

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ケ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）。

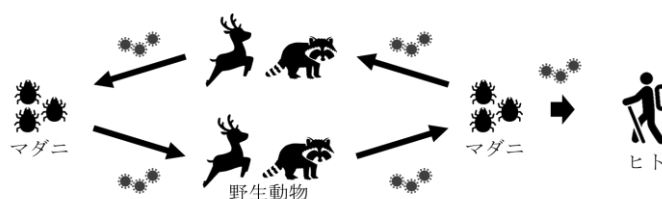


図 1. YEZV の感染環

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イロウイルス科オルソナイロ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ケ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 ライブラリーを調製した。本ライブラ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 | OQ994737 | OQ994738 | LC628643 | 日本 | ヒト | THQG1707B | 2017 | OR148883 | OR148881 | OR148882 | 中国 | マダニ |
| HH008-2017 | 2017 | OQ994739 | OQ994740 | LC628644 | 日本 | ヒト | YBQG1712 | 2017 | OR148886 | OR148884 | OR148885 | 中国 | マダニ |
| HH009-2017 | 2017 | OQ994741 | OQ994742 | 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_2_K43 | 2024 | PV683040 | PV683027 | PV683026 | 中国 | ヒト | Khabarovsk_2024-1 | 2024 | PV061572 | PV061577 | PV061582 | ロシア | マダニ |
| 24_2_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

【考察と今後の課題】

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った。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 |