。
- 入院時，白血球減少 (WBC 1.6/ μ L)，血小板減少 (PLT 87.0×10^3 / μ L)，肝機能酵素の上昇 (AST 3,703 IU/L, ALT 1,783 IU/L)，筋原性酵素上昇 (CK 5,847 U/L)，フェリチン値の高度上昇 (55200 ng/ml) などの異常所見を認めた。
- CT画像上は明らかな異常所見は認められなかった。
- マダニ媒介性感染症を疑い，入院の上抗菌薬投与による治療，各種感染症精査を行った。

症例① 入院後の臨床経過



- 精査の結果、以下の既知の感染症は否定された。
ボレリア感染症、リケッチア感染症、野兔病、ダニ媒介脳炎、重症熱性血小板減少症候群、日本脳炎
- 入院5日目より症状改善し、入院15日目に後遺症なく自宅退院となった
- 感染症精査のため、研究機関で精査を行った。
北海道大学大学院 獣医学研究院 微生物学教室、北海道立衛生研究所、国立感染症研究所

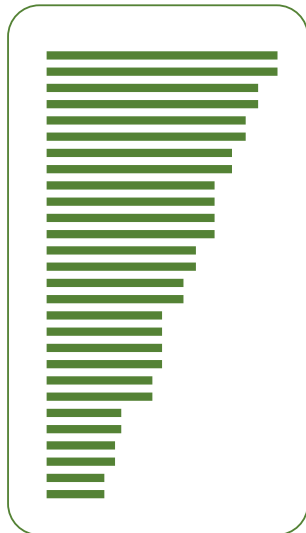
次世代シーケンサーを用いた網羅的ウイルス探索



網羅的ウイルス探索によるウイルス遺伝子断片の検出

コンティグ

配列が重なるリード同士を繋ぎ合わせて得られた塩基配列



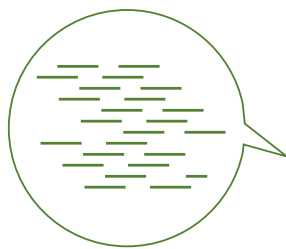
BLAST
検索

Contig 192191 → 1891 b

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
RNA-dependent RNA-polymerase [Burana virus]	652	652	100%	0.0	52.71%	YP_009666118.1
polymerase [Vinegar Hill virus]	645	645	100%	0.0	51.97%	AJD40046.1
RNA-dependent RNA-polymerase [Tamyd virus]	642	642	100%	0.0	50.89%	AKC89322.1
RNA-dependent RNA-polymerase [Tamyd virus]	642	642	100%	0.0	50.89%	AKC89325.1
RNA-dependent RNA polymerase [Huangpi Tick Virus 1]	638	638	100%	0.0	51.84%	YP_009293587.1
RNA-dependent RNA-polymerase [Tamyd virus]	637	637	100%	0.0	50.56%	AKC89328.1
RNA-dependent RNA polymerase [Sanhira II virus]	635	635	100%	0.0	51.18%	AMT75422.1

リード
300塩基弱の配列データ

de novo
assembly



オルソナイロウイルス
Lタンパク質

エゾウイルスと呼称

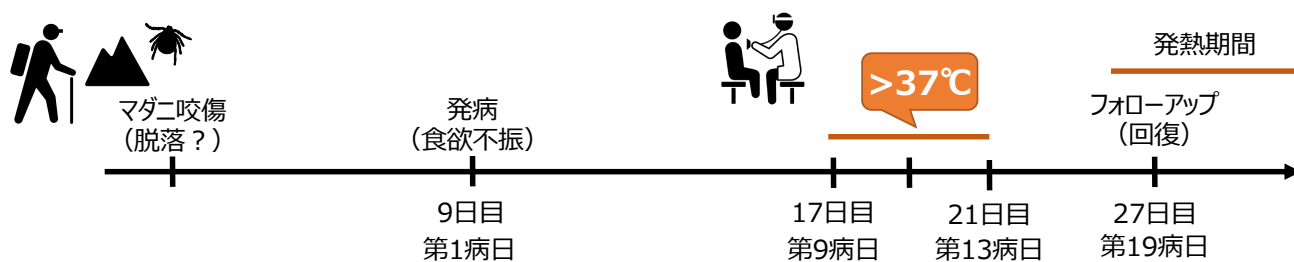


イルミナ社MiSeq

患者検体を直接シーケンスできないのか？

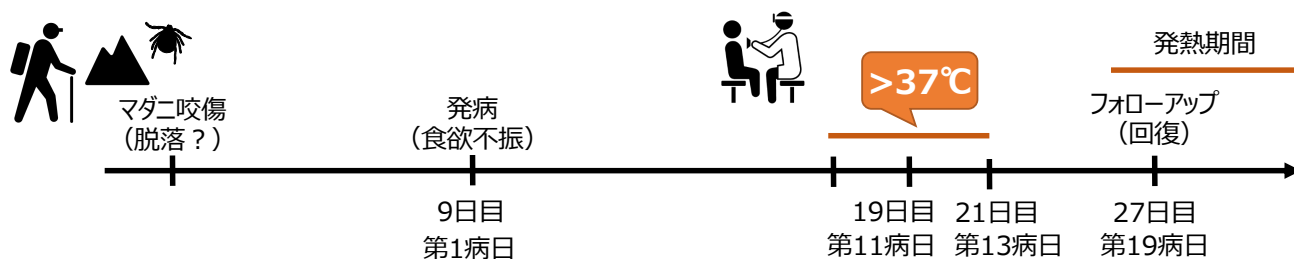
- 培養上清よりもデータ量を増やして（コストをかけて）解析してみたところ、ごくわずかなオルソナイロウイルス遺伝子断片が検出された。
- ウイルス粒子の濃縮，ヒト由来RNAの除去，ウイルス由来RNAの優先的逆転写など，複数の方法を組み合わせを検討すべき。

症例② 来院までの経緯



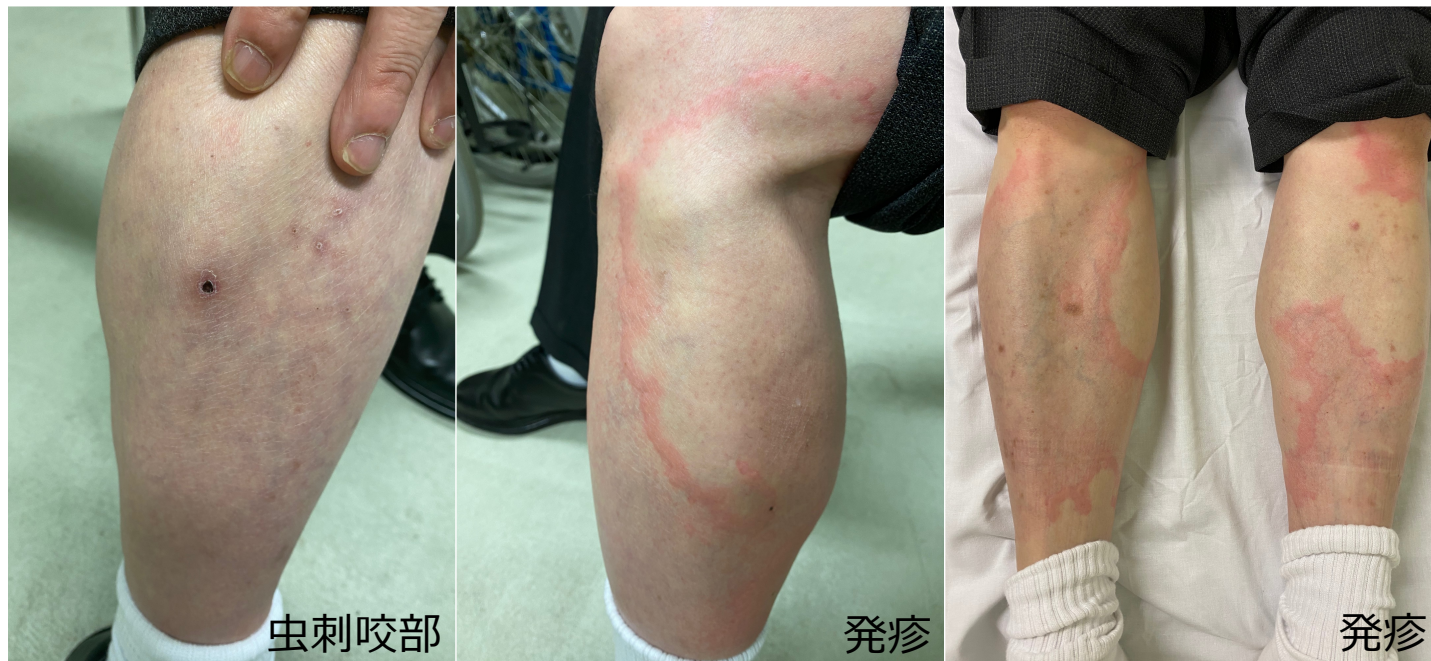
- 特記すべき既往歴のない札幌市在住の50代男性. 喫煙者.
- 8月初旬 (刺咬当日) 道央圏域の山林にて約4時間山歩きを行った.
- 刺咬当日, 右下肢外側に虫付着に気づき30分程度放置した後にズボンの上から叩いた. 搔痒なし.
- 刺咬後9日目から食欲低下. 発熱なし. 17日目に37°C台の発熱が出現した.
- 刺咬後19日目, 札幌市内のA病院を受診した.

症例② 通院時の所見



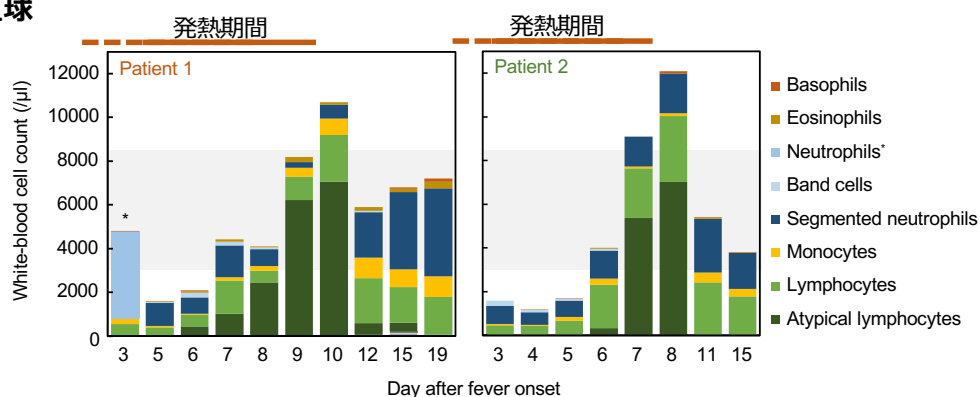
- 19日目, A病院受診. 血液検査で血球減少あり.
- 20日目, B病院紹介受診. 貧血, 血小板減少, 肝機能酵素上昇, LDH上昇. 異型リンパ球認めず. ドキシサイクリン1回100mg・1日2回内服開始.
- 21日目, C病院紹介受診. 白血球減少 (WBC 1.7/ μ L), 血小板減少 (PLT 52.0×10^3 / μ L), 肝機能酵素の上昇 (AST 730 IU/L, ALT 532 IU/L), 筋原性酵素上昇 (CK 442 U/L) などの異常所見を認めた.
- 紅斑/色素沈着様の発疹多数.
- 22日目, ふらつきを主訴とし市立札幌病院再受診, MRI, 神経伝達速度検査では異常所見なし. 発熱寛解し, その後回復.

症例② 体幹部等に見られた発疹

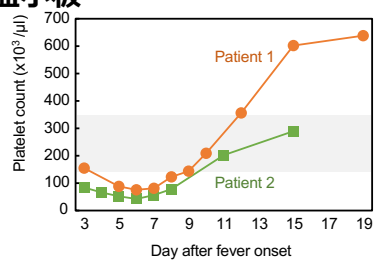


所見まとめ

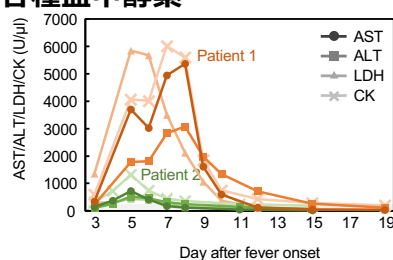
白血球



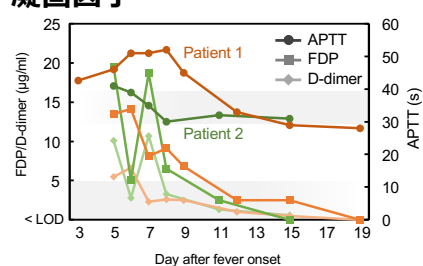
血小板



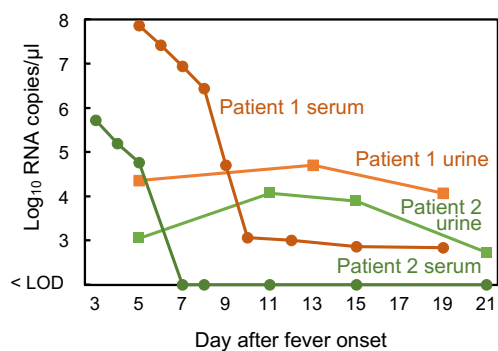
各種血中酵素



凝固因子



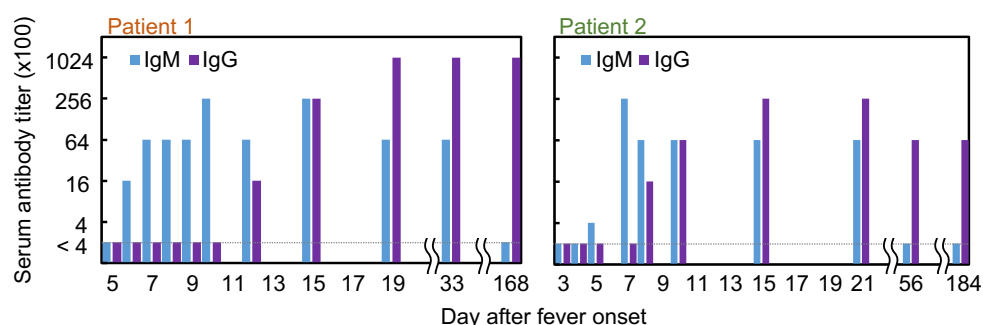
リアルタイムPCR法によるYEZV L分節遺伝子の検出



橙: 2019年に発見された患者（第1例）でのYEZV遺伝子検出量
 緑: 2020年に発見された患者（第2例）でのYEZV遺伝子検出量

- 発熱直後の急性期において、患者血清からYEZV遺伝子が検出され、ウイルス血症を起していると考えられた。
- 尿からのYEZV遺伝子検出量は多くないが、血清よりも長期間に渡り検出された。

ELISA法によるYEZV特異抗体の検出



- 組換えYEZV Nタンパク質をHEK293T細胞に発現させ、細胞可溶化液を抗原としてELISA法を開発した。
- 2例の患者の血清中のELISA抗体価を測定した。
- 急性期に検出されなかったYEZV特異抗体が、時間の経過と共に増加していたことが明らかとなった。

新規YEZV患者の発見と後方視的調査結果（北海道衛研）

Patient ID	性別	年齢	年月	マダニ刺咬歴	発熱	血小板減少	白血球減少	YEZV感染		Borellia感染	
								遺伝子検出	抗体価陽転	<i>B. miyamotoi</i>	<i>B. burgdorferi</i>
HH004-2014	F	60s	2014-May	Y	Y	Y	Y	Y	NA	ND	ND
HH007-2016	M	20s	2016-July	Y	Y	Y	Y	Y	24 d	+	ND
HH008-2017	M	30s	2017-June	Y	39°C	Y		Y	NA	ND	ND
HH009-2017	F	70s	2017-June	Y	38.5°C	Y	Y	Y	NA	ND	+
HH001-2019 (Patient 1)	M	41	2019-May	Y	39°C	Y	Y	Y	12 d	ND	ND
HH011-2020	M	80s	2020-May	Y	38°C	Y	Y	Y	36 d	+	+
HH003-2020 (Patient 2)	M	59	2020-July	Y	38.5°C	Y	Y	Y	8 d	+	+
Total				7/7	7/7	7/7	6/7	7/7	4/7	4/7	
Percentage				100%	100%	100%	85.7%	100%	57.1%	57.1%	

- マダニ媒介性感染症を疑う症例の検査残余検体（北海道衛研）を用いて、開発したリアルタイムPCRおよびELISA法により調査を実施した。
- 5名の患者が発見され、合計で7名の患者が過去7年間で発生していることが分かった。
- YEZV感染症では高率に発熱・血小板減少・白血球減少が見られ、SFTSとの類症鑑別が重要である。
- ボレリア感染症との共感染について、更なる検討が必要である。

野生動物・マダニにおけるYEZV感染状況調査

材料提供：北海道衛研・国立感染研・酪農学園大学・北海道大学獣医学部

北海道のマダニにおけるエゾウイルス陽性率（RT-qPCR）

マダニ種	個体数	メス	オス
<i>H. megaspinosa</i>	106	55	53
Positive	4	1	3
Rate	3.8%	1.8%	5.7%
<i>I. ovatus</i>	213	131	82
Positive	4	1	3
Rate	1.9%	0.8%	3.7%
<i>I. persulcatus</i>	156	87	69
Positive	2	2	0
Rate	1.3%	2.3%	0.0%

北海道の野生動物におけるエゾウイルス特異抗体陽性率（ELISA）

動物種	個体数	陽性数	陽性率
エゾシカ	120	2	1.7%
アライグマ	191	3	1.6%
タヌキ	129	0	0.0%
げっ歯類	42	0	0.0%

- 野生動物材料を用いて、開発したリアルタイムPCRおよびELISA法により調査を実施した。

1. 自己紹介と背景

2. エゾウイルスの発見と検査方法樹立

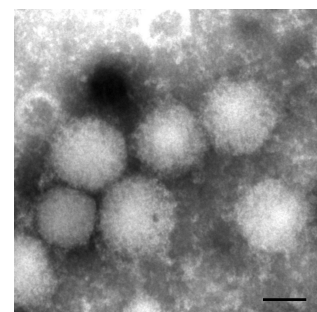
3. エゾウイルスの性状解析

4. エゾウイルスの近縁ウイルス

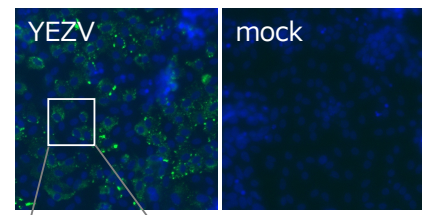
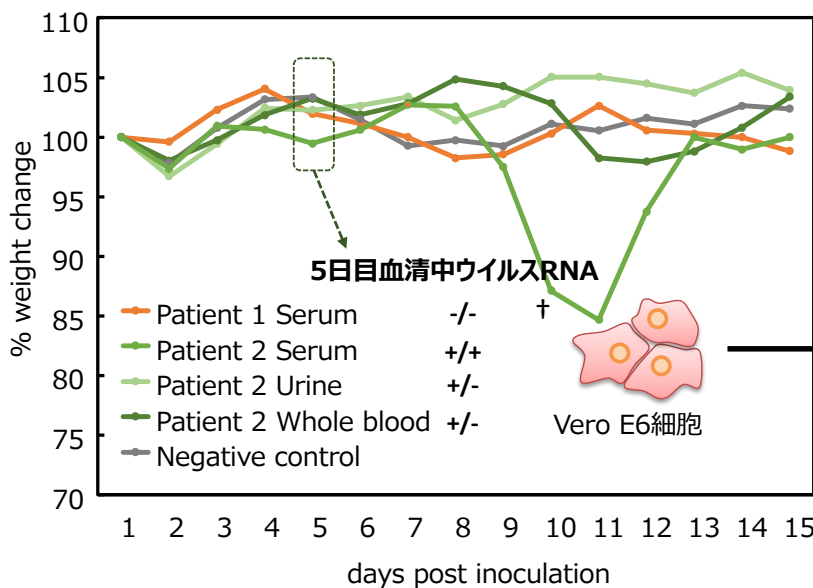


AG129マウスを用いたYEZV分離

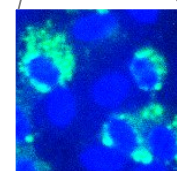
- 1. AG129マウス（インターフェロン α/γ 受容体ダブルノックアウトマウス）4頭に10倍希釈した患者血清を100 μ L/headで腹腔内接種
- 2. 5日目に2頭を安楽死させ、サンプリング



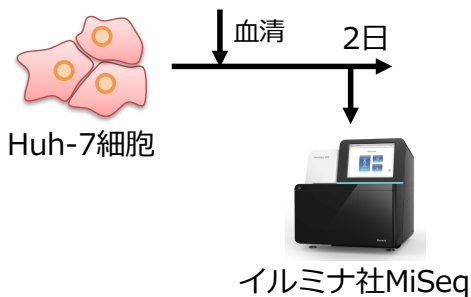
bar = 100 nm



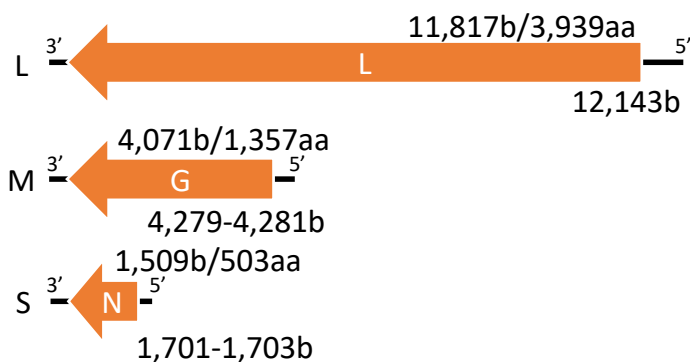
症例2 回復期血清



次世代シーケンサーを用いたエゾウイルスの遺伝子全長解読



- エゾウイルス遺伝子はL, M, Sの3分節からなるマイナス鎖RNA。
- 各分節RNAは1つのタンパク質をコードしており, そのいずれもオルソナイロウイルスに近縁なアミノ酸配列を持つ。
- L: RNAポリメラーゼ
- G: 膜タンパク質
- N: 核タンパク質

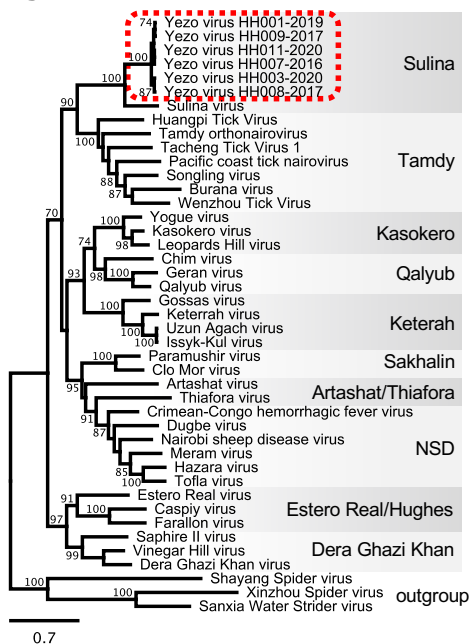


Kodama et al. *Nat Commun* 2021

25

エゾウイルスの遺伝子系統解析

N gene



- エゾウイルスはナイロウイルス科オルソナイロウイルス属に分類される。
- Sulinaウイルスと共に遺伝子群を形成する。
- もっとも近縁なウイルスはTamdyオルソナイロウイルスとその近縁種である。
- Sulinaウイルスはルーマニアのドナウデルタで2016年に採集されたマダニから検出されたウイルス。

Infection, Genetics and Evolution 88 (2021) 104704

Contents lists available at ScienceDirect

ELSEVIER

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Research paper

Discovery and genetic characterization of a novel orthonairovirus in *Ixodes ricinus* ticks from Danube Delta

Tomazatos et al. *Infect Genet Evol* 2021

26

Kodama et al. *Nat Commun* 2021

エゾウイルスはどこから来たのか？

- Sulinaウイルスとエゾウイルスは近縁種だが、それぞれ独立した系統を形成している。
- Sulinaウイルスとエゾウイルスの祖先や、Tamdyウイルスとそれらの祖先にあたるウイルスが、それぞれの地域で進化したものであると考えられる。

1. 自己紹介と背景

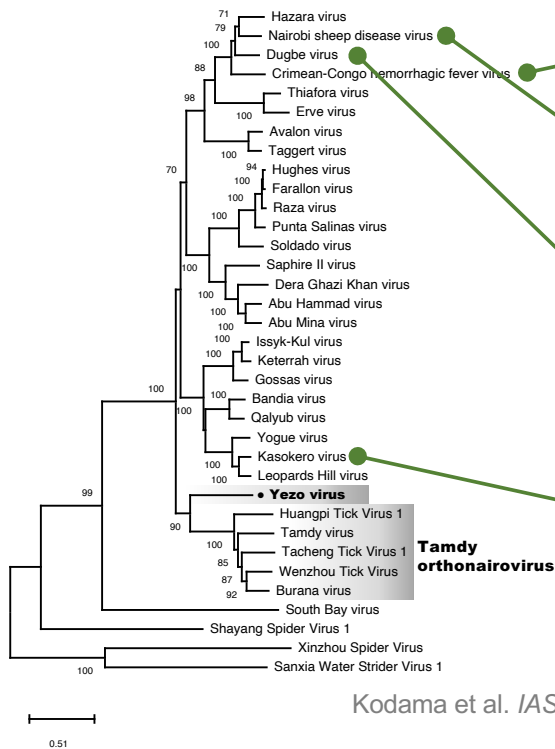
2. エゾウイルスの発見と検査方法樹立

3. エゾウイルスの性状解析

4. エゾウイルスの近縁ウイルス



オルソナイロウイルス属の病原ウイルス



Kodama et al. IASR 2020

クリミア-コンゴ出血熱ウイルス

ダニ媒介性ウイルスでは唯一のBSL4病原体。アフリカ～アジアの広い範囲に分布する。最高で40%の致死率。近年は大きなアウトブレイクは報告されていない。

ナイロビ羊病ウイルス

ヒツジ・ヤギに致死的な病気を引き起こす。ヒトにも感染し、軽度のインフルエンザ様症状を引き起こすことがある。近縁種のGanjamウイルスとともにアフリカ～アジアに分布する。

Dugbeウイルス

ヒトに軽度の熱性疾患を引き起こす。ウシが感受性動物。

Kasokeroウイルス

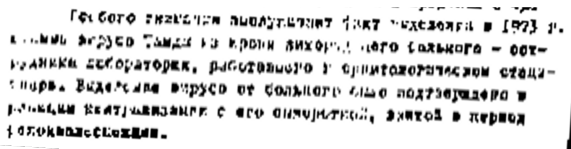
コウモリおよびマダニから分離されたウイルス。実験室内感染によりヒトに熱性疾患を引き起こすことが判明した。

Tamdyオルソナイロウイルスとは

Archives of Virology 51, 15–21 (1976)
© by Springer-Verlag 1976

**Virus "Tamdy" — A New Arbovirus,
Isolated in the Uzbek S.S.R. and Turkmen S.S.R. from Ticks
Hyalomma asiaticum asiaticum Schulee et Schlottke, 1929,
and *Hyalomma plumbeum plumbeum* Panzer, 1796**

Lvov et al. Arch Virol 1976



Karas et al. 1973

- ブハラ（ウズベキスタン）のTamdymskyで採集されたマダニから発見されたウイルス。
- 中央アジアに広く分布しており、哺乳動物に感染することが分かっていた。

1970年代



2010年代



Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses

Ci-Xiu Li^{1,2†}, Mang Shi^{1,2,3†}, Jun-Hua Tian^{4†}, Xian-Dan Lin^{5†}, Yan-Jun Kang^{1,2†}, Liang-Jun Chen^{1,2}, Xin-Cheng Qin^{1,2}, Jianguo Xu^{1,2}, Edward C. Holmes^{1,3}, Yong-Zhen Zhang^{1,2*}

¹State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China; ²Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Hangzhou, China; ³Marie Bashir Institute for Infectious Diseases and Biosecurity, Charles Perkins Centre, School of Biological Sciences and Sydney Medical School, The University of Sydney, Sydney, Australia; ⁴Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Wuhan, China; ⁵Wenzhou Center for Disease Control and Prevention, Wenzhou, China

Li et al. eLife 2015

- 中国からTamdyオルソナイロウイルスと同じ遺伝子群に属するTacheng tickウイルス-1が報告された。
- 中央～東アジアに広く分布する。

Tamdyオルソナイロウイルスは熱性疾患の病原体

Где-то в начале 1973 года в Узбекистане в 1973 г. в одном из районов вблизи Ташкента - отделе вирусологии, расположенного в санитарно-эпидемиологической станции. Впервые вирус от больного был обнаружен в результате исследования с его помощью, жителя в первом обследованном.

Karas et al. 1973

Clinical Infectious Diseases
MAJOR ARTICLE



A Tentative Tamdy Orthonairovirus Related to Febrile Illness in Northwestern China

Xiafei Liu,^{1,2,4} Xu Zhang,^{1,2} Zedong Wang,^{1,2} Zhuhui Dong,² Songsong Xie,² Mengmeng Jiang,² Ruixia Song,² Jun Ma,¹ Shouyi Chen,⁴ Kuncai Chen,⁴ Haoji Zhang,¹ Xinghui Si,¹ Chang Li,¹ Ningyi Jin,¹ Yuanzhi Wang,² and Quan Liu^{1,2,4}

¹School of Life Sciences and Engineering, Foshan University, ²Department of Basic Medicine, School of Medicine, Shihua University, ³The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihua University, ⁴Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, and ⁵Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Science, Changchun, China

Liu et al. *Clin Infect Dis* 2020

- 1973年に、ウズベキスタンで熱性疾患を呈した患者よりTamdyウイルスが分離された。

- 2018年に新疆ウイグル自治区で発熱し、病院を受診した農業従事者の62歳女性からTacheng tickウイルス-1を検出した。

- 周辺地域の住人を対象に血清調査を実施したところ、4.7%が中和抗体陽性であった。

LETTERS

<https://doi.org/10.1038/s41591-020-01228-y>

nature
medicine

Check for updates

Identification of a new orthonairovirus associated with human febrile illness in China

Jun Ma^{1,2,9}, Xiao-Long Lv^{3,9}, Xu Zhang^{1,9}, Shu-Zheng Han^{3,9}, Ze-Dong Wang^{4,9}, Liang Li², He-Ting Sun⁵, Li-Xin Ma⁶, Zheng-Lei Cheng⁷, Jian-Wei Shao¹, Chen Chen⁴, Ying-Hua Zhao⁴, Liyan Sui⁴, Lin-Na Liu⁸, Jun Qian^{9,10}, Wei Wang^{9,10} and Quan Liu^{1,2,4,9}

Ma et al. *Nat Med* 2021

- 2017年に黒龍江省で発熱し、病院を受診した農業従事者の47歳男性からSonglingウイルスを検出した。

- 2017年4月～2018年12月の間に発熱等を主徴とする42人の入院患者からウイルスが検出された。

31

まとめ

- 北海道内でマダニ咬傷後にSFTS様症状を発症した患者より、新規ダニ媒介性ナイロウイルス、エゾウイルスを発見した。
- 2014～2020年の間に7名のYEZV感染症発症者が発生しており、野生動物やマダニでも感染が確認されたことから、YEZVが北海道に定着していることが分かった。
- YEZV感染症の症状はSFTSに類似しているものの、例えば消化器症状が見られないなどの違いはあるかもしれない。また、ライム病・回帰熱ボレリアとの共感染が半数（4名）の患者で見られた。
- 急性の発熱・白血球減少・血小板減少が見られ、ウイルス感染が強く疑われるにもかかわらず、起因ウイルスの同定ができない場合、網羅的なウイルス探索技術が有用である。

いつでもご相談ください！



本発表に関する問い合わせ先

北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所
危機分析・対応部門

松野啓太 matsuk@czc.hokudai.ac.jp

原因不明の熱性疾患への対応について

- 既存の検査により、既知の感染症が否定されることが重要.
- 次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体探索のルーチン化.
- ウィルス学的手法（分離培養技術）と次世代シーケンサーを組み合わせた網羅的病原体探索手法の提供.



One Health Research Center (OHRC)

多様な人材が、組織・研究室・部門の壁を超えてOne Healthを共通目標に集い協働する、実践教育と研究を進めるプラットフォーム

本発表に関する問い合わせ先

北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所
危機分析・対応部門

松野啓太 matsuk@czc.hokudai.ac.jp