

学 位 論 文 要 旨

氏名

西野 綾乃

題 目 : Integrative studies on emerging orthonairoviruses: viral dissemination via ticks on migratory birds, and pathogenicity in mouse models
(新興オルソナイロウイルスの統合研究：渡り鳥由来マダニを介したウイルスの伝播とマウスにおける病原性の評価)

論文要旨：

The emerging orthonairovirus Yezo virus (YEZV) has been reported in human patients in Hokkaido, Japan, and northeastern China, and is now recognized as a important emerging tick-borne infectious disease in East Asia. Because YEZV has been detected in ticks across Japan, China, and Russia, broad ecological connectivity is implicated in its maintenance and dispersal. In particular, elucidating the role of migratory birds in transporting YEZV-infected ticks is essential for predicting potential disease spread and assessing natural infection risks. In contrast, Iwanai Valley virus (IWVV) is a newly discovered orthonairovirus recently isolated from ticks collected from vegetation in Hokkaido. Although IWVV has not yet been detected in humans or animals, it belongs to the Tamdy genogroup, phylogenetically close to the Sulina genogroup that includes YEZV. This relationship underscores the need to evaluate its potential pathogenicity.

In this thesis, I investigated two aspects of orthonairovirus ecology and pathogenicity in Japan: (1) the potential transboundary movement of YEZV via ticks attached to migratory birds, and (2) the pathogenicity of IWVV in a mouse model.

In Chapter 1, we collected 2,534 ticks parasitizing 15 migratory bird species during the 2020 and 2021 autumn migration seasons at Lake Kutcharo, Hamatonbetsu Town, and Lake Furen, Nemuro City, in northern Hokkaido. Ticks were morphologically identified and tested for YEZV RNA using qRT-PCR. Positive pools underwent complete genome sequencing with phylogenetic and recombination analyses. Eight pools of *Ixodes persulcatus* (three larval, five nymphal pools) were YEZV-positive, all collected from black-faced buntings (*Emberiza spodocephala*). Seven low-Ct pools yielded complete genomes, which clustered with patient-derived strains from Hokkaido. Genome analysis suggested reassortment events involving a tick-derived strain from this study and a patient strain from Hokkaido. In addition, Japanese, Chinese, and Russian strains did not form geographically distinct clusters, but instead showed close genetic relatedness across regions.

In Chapter 2, we established a mouse infection model using type I interferon receptor knockout (IFNAR1^{-/-}) mice to evaluate the pathogenicity of IWVV. In IFNAR1^{-/-} mice, intraperitoneal inoculation resulted in pronounced body weight loss followed by fatal outcomes. In contrast, wild-type BALB/c mice exhibited neither clinical symptoms nor mortality throughout the observation period. In IWVV-infected

IFNAR1^{-/-} mice, high levels of viral RNA and infectious virus were detected, particularly in the liver, spleen, and serum. Histopathological analyses revealed acute necrotizing hepatitis characterized by hepatocellular necrosis and inflammatory cell infiltration. Immunohistochemistry demonstrated that viral antigens localized to HepPar1-positive hepatocytes. In the spleen, severe depletion of white pulp, reductions in CD45-positive B cells and CD3-positive T cells, and accumulation of Iba1-positive macrophages were observed, indicative of extensive lymphoid tissue destruction. Collectively, these pathological features closely resemble those reported in infection models of other pathogenic orthonairoviruses, such as CCHFV and YEZV. These findings suggest that IWVV may possess pathogenic potential in natural vertebrate hosts.

Taken together, these findings suggest that migratory birds may play an important role within the ecological network of YEZV, and that the pathogenicity analysis of IWVV contributes to understanding both conserved and virus-specific pathogenic characteristics among orthonairoviruses. To further clarify transmission dynamics, pathogenic mechanisms, and public health risks, long-term and wide-scale surveillance of ticks, birds, and wild mammals, as well as experimental studies using isolated virus strains, will be essential.

Although tick-borne viral diseases rarely cause large-scale outbreaks, orthonairovirus infections occur annually in East Asia, and some patients require hospitalization. Therefore, continuous public health surveillance and preventive measures are indispensable for reducing the burden and potential impact of these infections. This study provides fundamental knowledge on the transboundary transmission of orthonairoviruses mediated by migratory birds and ticks, and on their pathogenicity in mice, thereby contributing to improved prevention and risk assessment of tick-borne viral diseases in Japan and the broader East Asian region.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	西野 綾乃
審 査 委 員	主 査：山口大学 准教授 下田 宙
	副 査：山口大学 教授 早坂 大輔
	副 査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副 査：山口大学 教授 高野 愛
	副 査：山口大学 教授 大濱 剛
題 目	Integrative studies on emerging orthonairoviruses: viral dissemination via ticks on migratory birds, and pathogenicity in mouse models (新興オルソナイロウイルスの統合研究：渡り鳥由来マダニを介したウイルスの伝播とマウスにおける病原性の評価)
審査結果の要旨： 本研究では、日本におけるオルソナイロウイルスの生態および病原性について、以下の 2 点、(1) 移動性鳥類に寄生するマダニを介した Yezo ウイルス (YEZV) の越境移動の可能性、(2) マウスモデルを用いた Iwanai Valley ウイルス (IWVV) の病原性評価について検討した。 第 1 章では、2020 年および 2021 年の秋季渡り期に、北海道浜頓別町クッチャロ湖および根室市風蓮湖において、15 種の鳥類に寄生していた 2,534 匹のマダニを採集した。マダニは形態学的に同定し、qRT-PCR により YEZV RNA を検出した。陽性プールについては全ゲノム解析を行い、系統解析および組換え解析を実施した。その結果、Ixodes persulcatus の 8 プール（幼虫 3、若虫 5）から YEZV が検出され、いずれもアオジ (<i>Emberiza spodocephala</i>) から採集されたものであった。Ct 値の低い 7 プールから完全長ゲノムを取得し、これらは北海道の患者由来株と同一クラスターを形成した。ゲノム解析の結果、本研究で得られた異なる北海道患者由来株との間で遺伝子再集合 (reassortment) が起きた可能性が示唆された。さらに、中国黒龍江省のダニ由来株は、北海道患者由来株と中国内モンゴル自治区のダニ由来株との組換えによって生じた可能性が高いことが示された。 第 2 章では、I 型インターフェロン受容体欠損マウス (IFNAR1^{-/-}) を用いた感染モデルを構築し、IWVV の病原性を評価した。IFNAR1^{-/-} マウスでは、腹腔内接種後に著明な体重減少が認められ、その後致死的転帰をたどった。一方、野生型 BALB/c マウスでは、観察	

期間を通じて臨床症状は認められなかった。IWVV に感染した IFNAR1^{-/-} マウスでは、特に肝臓、脾臓、血清において高レベルのウイルス RNA および感染性ウイルスが検出された。病理組織学的解析では、肝細胞壊死と炎症細胞浸潤を特徴とする急性壊死性肝炎が認められた。免疫組織化学染色により、ウイルス抗原は HepPar1 陽性肝細胞に局在していることが示された。脾臓では、白脾髄の著明な消失、CD45 陽性 B 細胞および CD3 陽性 T 細胞の減少、ならびに Iba1 陽性マクロファージの集積が観察され、リンパ組織の広範な破壊が示唆された。これらの病理学的特徴は、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス や YEZV など他の病原性オルソナイロウイルスの感染モデルで報告されている所見と極めて類似していた。以上の結果から、IWVV は自然界の脊椎動物宿主において病原性を有する可能性が示唆された。

総合すると、本研究の結果は、移動性鳥類が YEZV の生態ネットワークにおいて重要な役割を果たしている可能性を示すとともに、IWVV の病原性解析がオルソナイロウイルスに共通する病原性機構およびウイルス特異的特徴の理解に寄与することを示している。今後、伝播動態、病原性機構、公衆衛生上のリスクをさらに明らかにするためには、さらなるダニ、鳥類、野生哺乳類を対象とした長期かつ広域的なサーベイランスに加え、分離ウイルス株を用いた実験的研究が不可欠である。

ダニ媒介性ウイルス感染症が大規模流行を引き起こすことは稀であるが、オルソナイロウイルス感染症は東アジアで毎年発生しており、一部の患者では入院治療を要する。したがって、これら感染症の負担および潜在的影響を低減するためには、継続的な公衆衛生サーベイランスと予防対策が不可欠である。本研究は、移動性鳥類およびダニによるオルソナイロウイルスの越境伝播と、そのマウスにおける病原性に関する基盤的知見を提供し、日本ならびに東アジア地域におけるダニ媒介性ウイルス感染症の予防およびリスク評価の向上に貢献するものである。

以上により、本論文は博士（獣医学）の論文として、妥当なものであると判断された。