

エゾウイルスについて

松野 啓太 (まつの けいた)

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
危機分析・対応室



1. 背景

2. 症例報告

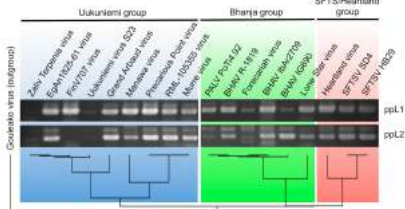
3. エゾウイルスと近縁種



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

*最新の分類ではフェヌウイルス



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

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エマダニから
新規ウイルス (Mukawa virus) を発見

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

Matsuno et al. mSphere 2018



Torii et al. Ticks Tick-borne Dis 2019

1. 背景

2. 症例報告

3. エゾウイルスと近縁種



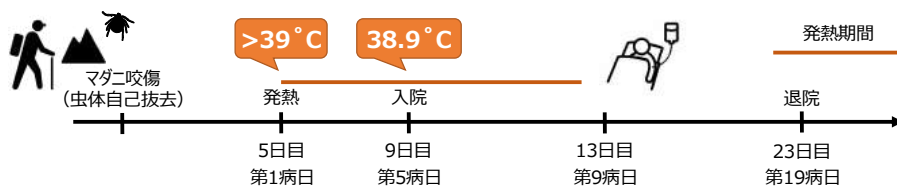
5

症例①



6

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。

7

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 $1.6/\mu\text{L}$)、血小板減少 (PLT $87.0 \times 10^3/\mu\text{L}$)、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。

8

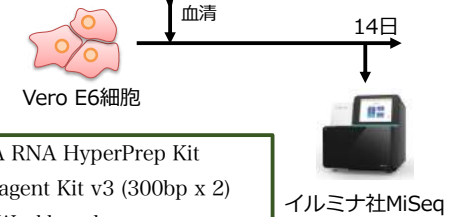
症例① 入院後の臨床経過



- 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

9

次世代シーケンサーを用いた網羅的ウイルス探索

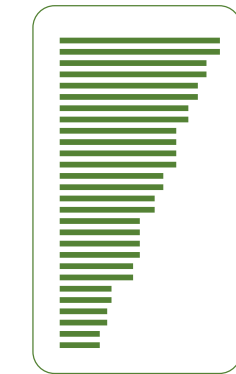


- ライブラリ調整: KAPA RNA HyperPrep Kit
- シーケンス: MiSeq Reagent Kit v3 (300bp x 2)
- 解析: CLC Genomics Workbench

10

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



ORF
サーチ
BLASTp
検索

リード: 5Gb
300塩基弱の配列データ

de novo
assembly

Contig 192191 → 1891 b

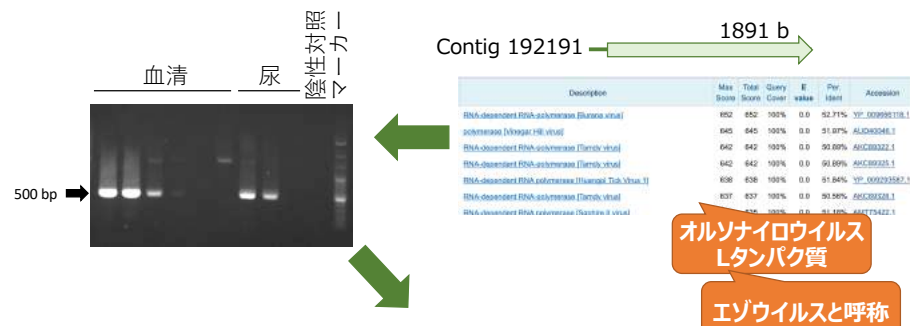
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acceptance
RNA-dependent RNA-synthetase [Bornaia virus]	852	852	100%	0.0	52.71%	YP_009992118.1
polymerase [Venezia Hill virus]	845	845	100%	0.0	31.87%	AL508346.1
RNA-dependent RNA-synthetase [Tartu virus]	842	842	100%	0.0	30.89%	AF030322.1
RNA-dependent RNA-synthetase [Tartu virus]	842	842	100%	0.0	30.89%	AF030323.1
RNA-dependent RNA-synthetase [Isumori Tick Virus 1]	838	838	100%	0.0	91.84%	YP_009293587.1
RNA-dependent RNA-synthetase [Tartu virus]	837	837	100%	0.0	30.58%	AF030324.1
RNA-dependent RNA-synthetase [Bornaia virus]	752	752	100%	0.0	31.12%	AF030322.1

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



11

RT-PCR法によるエゾウイルス遺伝子断片の検出



発熱期間

病日	5	7	10	13	15	19	33
血清	+++	+++	++	NT	+	-	-
尿	+++	NT	NT	+++	NT	++	-

NT: not tested

12

症例②



13

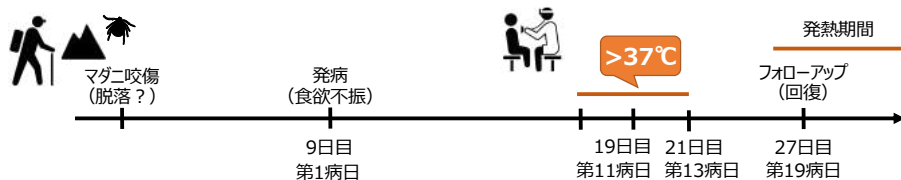
症例② 来院までの経緯



- ・ 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。

14

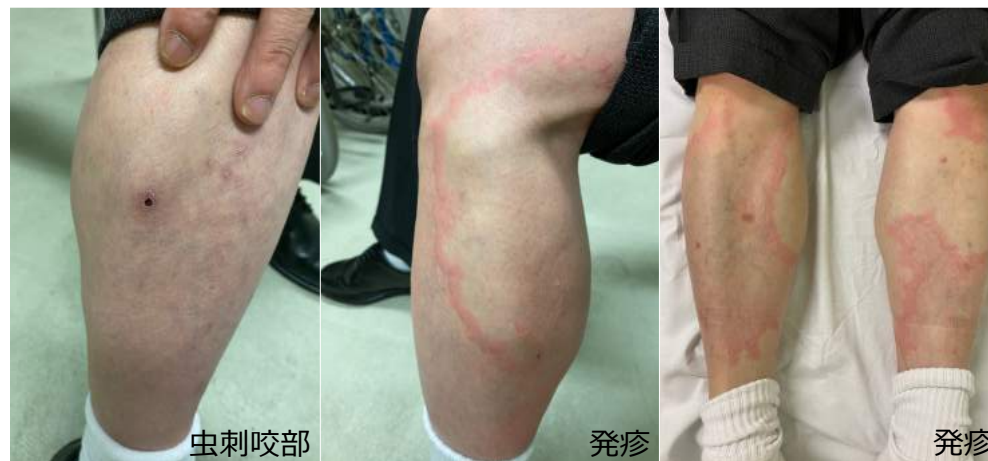
症例② 通院時の所見



- ・ 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、市立札幌病院紹介受診。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。

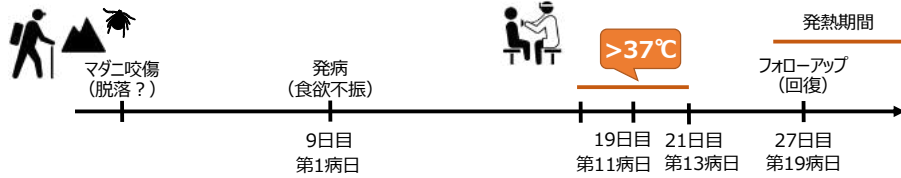
15

症例② 体幹部等に見られた発疹



16

症例② 通院中のエゾウイルス遺伝子検出結果



病日	11	12	13	15	19	23
血清	+++	+++	++	++	-	-
尿	NT	NT	+	++	++	++

17

所見まとめ

症例①

発熱期間

病日	5	7	10	13	15	19	33
血清	+++	+++	++	NT	+	-	-
尿	+++	NT	NT	+++	NT	++	-

- いずれの患者も、山林での長時間の活動中にマダニに咬傷を受けたと考えられる。

- 発熱・白血球減少・血小板減少を主とするSFTS様所見が認められた。

- 歩行困難、ふらつきが見られた。

症例②

病日	11	12	13	15	19	23
血清	+++	+++	++	++	-	-
尿	NT	NT	+	++	++	++

- エゾウイルス遺伝子が発熱寛解直後まで血清中から検出され、さらにその後も尿中から検出された。

18

血清中のエゾウイルス特異的抗体の推移

症例①

発熱期間

病日	5	7	10	13	15	19	33	168
血清	+++	+++	++	NT	+	-	-	-
尿	+++	NT	NT	+++	NT	++	-	NT
血清中抗体	-	-	+	NT	+	+	+	-

症例②

病日	11	12	13	15	19	23
血清	+++	+++	++	++	-	-
尿	NT	NT	+	++	++	++
血清中抗体	-	-	-	-	+	+

- 血清中のウイルス遺伝子消失に伴い、特異抗体の産生が確認された。

19

1. 背景

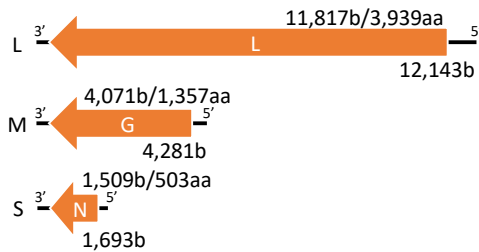
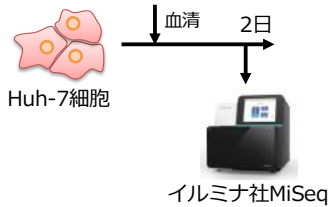
2. 症例報告

3. エゾウイルスと近縁種



20

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

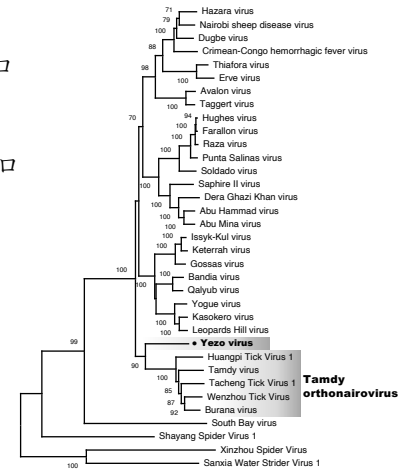


- エゾウイルス遺伝子はL, M, Sの3分節からなるマイナス鎖RNA。
- 各分節RNAは1つのタンパク質をコードしており、そのいずれもオルソナイロウイルスに近縁なアミノ酸配列を持つ。
- L: RNAポリメラーゼ
- G: 膜タンパク質
- N: 核タンパク質

21

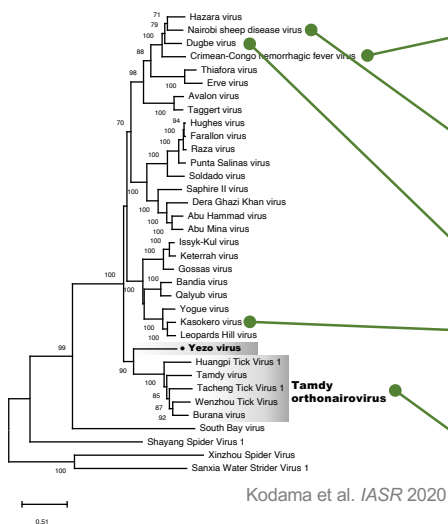
エゾウイルスの遺伝子系統解析

- 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。
- 単独の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。



22

オルソナイロウイルス属の病原ウイルス



- 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群

23

Tamdyオルソナイロウイルスとその類縁ウイルス

Archives of Virology 31:15-21 (1954)
by Springer-Verlag 1954

Virus "Tandy" - A New Arbovirus,
Isolated in the Uzbek S.S.R. and Turkmen S.S.R. from Ticks
Hyalomma asiaticum asiaticum Schulze et Schlotzke, 1929,
and *Hyalomma pluschanki pluschanki* Panzer, 1796

И. К. ЛЮВ, Г. А. Н. ГОРБА, В. Л. ТРОФИМЕНКО, М. КУРБАНА,
Л. М. СКАРЖИНА, П. П. ГОРБАН, Л. К. БЕРДИЯ, С. М. КИРБИЯ,
А. А. ЗАКАРЯС, А. А. АРДИНА, and V. M. NEJOSKA
The D. I. Ivanovsky Institute of Virology,
U.S.S.R. Academy of Medical Sciences,
Moscow, U.S.S.R.

With 1 Figure
Archives November 28 1973

Lvov et al. Arch Virol 1976



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

Ci Xia Li^{1,2}, Meng Shi^{1,2,3}, Jun-Hua Tian¹, Xian-Dan Lin¹, Yan-Jun Kang^{1,2}, Liang-Jun Chen¹, Xin-Cheng Qin¹, Jianguo Xu¹, Edward C Holmes^{1,2}, 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; ³Maria 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

- 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

- 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 virus-1が報告された。
- 中央〜東アジアに広く分布する。

24

Tamdyオルソナイロウイルスは熱性疾患の病原体

Clinical Infectious Diseases
MAJOR ARTICLE



A Tentative Tamdy Orthonairovirus Related to Febrile Illness in Northwestern China

Xiafei Liu,^{1,2*} Xu Zhang,^{1,2} Zedong Wang,^{1,2} Zhihui Dong,^{1,2} Songsong Xin,^{1,2} Mengmeng Jiang,¹ Raixin Song,¹ Jun Ma,¹ Shenyi Chen,¹ Kancai Chen,¹ Haiyi Zhang,¹ Xinghai Si,¹ Chang Li,¹ Mengyi Jin,¹ Yuanzhi Wang,^{1,2} and Uuse Lu^{1,2,3*}
¹School of Life Science and Engineering, Fudan University, ²Department of Basic Medicine, School of Medicine, Shanghai University, ³The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihai University, ⁴Southeast University, ⁵Southeast University Center for Disease Control and Prevention, and ⁶Key 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

25

- 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 virus-1 を検出した。
- 急性期の血清、尿、咽頭スワブ、脳脊髄液からウイルス遺伝子が検出された。
- 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。
- 遺伝子陽性率は牛で4.9%、羊で9.2%、マダニは種類によって異なるものの4.8-14.3%と比較的高かった。

エゾウイルス・エゾウイルス熱の現状と展望

- ✓ AG129マウス・Huh-7細胞を用いて安定した分離培養に「ようやく」成功
 - ウイルス粒子の電子顕微鏡写真撮影
 - CPEを示す細胞やプラークを形成する細胞の探索→ウイルス力価測定法樹立
 - 中和試験
 - ポジコンとして配布
- ✓ 哺乳動物細胞における組換えNタンパク質発現系を構築し、ELISA法を樹立
 - ヒトや動物の血清調査
 - TamdyオルソナイロウイルスのNタンパク質との交差反応性試験
- ✓ RT-PCR法・RT-qPCR法を樹立
 - ヒトや動物、マダニの遺伝子調査
 - 汎ナイロウイルスRT-PCR法の検討

26

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。
- エゾウイルス感染症患者はマダニの活動が活発な季節・地域でこれからも発生するおそれがある。
- エゾウイルス遺伝子検出系および特異抗体検出系を樹立した。
- 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リサーチセンター
危機分析・対応室
松野啓太 matsuk@czc.hokudai.ac.jp

27

お伝えしたいこと

- MiSeqやMinION等の次世代シーケンサーの普及により、網羅的微生物・病原体探索が容易となった。
- 患者検体そのものからの網羅的病原体検出はまだまだ困難である。
- 網羅的な微生物検出データの解析と解釈には、病原微生物学の知識・経験が必要である。
- **分離培養ができ**、かつ網羅的病原体探索ができる人材・施設を増やす必要がある。

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リサーチセンター
危機分析・対応室
松野啓太 matsuk@czc.hokudai.ac.jp

28

謝辞（敬称略）

市立札幌病院

児玉文宏 枝川峻二 永坂 敦

北海道大学

澤 洋文

長崎大学

好井健太郎

札幌市保健所

山岸彩沙 古澤 弥 山口 亮 矢野公一

北海道立衛生研究所

山口宏樹 後藤明子 駒込理佳 三好正浩
伊東拓也

北海道保健福祉部

小山内佑太 角 千春

国立感染症研究所

安藤秀二 堀田明豊 前田 健 西條政幸

北海道大学

獣医学研究院

水間奎太

都築孝一

寺内悠理乃

中尾 亮

迫田義博

人獣共通感染症リサーチセンター

大場靖子

石塚万里子

重野麻子

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リサーチセンター
危機分析・対応室

松野啓太 matsuk@czc.hokudai.ac.jp