

希少感染症診断技術研修会 事後公開資料

2024年2月14日

オズウィルス感染症

国立感染症研究所

感染病理部

峰 宗太郎

背景

- 新興感染症を引き起こす病原性ウイルスの実態把握は、公衆衛生にとって重要な研究課題である。
- 多くの新興感染症は動物由来であることが知られており、ヒト症例の発生に先んじて、動物におけるウイルス探索が公衆衛生対策として重要と考えられている。
- 様々な動物や節足動物等からヒト病原性が予測されるウイルスの探索が試みられており、世界中から様々な新規ウイルスが同定され報告されている。
- ヒト初感染例の発見と解析は重要である。

オズウイルス

- オズウイルス (Oz virus, OZV) はオルソミクソウイルス科 (Family *Orthomyxoviridae*) トゴトウイルス属 (Genus *Thogotovirus*) に分類される新規の RNA ウィルスである。
- 2018年に本邦で、タカサゴキララマダニ (*Amblyomma testudinarium*) より分離同定の報告がされ、野生動物の血清抗体調査によって国内での広い分布が予測されていたが、世界的にヒト感染例は確認されていなかった。

Virus Research 249 (2018) 57–65

Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/virus

Characterization of a novel thogotovirus isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks in Ehime, Japan: A significant phylogenetic relationship to Bourbon virus

Hiroko Ejiri^{a,b,1}, Chang-Kweng Lim^{a,1}, Haruhiko Iwawa^{a,c}, Ryosuke Fujita^{d,e,f}, Katunori Murota^g, Tomomi Sato^h, Daisuke Kobayashiⁱ, Miki Kan^j, Masashi Hattori^k, Toshiya Kimura^l, Yukie Yamaguchi^m, Mutsuyo Takayama-Hoⁿ, Madohka Horiya^o, Guillermo Posadas-Herrera^p, Shobhi Misra^q, Ryusei Kuwano^r, Hiroshi Shimoda^s, Ken Maeda^t, Yukie Katayama^u, Tetsuya Mizutani^v, Masayuki Saijo^w, Koki Kaku^x, Hiroto Shinomiya^y, Kyoko Sawabe^{z,1}

^aDepartment of Medical Microbiology, National Institute of Infectious Diseases, 2-1-1 Toyonaka, Suita-shi, Tokyo 565-0871, Japan

^bInstitute of Infectious Disease Epidemiology and Control, National Defense Medical Research Institute, National Defense Medical College, 3-2 Honkai, Ichikawa-shi, Chiba 270-8513, Japan

^cDepartment of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyonaka, Suita-shi, Tokyo 565-0871, Japan

^dDepartment of Health Sciences, Japan Agency for Medical Research and Development, 2-1-1 Honcho, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8501, Japan

^eGenetic Engineering Laboratory, Osaka University Institute of Health Sciences, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

^fSenior Professorial Institute of Public Health and Environmental Science, 4-2-10 Inada-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-0003, Japan

^gDepartment of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, 2-2-1 Yamaguchi, Yamaguchi 753-8511, Japan

^hResearch and Education Center for Prevention of Global Infectious Disease of Aomori, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 103-8502, Japan

ⁱDepartment of Agriculture and Environmental Design, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi-cho, Tokyo 113-8657, Japan

^jDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^kDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^lDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^mDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

ⁿDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^oDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^pDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^qDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^rDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^sDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^tDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^uDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^vDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^wDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^xDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^yDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

^zDepartment of Pathology, Ehime University, 3-1-1 Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8587, Japan

ARTICLE INFO

Keywords: Thogotovirus; Tick-borne virus; Whole genome analysis; Amblyomma testudinarium

ABSTRACT

The genus *Thogotovirus*, as represented by Thogoto virus and Dhori virus, comprises a group of arthropod-borne viruses, most members of which are transmitted by ticks. Here we report the genetic and biological characterization of a novel thogotovirus, designated Oz virus (OZV), isolated from the hard tick *Amblyomma testudinarium* in Ehime, Japan. OZV efficiently replicated and induced a cytopathic effect in Vero cells, those which developed pleomorphic virus particles were found by budding. OZV could also replicate in BHK-21 and BMD-21 cells and caused high mortality in suckling mice after intraperitoneal inoculation. Phylogenetic analysis of its viral proteins (GP1 and matrix protein M2) sequences to Bourbon virus, a human pathogenic thogotovirus discovered recently in the United States. Our findings emphasize the need for understanding the geographic distribution and ecology of OZV and related viruses and for reevaluation of the medical and public health importance of thogotoviruses.

1. Introduction

The family *Orthomyxoviridae* is defined by viruses that possess a negative-sense, single-stranded, and segmented RNA genome. Currently, it includes seven genera: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Influenzavirus D*, *Havivirus*, *Quarantivirus*, and *Thogotovirus* (McCauley et al., 2012; Adams et al., 2013). Recently, by using phylogenetic analyses, many positive members of this virus family were found from various invertebrates, almost all of which remain unclassified and uncharacterized (Ejiri et al., 2018). The genus *Thogotovirus* comprises a group of arthropod-borne viruses, most members of which are transmitted by ticks in the family

DISPATCHES

Zoonotic Infection with Oz Virus, a Novel Thogotovirus

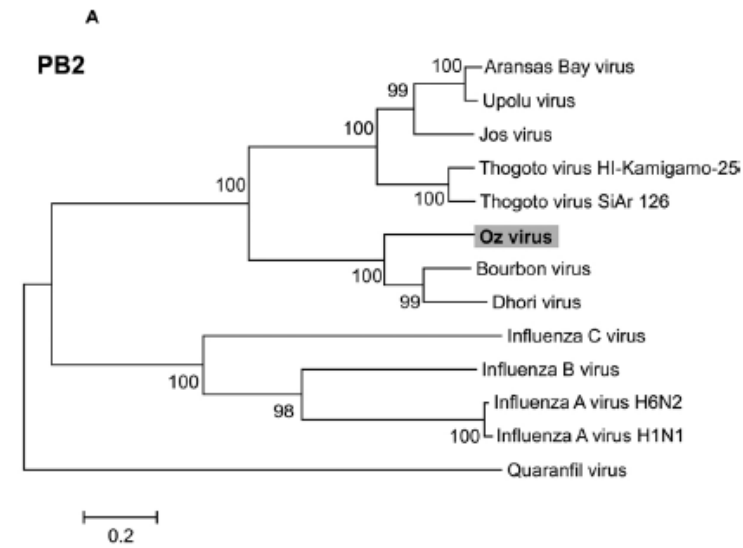
Ngo T.B. Tran, Hiroshi Shimoda, Kota Ishijima, Kenzo Yanemitsu, Shoshi Mizunari, Supriyono, Yudai Kuroda, Kango Tatemoto, Mitaogros V. Mendocsa, Ryusei Kuwano, Ai Takano, Masahiko Muto, Kyoko Sawabe, Haruhiko Iwawa, Daisuke Hayasaka, Ken Maeda

Oz virus is a novel thogotovirus isolated from ticks that causes lethal infection in mice. We conducted serosurveillance of Oz virus infection among humans and wild mammals in Japan using virus-neutralization tests and ELISAs. Results showed that Oz virus may be naturally infecting humans and other mammalian hosts.

The Study

To examine whether mammals are naturally infected with Oz virus, we collected serum samples from 24 hunters and 240 wild animals (40 Japanese macaques [*Macaca fuscata*], 124 wild boars [*Sus scrofa*], and 76 sika deer [*Cervus nippon*]) captured in Yamaguchi prefecture, Japan, during 2015–2019. Because Yamaguchi prefecture is close to Ehime prefecture and the environment in Yamaguchi is very similar to that in Ehime, we used stocked samples in Yamaguchi prefecture for the first surveillance of Oz virus infection. To test for the presence of Oz virus antibodies in the serum samples, we performed a PRNT₅₀ (80% plaque-reduction neutralizing test) using Oz virus (Table 1). Among humans, 8.3% of the serum samples had Oz virus neutralization (VN) antibodies; VN titers were 1:40 and 1:80. In wild animals, serum from 47.5% of macaques, 60.5% of wild boars, and 73.7% of sika deer in Yamaguchi had Oz virus VN antibodies (Table 1).

We applied ELISA protocol used for serosurveillance of many infectious diseases (11–13) to detect Oz virus antibodies in the serum samples from wild animals. We extracted proteins from Oz virus or mock-infected Vero cells and used the extracts as ELISA antigens. To prepare the primary antibody, we diluted serum samples 1:100 in phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 and 0.4% Block Ace. We used peroxidase-conjugated recombinant protein A/G (Thermo Fisher Scientific, <https://www.thermo-fisher.com>) as the secondary antibody and RFL-ABTS peroxidase substrate (SeraCare Life Sciences, <https://www.sera-care.com>) as the detection reagent. We measured absorbance using a spectrophotometer.



症 例

2022年初夏、高血圧症・脂質異常症を既往にもち、海外渡航歴のない茨城県在住の70歳代女性に倦怠感、食欲低下、嘔吐、関節痛が出現し、39℃の発熱が確認された。在宅で経過を観察していたが、症状が増悪し体動困難となったため再度受診しその後紹介転院となった。

来院時、意識は清明で血圧 121/80 mmHg、脈拍数 105 bpm (整)、体温 38.3℃、呼吸数 22/min.、SpO2 94%(室内気)で、身体所見としては右大腿部に皮下出血が認められたが皮疹はみられなかった。

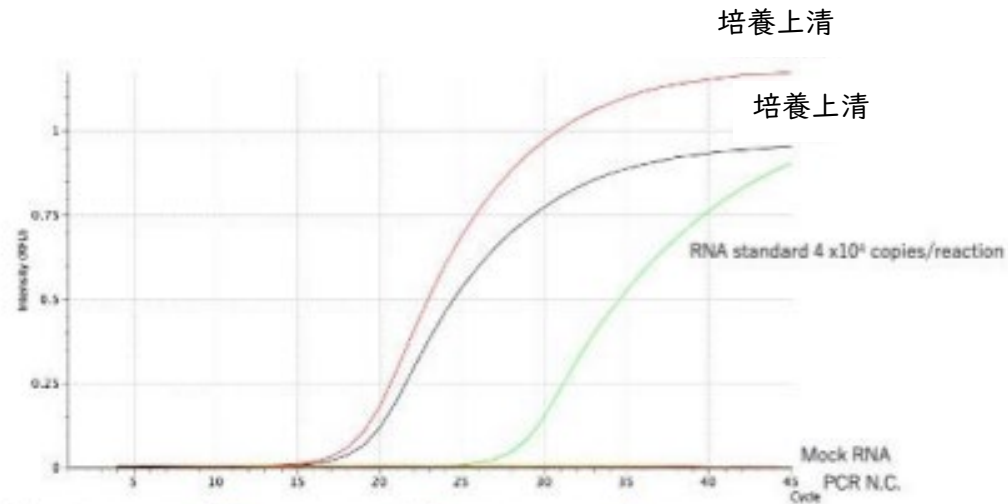
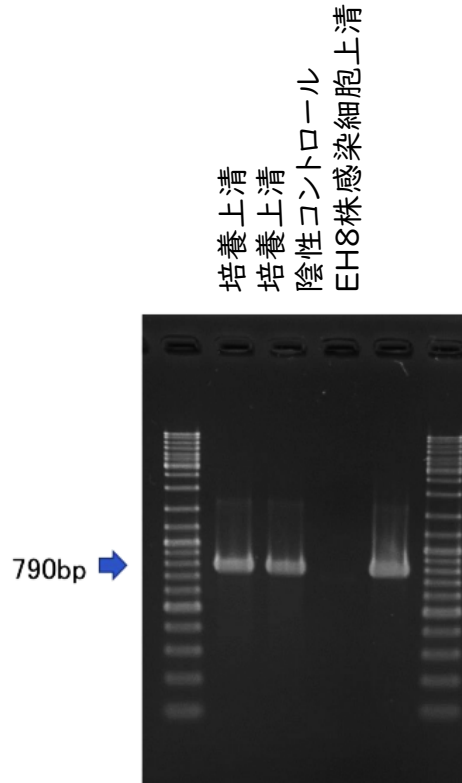
血液検査で、血小板減少 (6.6万/ μ l)、肝障害、腎障害、炎症反応高値(CRP 22.82mg/dl)、CK高値(2049U/l、CK-MB 14IU/l)、LDH高値(671U/l)、フェリチン高値(10729ng/ml)があった。

入院時、右鼠径部にマダニと考えられるダニの吸着が確認されたため、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)を含む節足動物媒介感染症も疑われ、入院加療となった。

検査ではリケッチア感染症・SFTS、結核、CMV・EBV活性化や膠原病は否定された。

入院後、房室ブロックが認められペースメーカーを留置した。各種検査では心筋炎が疑われた(CK-MBは145(day10)でピークアウト)。治療継続中の入院26日目、突如心室細動が生じて死亡し、病理解剖がおこなわれた。

ウイルス分離等

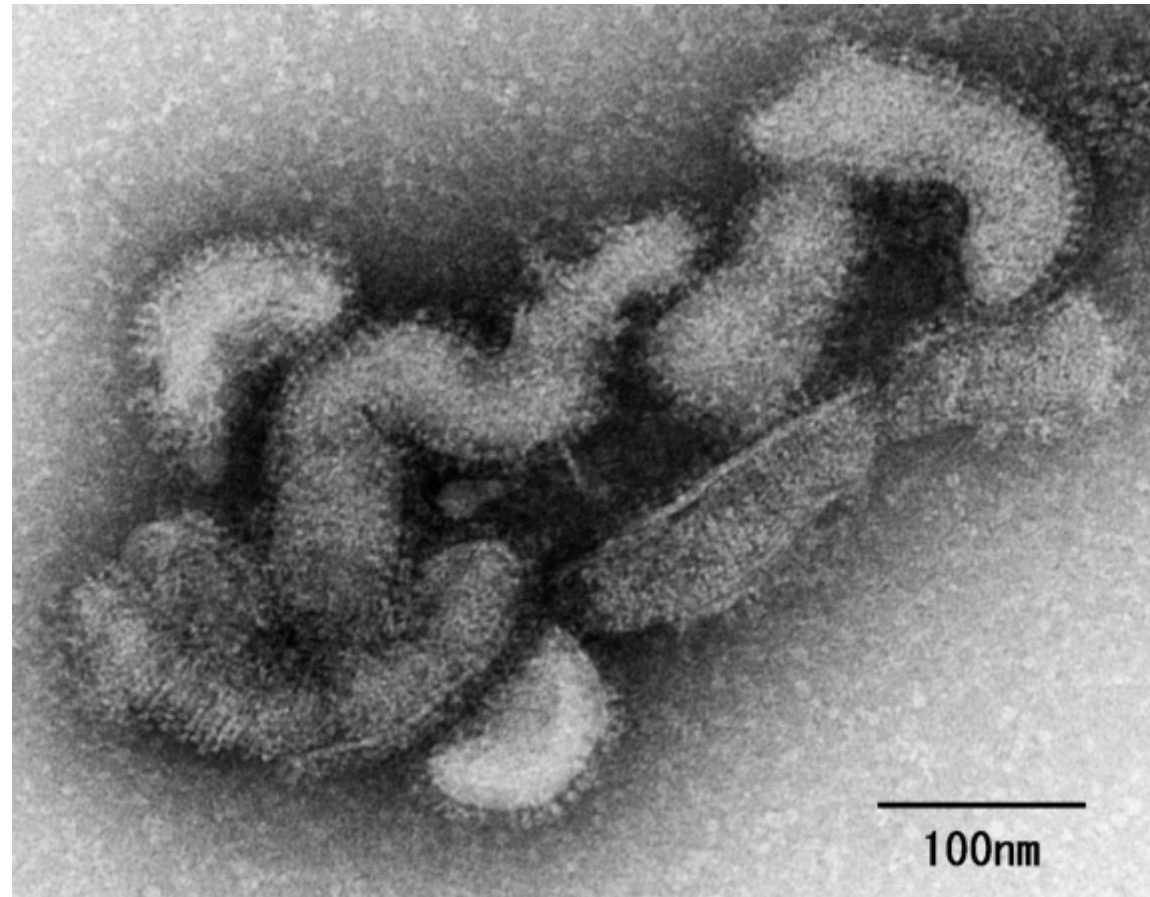


■ Cq : 18.092414644682698 Dye : FAM Position : A3 Sample : OZV sample 2 Target : Target 2	■ Cq : 17.42948473672199 Dye : FAM Position : A3 Sample : OZV std 4 Target : Target 2	■ Cq : Negative Dye : FAM Position : A3 Sample : OZV Neg Target : Target 2	■ Cq : Negative Dye : FAM Position : A3 Sample : OZV PCR NC Target : Target 2
---	---	--	---

Sample	Quantity/reaction (4uL RNA)
OZV std 4	40000
OZV sample 1	1.76E+07
OZV sample 2	1.36E+07
OZV Mock	ND
OZV PCR NC	Negative

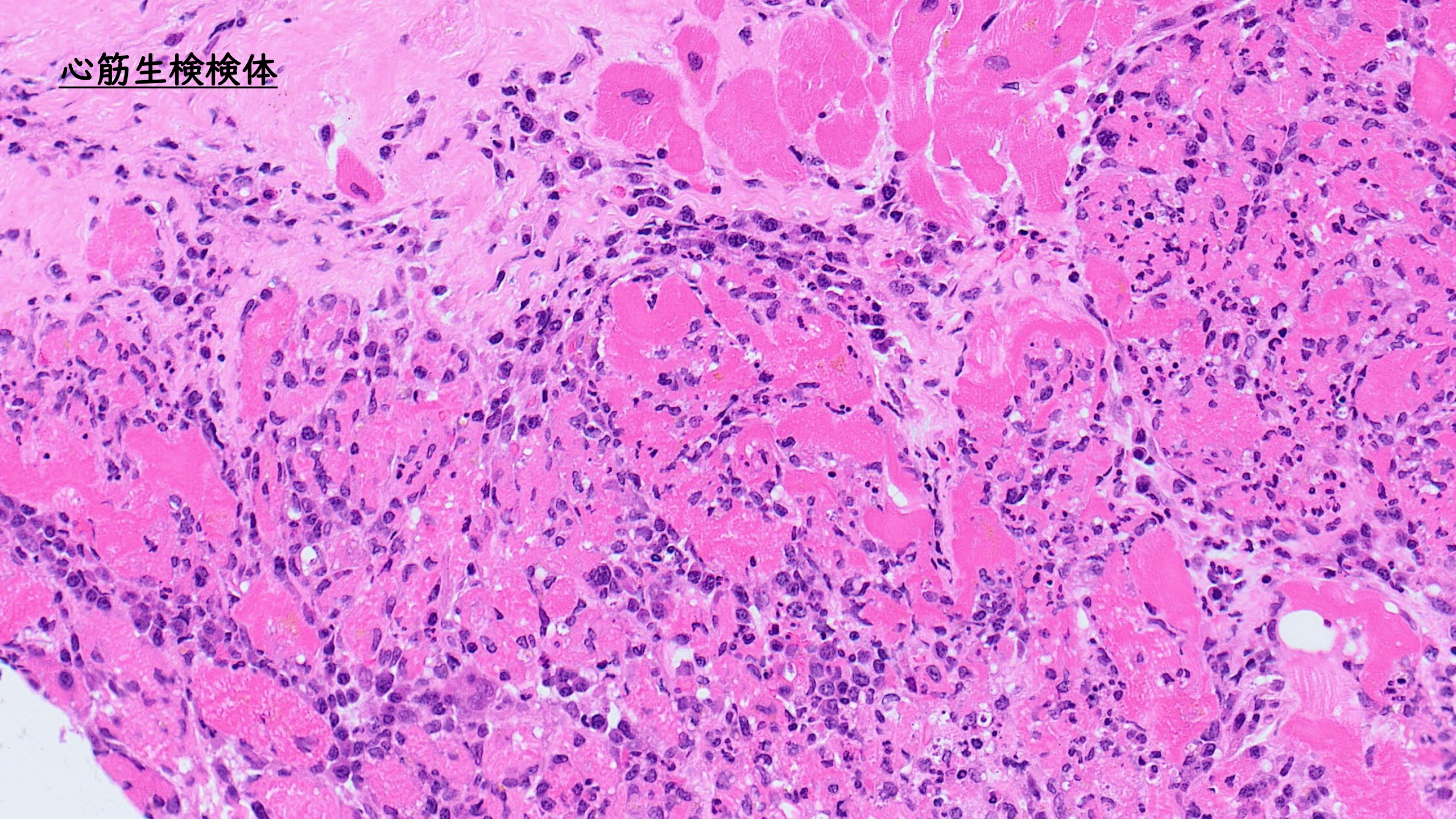
茨城県衛生研究所で血液等よりウイルス分離を試みたところ Vero 細胞でウイルスが分離され、メタゲノム NGS データの検索でオズウイルスにマッチした。
→ コンベンショナルPCRと qPCR で OZV 核酸断片が確認された

電子顕微鏡像

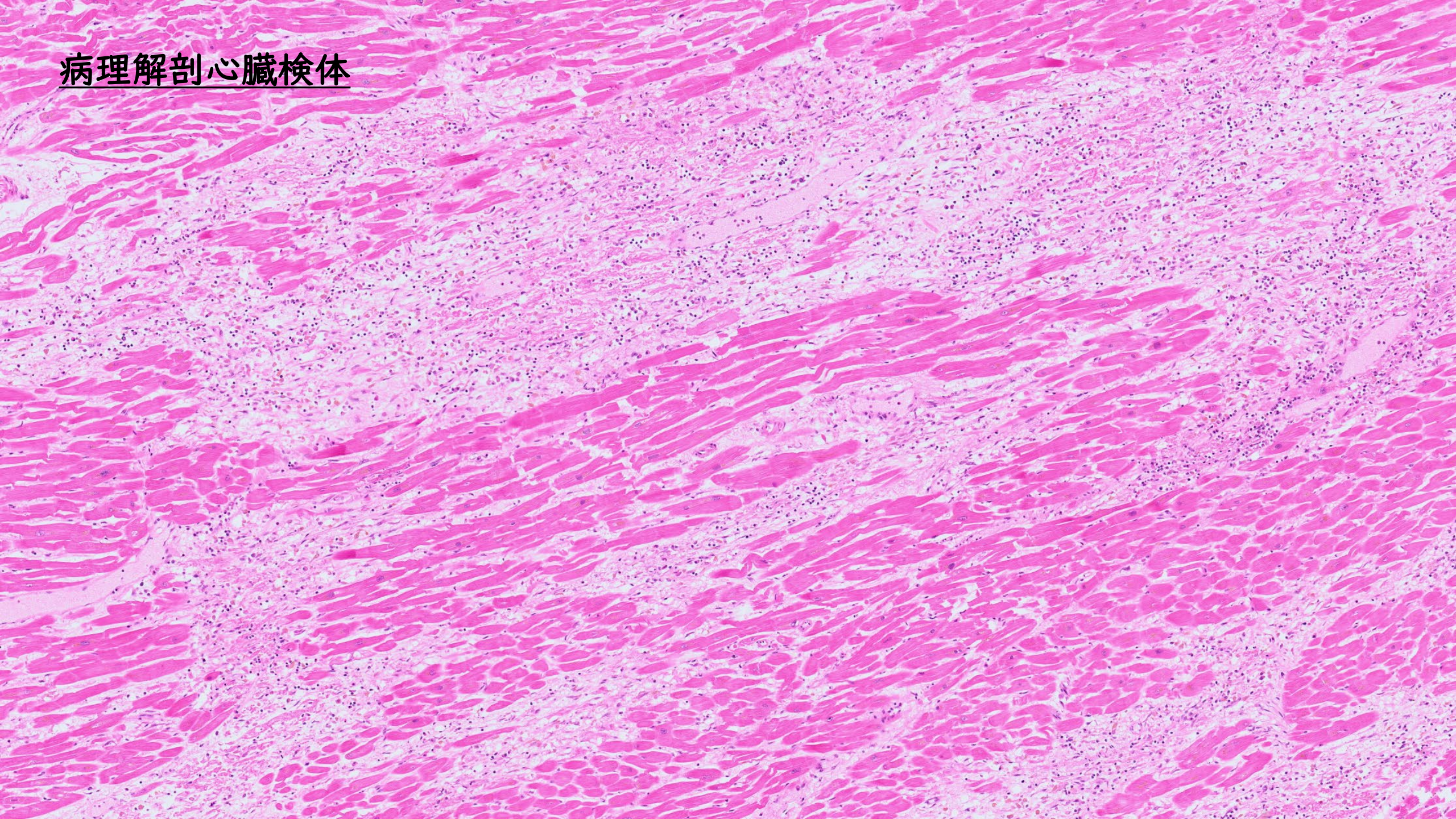


培養上清の電子顕微鏡検索でウイルス粒子が確認された

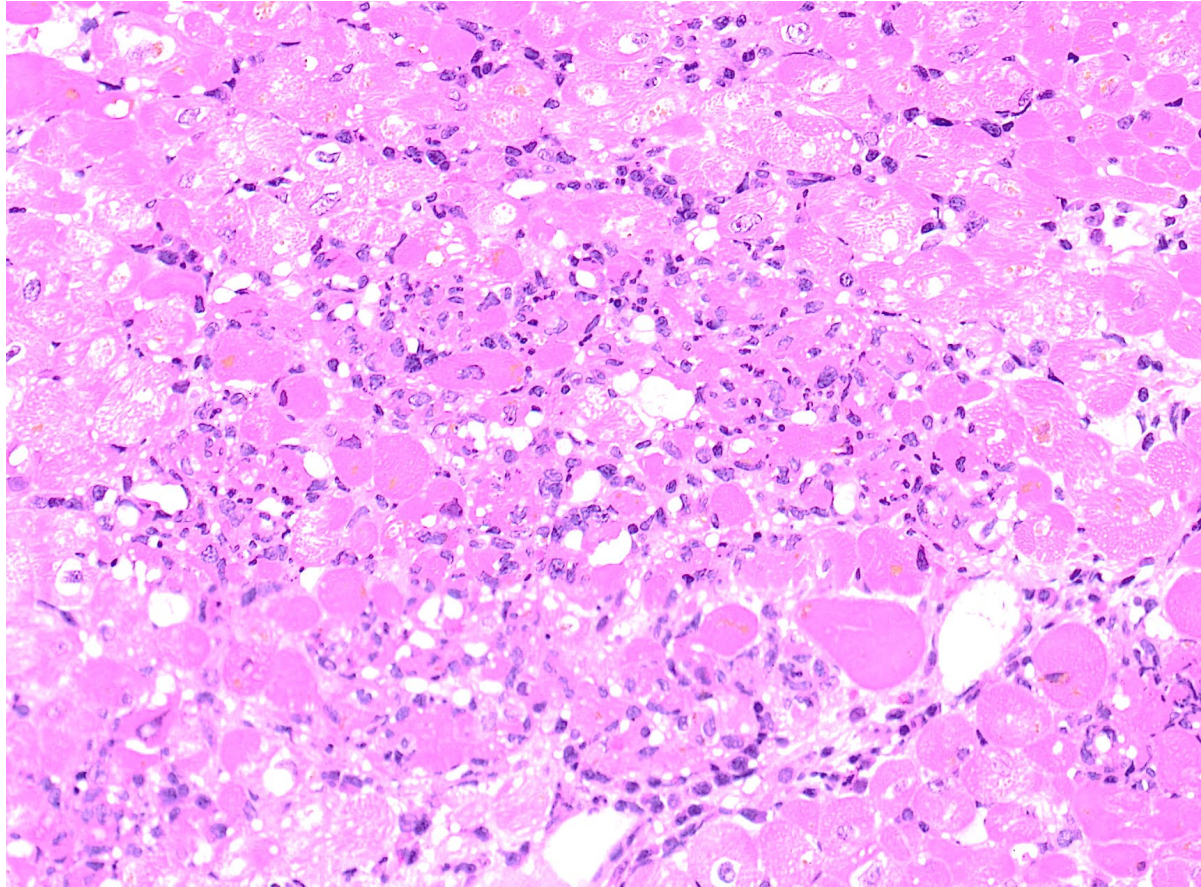
心筋生検検体



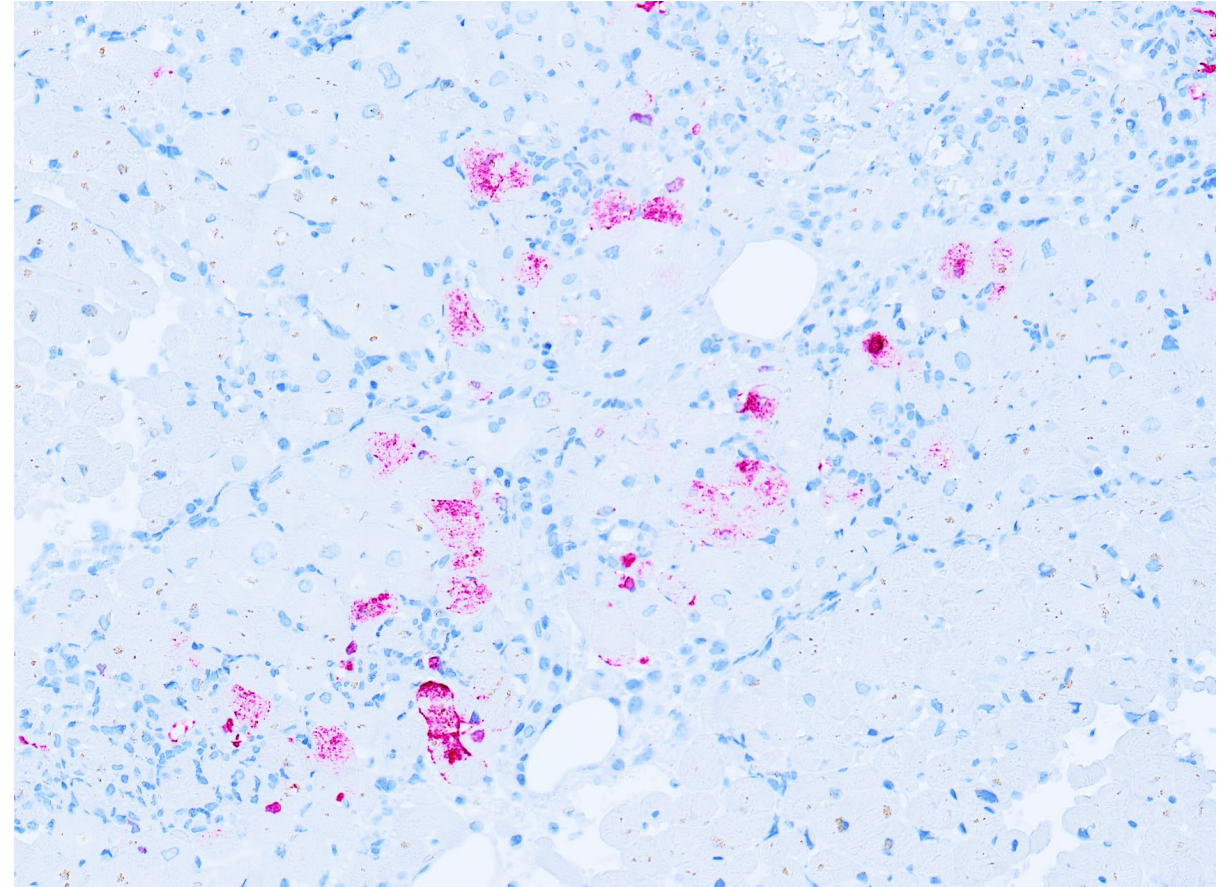
病理解剖心臟檢體



病理学的検討 - 心筋生検 - 心筋炎



HE



RNAscope MP genome

炎症細胞浸潤の強い部分の心筋細胞にウイルス核酸を検出した

文献考察

- トゴトウイルス属のウイルスには、Bourbon virus (BRBV)、Dhori virus (DHOV)、Thogoto virus (THOV) などがある。本属のウイルスの多くは、マダニまたはヒメダニから検出され、主にマダニを媒介動物として脊椎動物へ伝播すると考えられている。
- 哺乳類への病原性としては、THOV がヒツジで熱性疾患および流産を引き起こすことが知られており、これまでヒトには BRBV、THOV、DHOV が感染することが知られていた。
- OZV は BRBV と系統的に近い。
- ヒト THOV および DHOV 感染症例では髄膜炎・脳炎が、BRBV 感染症例では急性骨髄抑制による血小板減少、白血球減少などが現れ、これらでは致死例も報告されている。
- 日本国内の血清抗体調査では野生動物（ニホンザル、イノシシ、シカ）において西日本から東日本の一部まで広く抗 OZV 抗体保有個体が検出されているほか、狩猟者でも抗体陽性者が見つかっている（2/24, 8.3%）。

診断法についてのまとめ

- 新たなウイルス感染症であること・病原体検出
 - NGS で**核酸断片を捕まえる**ことがきっかけとなった
 - ウイルス分離・電子顕微鏡によるウイルス粒子確認
 - コンベンショナルなPCR・シーケンス・qPCR で**存在確認**
- NGS フルシーケンスで**病原体同定・系統確定**
- 各臨床検体・病理標本より qPCR で定量、**存在・局在確認**
- 病理標本評価により**病変・病変への局在を確認**
- 網羅的検出法の追加により**他の病原体の関与を検討・除外**
- 臨床情報・病理組織学的検討により**病態・病理、死因の検討**

まとめ

- Oz ウイルス感染症例、致死例、心筋炎例、世界初の症例を解析し、IASR で報告を行った。
- 臨床検体より核酸同定、全長ゲノム決定、ウイルス分離がなされた。
- 病理学的解析では心筋炎のみが顕著な所見で、同部位のみから OZV 核酸断片が検出された。
死因もウイルス性心筋炎と確定診断可能と言える状況であった。
- 心筋生検では核内 + 細胞質内に MP-RNA の陽性シグナル、解剖例では細胞質内のみ陽性。
 - 生検時点ではアクティブなウイルス増殖と心筋炎が考えられる。
 - 解剖時には「燃え尽きて」病変が残存し、ウイルス増殖はすでに起こっていないことが考えられる。