

1 新規ダニ媒介性病原体であるエゾウイルスにおけるゲノムおよび分子疫学的解析

○三津橋 和也（北海道立衛生研究所感染症部ウイルスグループ）

【研究目的】

エゾウイルス (YEZV) 感染症は、2021 年に新たに報告された疾病である¹⁾。陽性例は 2023 年までに 18 名確認され、いずれも北海道内でマダニを媒介とした感染が疑われている。しかしながら、これらの患者検体を用いたウイルスのゲノム比較解析は一部しか実施されていない。そこで本研究では、陽性例の検体に対して次世代シークエンサーなどを用いたゲノム解析を実施し、分子疫学的解析により YEZV ならびに YEZV 感染症に関する新たな知見を収集することを目的とした。

【研究の必要性】

YEZV 感染症は、北海道で発熱や筋肉痛などを主訴とした患者から発見されたウイルス感染症である。北海道立衛生研究所（当所）で保有していたヒト臨床検体について後方視的調査を実施した結果、先の報告¹⁾ 以前においても本症の陽性例を複数発見した²⁾。いずれの症例も道内でマダニによる刺咬後、発熱や倦怠感などの症状を呈していた。また、北海道で収集されたマダニから YEZV の遺伝子が検出され、野生動物から YEZV に対する抗体が検出されていることから、YEZV は北海道に定着し、マダニと野生動物との間に感染環が形成され、そのマダニにヒトが刺咬されることで感染者が発生していると想定された（図 1）。

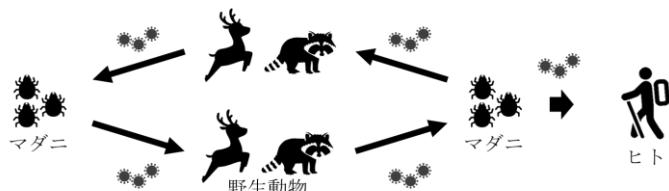


図 1. YEZV の感染環

このように、本症はダニ媒介感染症と考えられるが、当所ではダニ媒介脳炎や重症熱性血小板減少症候群などのダニ媒介感染症に対する行政検査に加え、YEZV 感染症の検査を調査研究として実施している。我々は調査を継続する中で、2023 年に 5 名の患者を発見した。

先の報告¹⁾ では、YEZV の全ゲノムが解析され、YEZV はブニヤウイルス綱ナairoウイルス科オルソナairoウイルス属に属すウイルスとして新たに登録された。一方で、今回対象とする症例ではいずれもウイルスゲノムの一部を検出したのみであり、その全ゲノムは未解析であった。そのため、それぞれのウイルスゲノムの相同性やその差異は不明であった。

そこで本研究では、陽性例の検体に対して次世代シークエンサーなどを活用した分子疫学的解析を行う。これにより、どのような遺伝的背景を持ったウイルスが原因となったのかを明らかにし、これらのウイルスに地域差が認められるのかなど、新たな知見を獲得する。本症は新たに発見された感染症であるがゆえに不明な点も多く、北海道における公衆衛生上の重要な課題である。したがって、YEZVにおける新たな知見の獲得は、本症の検査に携わる機関として必要な研究であると考えた。

【研究計画】

各陽性例の検体から抽出した RNA を用いてウイルスゲノム解析を実施する。なお、対象の検体は、後方視的調査で発見した 5 症例（2014-2021 年）および 2023 年の調査で発見した 5 症例の計 10 症例の検体である。ゲノム配列を決定した後、国際的に公開されているデータと併せて分子疫学的解析を実施し、これらの相同性や差異を確認する。

【実施内容・結果】

1. 調査対象

本調査の対象について、その詳細を表 1 に示した。

表 1. 調査対象の症例に関する詳細

No.	年	年代	性別	主訴と主な検査所見
1	2014	80	男性	発熱、倦怠感、血小板減少、白血球減少
2	2015	70	男性	発熱、頭痛、食欲不振、関節痛/筋肉痛、血小板減少、白血球減少、肝酵素上昇
3	2016	60	男性	頭痛、倦怠感、血小板減少、白血球減少、肝酵素上昇
4	2016	40	男性	発熱、倦怠感、血小板減少、白血球減少
5	2021	70	女性	発熱、頭痛、関節痛/筋肉痛、血小板減少、白血球減少、肝酵素上昇
6	2023	70	女性	発熱、倦怠感、血小板減少、白血球減少、肝酵素上昇
7	2023	40	男性	発熱、頭痛、倦怠感、食欲不振、関節痛/筋肉痛、白血球減少、肝酵素上昇
8	2023	30	男性	発熱、頭痛、倦怠感、関節痛/筋肉痛、血小板減少、白血球減少、肝酵素上昇
9	2023	60	男性	発熱、頭痛、倦怠感、関節痛/筋肉痛、血小板減少、白血球減少、肝酵素上昇
10	2023	30	男性	発熱、頭痛、血小板減少、白血球減少、肝酵素上昇

2. 調査方法

各症例の患者検体から RNA を抽出し、得られた RNA に対して RNA ライブライリーを調製した。本ライブルリーを用いてゲノム解析データを取得し、得られたデータから YEZV の 3 分節のゲノム配列を構築した。系統解析ではこれらのゲノム配列に加え、参照株として国際的なデータベース（GenBank）に登録されている YEZV のゲノムデータ（表 2）を含めて解析を行い、北海道に分布する YEZV の遺伝学的特徴を検討した。なお、本調査では患者検体を用いるにあたり、北海道立衛生研究所倫理審査委員会の承認（24-13）を得て実施した。

表 2. 系統解析に使用した参照株の詳細

株名	年	参照番号 (L)	参照番号 (M)	参照番号 (S)	国	由来	株名	年	参照番号 (L)	参照番号 (M)	参照番号 (S)	国	由来
HH007-2016	2016	0Q994737	0Q994738	LC628643	日本	ヒト	THQG1707B	2017	OR148883	OR148881	OR148882	中国	マダニ
HH008-2017	2017	0Q994739	0Q994740	LC628644	日本	ヒト	YBQG1712	2017	OR148886	OR148884	OR148885	中国	マダニ
HH009-2017	2017	0Q994741	0Q994742	LC628645	日本	ヒト	YBQG1739	2017	OR148889	OR148887	OR148888	中国	マダニ
HH001-2019	2019	LC621352	LC621353	LC621354	日本	ヒト	T-HLJ01	2021	ON563268	ON563269	ON563270	中国	マダニ
HH003-2020	2020	NC_079099	NC_079098	NC_079100	日本	ヒト	T-HLJ02	2021	ON563271	ON563272	ON563273	中国	マダニ
HH011-2020	2020	LC621358	LC621359	LC621360	日本	ヒト	T-HLJ03	2021	ON563274	ON563275	ON563276	中国	マダニ
BT-1821	2020	LC735725	LC735726	LC735727	日本	マダニ	T-IM01	2021	ON563277	ON563278	ON563279	中国	マダニ
BT-1826	2020	LC735728	LC735729	LC735730	日本	マダニ	T-JL01	2021	ON563280	ON563281	ON563282	中国	マダニ
BT-1844	2020	LC735731	LC735732	LC735733	日本	マダニ	NE-ALH2	2022	PQ475623	PQ475627	PQ475631	中国	マダニ
BT-1864	2020	LC735734	LC735735	LC735736	日本	マダニ	NE-YTLH1	2022	PQ475622	PQ475626	PQ475630	中国	マダニ
BT-1968	2020	LC790674	LC790675	LC790676	日本	マダニ	NE-WQ	2023	PQ475625	PQ475629	PQ475633	中国	マダニ
BT-2135	2021	LC790677	LC790678	LC790679	日本	マダニ	NE-DN2	2023	PQ475624	PQ475628	PQ475632	中国	マダニ
BT-2155	2021	LC790680	LC790681	LC790682	日本	マダニ	TIGMIC_1	2023	ON811839	PQ231073	PQ231068	中国	マダニ
H-IM01	2018	ON563283	ON563284	ON563285	中国	ヒト	TIGMIC_2	2023	ON811841	PQ231074	PQ231069	中国	マダニ
MDJ2209	2022	PQ220372	PQ220367	PQ220362	中国	ヒト	TIGMIC_3	2023	ON811933	PQ231075	PQ231070	中国	マダニ
MDJ003	2023	PQ220368	PQ220363	PQ220358	中国	ヒト	TIGMIC_4	2023	PQ231078	PQ231076	PQ231071	中国	マダニ
MDJ014	2023	PQ220369	PQ220364	PQ220359	中国	ヒト	TIGMIC_5	2023	PQ231079	PQ231077	PQ231072	中国	マダニ
MDJ025	2023	PQ220370	PQ220365	PQ220360	中国	ヒト	Heilongjiang	2024	PP708714	PP708715	PP708716	中国	マダニ
MDJ486	2023	PQ220371	PQ220366	PQ220361	中国	ヒト	Chita_2024-1	2024	PV061571	PV061576	PV061581	ロシア	マダニ
24_L_K43	2024	PV683040	PV683027	PV683026	中国	ヒト	Khabarovsk_2024-1	2024	PV061572	PV061577	PV061582	ロシア	マダニ
24_L_K71	2024	PV683021	PV683037	PV683020	中国	ヒト	Primorye_2024-1	2024	PV061568	PV061573	PV061578	ロシア	マダニ
24_L_3_R	2024	PV683017	PV683016	PV683015	中国	ヒト	Primorye_2024-2	2024	PV061569	PV061574	PV061579	ロシア	マダニ
							Primorye_2024-3	2024	PV061570	PV061575	PV061580	ロシア	マダニ

3. 調査結果

まず始めにウイルスゲノムの取得状況について、対象の 10 症例のうち、後方視的調査で発見した 5 症例（表 1、症例 No. 1～5）についてはウイルス遺伝子の検出による YEZV 感染症の診断は可能であったが、ゲノム解析・比較にまで到達できなかった。また、2023 年の調査で発見した 5 症例のうち、1 症例（表 1、症例 No. 8）についてもウイルス全ゲノムを取得できなかった。一方で、2023 年の調査で発見した 4 症例（表 1、症例 No. 6、7、9、10）についてはウイルスの全ゲノムが得られた。これ以降、ゲノムデータが得られた 4 症例について行った解析結果について述べる。

YEZV が属すオルソナイロウイルス属のウイルスゲノム構造は、3 分節 1 本鎖の RNA から構成され、ゲノム分節が長い順に L、M、S と呼ばれる。ゲノムサイズはそれぞれ約 12kb、4.2kb、1.7kb である。ゲノムデータが得られた 4 症例ならびに参照株について、分節ごとに系統解析した結果を図 2 にまとめた。黄色が北海道由来株、緑が中国由来株、青がロシア由来株である。ヒト由来株は太字 + 斜体、マダニ由来株は強調なしで示した。また、本調査の対象株を赤字で示した。今回解析できた 4 症例（図 2、赤字 + 黄色）は、いずれもこれまで北海道で確認されているヒト由来株（図 2、黒太字斜体 + 黄色）ならびにマダニ由来株（図 2、黒字 + 黄色）と近縁であった。なお、今回対象とした株を含め、北海道で確認された株は大きく 2 系統に分かれていた。これは 3 分節いずれにおいても同様に分かれしており、北海道の株のみが集積している系統（図 2、上側）および中国（図 2、緑色）やロシア（図 2、青色）で確認された株とともに集積している系統（図 2、下側）の 2 つであ

る。症例 No. 6、7、10 から分離された株は、北海道の株のみが集積している系統に属し、症例 No. 9 から分離された株は北海道をはじめ、一部の中国やロシアの株と同じ系統に属した。ヒト由来株あるいはマダニ由来株、すなわち宿主の違いによる系統上の明らかな差異は認められなかつたが、一部では宿主ごとに株が集積している様子が見受けられた。また、地域（北海道、中国、ロシア）による株のまとまりが一部認められた。一方で、確認された年による系統のまとまりは認められなかつた。

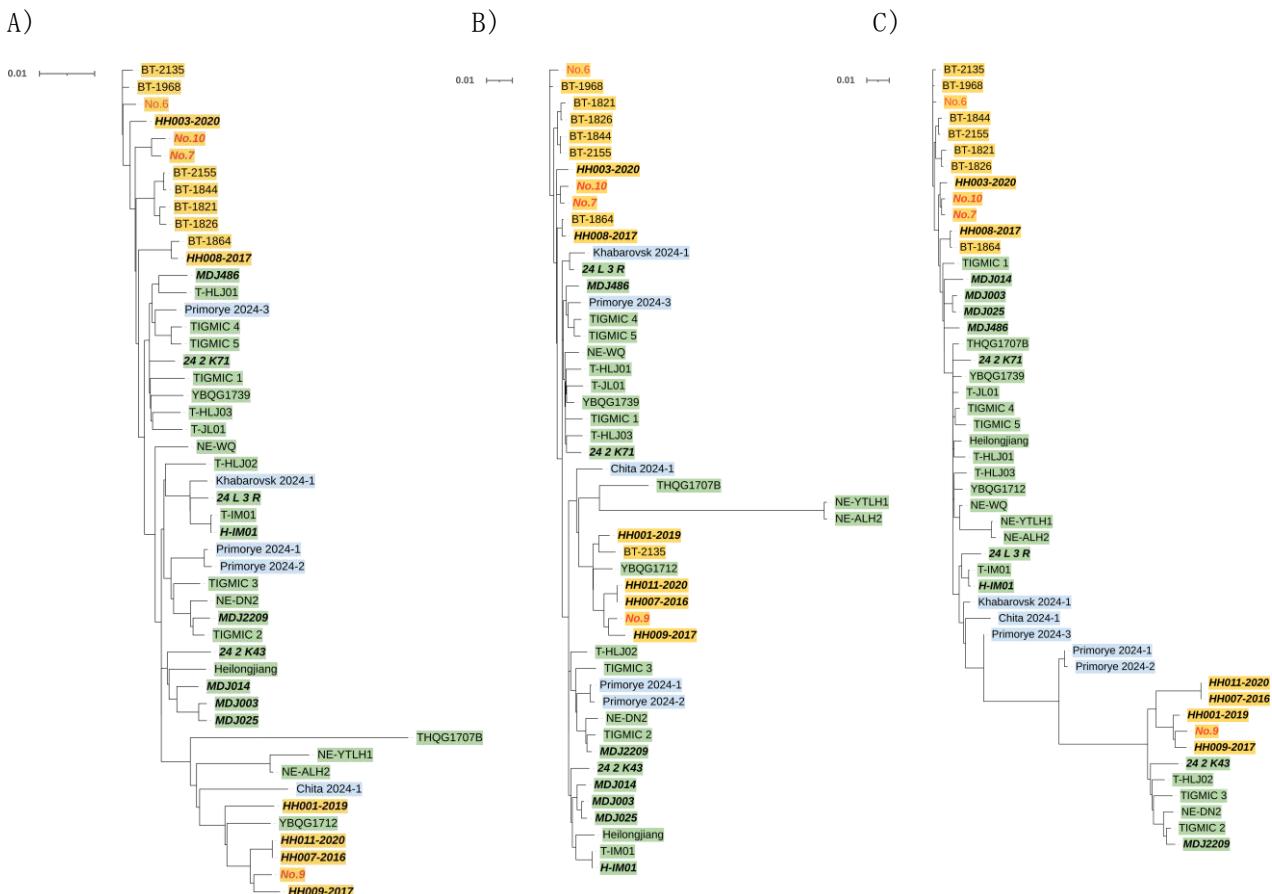


図 2. YEZV の各分節における系統解析結果 (A: L 分節、B: M 分節、C: S 分節)

【考察と今後の課題】

今回対象とした 10 症例のうち、半数以上の 6 症例分のウイルスゲノムが取得できなかつた。これは患者検体中のウイルスやウイルス RNA 量が少なく、ゲノム解析に至るまでのその必要量が不足していた、あるいはウイルスやウイルス RNA 自体の品質が低く、解析においてウイルスゲノムを增幅できなかつたためと考えられた。

その一方で、調査対象の残りの 4 症例については、ウイルスの全ゲノムデータが得られた。GenBank 上の YEZV ゲノムデータと併せて解析した結果、北海道で確認された株は大きく 2 系統に分かれることが明らかとなつた。これは、YEZV のゲノム 3 分節いずれにおいても同様に認められ、北海道の株のみが集積している系統および中国やロシアで確認されている株と近縁な系統の 2 種類である。ただし、いずれの系統もそれぞれの株が確認された

年や由来宿主などによる共通点は認められず、調査時点では北海道では少なくとも遺伝的に2系統のウイルスが存在していると推察された。なお、これらの系統の違いによって、ヒトに対する病原性などは現時点では不明であるが、北海道の株に限ってはその臨床情報から2つの系統による差は認められなかった。

今回の解析結果から、各地域（北海道、中国、ロシア）の株は地域ごとにある程度同一のグループに集積しているものの、一部では地域によらず集積していたことから、北海道、中国、ロシアそれぞれにおいて様々なウイルスが存在していると考えられた。さらに、北海道や中国ではヒト由来株とマダニ由来株が遺伝的に近縁な位置に存在しており、マダニおよびヒト患者では類似したYEZVが分離されたこと、すなわちYEZV感染症はダニ媒介感染症であることが、これまでの疫学データに加えてより確からしいと考えられた。

本研究の対象は2023年までに発見された症例であるが、2024年および2025年にもそれぞれYEZV感染症患者が確認されている。引き続き、本症の動向を把握するとともに、確認された患者検体やマダニなどの環境検体からさらなるデータを収集し、今回得られたデータへ追加することでYEZV感染症に関するさらなる知見を蓄積する必要があると考えられた。

【参考文献】

1. Kodama F, et al., Nat Commun. 2021;12:5539
2. 山口ら. 臨床とウイルス. 2024;52(1):3-10

【経費使途明細】

使 途	金 額
プライマー	128,887 円
ゲノム解析試薬	169,573 円
振込手数料 (770 円 × 2)	1,540 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円