

Abstract of Doctoral Thesis

Name Marla Anggita

Title: Development of RT-LAMP assay for SFTS and Susceptibility of Mammalian Cell Lines to SFTSV Infection

(SFTS の RT-LAMP 法開発と SFTS ウイルス感染における哺乳類細胞株の感受性)

Abstract of thesis:

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) is an emerging tick-borne viral disease caused by SFTS virus (SFTSV), a phlebovirus within the family Phenuiviridae, has become major public health concern across East Asia including Japan, South Korea, and Taiwan, showing mortality rates of up to 30%. SFTSV demonstrates broad host range including humans, domestic animals, livestock, and wildlife. The risk of infection is highest among elderly individuals, and people engaged in agricultural and animal handling, such as farmers or veterinarians. The virus primarily transmitted by the bite of tick *Haemaphysalis longicornis*, with the recent human-to-human transmission has been documented. Clinical manifestations in humans include high fever, thrombocytopenia, leukopenia, gastrointestinal symptoms, and multi-organ dysfunction. SFTS diagnosis relies on laboratory confirmation through various methods, including virus isolation, RNA detection, and antibody testing. In areas with limited laboratory facilities, rapid diagnostic methods are being developed to cover the diagnostic capacity. Currently, no vaccine available for SFTSV prevention and only favipiravir was approved as the antiviral treatment for SFTSV (Li et al. 2021; Saijo et al. 2025). This critical gap, combined with SFTSV expanding geographic range and high mortality rate, underscores the urgent need for rapid diagnostic tools and comprehensive understanding of viral cellular tropism. This study focuses on two objectives: first, to develop a simplified, easy to perform diagnostic tool suitable for resource-limited settings, and second, to systematically evaluate SFTSV infectivity across diverse mammalian cell lines including original cells from wildlife to identify optimal cell culture systems for virological research.

The first chapter was conducted to address the diagnostic gaps in SFTS-endemic regions lacking with diagnostic infrastructure. We developed a ready-to-use dried reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay to enable detection from clinical samples directly. This diagnostic tool employs a single-tube format that allows direct analysis of serum or plasma specimens without RNA extraction, simplifying the workflow compared to conventional molecular diagnostic methods. The assay could be performed in resource-limited areas in a short time, and the result could be easily observed under simple LED light illumination. Our validation study demonstrates successful detection of

natural SFTSV infection in feline and SFTSV experimental mice samples, confirming the applicability for veterinary and potentially human diagnostic applications. While the SFTSV RT-LAMP assay demonstrates lower sensitivity compared to conventional RT-PCR, it offers significant advantages in speed, cost-effectiveness, technical simplicity, and applicability for point-of-care testing (POCT). These characteristics make it well-suited as an accessible tool for early SFTSV detection and routine animal surveillance in remote, resource-limited areas.

The second chapter was evaluating the SFTSV infectivity across multiple mammalian cell lines representing diverse species origins, including the original cell lines from tiger, wild deer, and hedgehog alongside commercial cell lines from feline, porcine, primate, human, and hamster origin. The comprehensive analysis assessed cytopathic effect (CPE) formation and viral growth kinetics following SFTSV infection across this diverse cellular panel. The results reveal the heterogeneity in cellular responses, with the feline-derived cell lines and porcine cells exhibiting CPE, whereas the other cells demonstrated absent or minimal CPE despite viral infection. Quantitative analysis of viral titers revealed that feline and primate (Vero) derived cells support the replication of infective SFTSV compared to the other cells, while hedgehog cells exhibited restricted viral replication. Notably, original cell from tiger demonstrated exceptional utility for SFTSV quantification by clear plaque formation, a characteristic that absent in most conventional cell culture system for SFTSV due to limited CPE, establishing tiger cells as a valuable tool for plaque forming assays.

These studies aim to provide a diagnostic tool for early detection of SFTSV and systematic characterization of cellular infectivity pattern to SFTSV infection, thereby contributing to strengthened public health systems for preparedness and early response to this emerging threat and providing fundamental insights into SFTSV pathogenicity.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Marla Anggita
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 早坂 大輔
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査：山口大学 教授 高野 愛
	副 査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副 査：山口大学 准教授 下田 宙
題 目	Development of RT-LAMP assay for SFTS and Susceptibility of Mammalian Cell Lines to SFTSV Infection (SFTS の RT-LAMP 法開発と SFTS ウイルス感染における哺乳類細胞株の感受性)

審査結果の要旨：

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）は、マダニ媒介性の SFTS ウイルス（SFTSV）が原因となり、日本においてはこれまでに 1,100 人以上の発生が報告されている。SFTS は動物でも発症例が報告されており、特にネコでは感受性が高い。SFTSV はマダニ吸血により感染するが、感染動物から人への感染例も確認されており、獣医療関係者等への感染リスクが懸念となっている。そこで本研究では、臨床現場で迅速に SFTS 診断が可能となる RT-LAMP 法の確立を行った。また、SFTSV の各種動物細胞に対する感染性、増殖性の比較を行った。

第 1 章 臨床現場における SFTSV の診断に有用な RT-LAMP 法の確立

SFTS はネコやイヌでも発症例が確認されており、特にネコでは国内において 1,100 匹以上の報告があり、60%以上と高い致死率となる。また、感染動物から人への感染対策が急務の課題である。現状、動物の SFTS 診断は研究機関等で行っており、結果が出るまで数日を要するため、臨床現場における迅速診断法の確立が求められている。RT-LAMP 法は、一定温度で遺伝子検出が可能で、現場における迅速診断に適している。SFTSV を対象とした RT-LAMP 法の報告は複数あるが、RNA 抽出や測定機器を要するなど、現場での応用には適さない。そこで本研究では、動物検体から RNA 抽出なしに、肉眼もしくは簡易的な LED ライトで検出できる Dried RT-LAMP 法の確立を試みた。

はじめに、SFTSV L 遺伝子領域をターゲットとしたプライマーを含む試薬等を風乾させたチューブを作製し、SFTSV RNA を用いて検出感度を決定した。その結果、RNA 2×10^4 コピー数以上において陽性が確認された。また、99 °C で処理後のサンプルにおいても、RT

LAMP 反応に影響はなく陽性が確認された。

次に、SFTSV 感染 A129 マウスの血清を用いて、RT-LAMP 反応を行った結果、反応液中にウイルス RNA 2×10^4 コピー数以上が含まれるサンプルにおいて陽性が確認された。

次いで、SFTS 発症ネコの血清、血しょうを対象に、RT-LAMP 反応を行った結果、SFTS 陽性検体では RT-LAMP 反応が確認された。一方、悲感染ネコでは陰性だった。

これらの結果から、RNA 抽出、特別な機器を必要とせずに迅速、簡便に SFTSV を検出する Dried RT-LAMP 法を確立し、動物病院等の現場において一次的な診断が可能となる方法として有用であることが示された。

第 2 章 種々の哺乳動物由来培養細胞における SFTSV 感受性の検討

SFTSV は人の重篤な感染症であるが、伴侶動物や野生動物、家畜を対象とした血清疫学調査から、種々の動物での SFTSV 感染が確認されている。また、SFTSV の感染実験には、Vero 細胞等の哺乳動物由来細胞が用いられているが、その多くは CPE を起こさず、タイトレーションや中和反応には、主にフォーカスアッセイが用いられている。そこで本研究では、複数の動物種由来培養細胞を対象に、SFTSV の感染性、増殖性、CPE の有無等を比較した。また、プラーク法の確立を試みた。

各細胞に SFTSV を MOI 0.01 で感染させ、CPE の有無を観察するとともに、1 日毎に培養上清を回収し、ウイルスタイター及びウイルス RNA コピー数を測定した。その結果、トラ肝臓由来 TLT 細胞、ネコマクロファージ由来 FCWF-4 細胞、ネコ腎臓由来 CRFK 細胞、豚由来 CPK 細胞では、感染 3-5 日目に CPE が観察された一方、シカ腎臓由来 DFKT 細胞、シカ肝臓由来 DFLT 細胞、ハリネズミ卵巣由来 HHoVT 細胞、サル腎臓由来 Vero E6 細胞、ハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞、ヒト肺由来 A549 細胞では CPE がみられなかった。CPE を示す細胞のうち、TLT 細胞において SFTSV の高い増殖性がみられた。CPE を示さない細胞のうち、Vero E6 細胞での SFTSV の増殖性は高かった一方、HHoVT 細胞では感染性が著しく低かった。

次に、CPE を示した細胞を用いて、プラーク形成を検証した結果、TLT 細胞において明瞭なプラークが確認され、プラーク法によるタイトレーションが可能であった。一方、FCWF-4 細胞、CRFK 細胞では明瞭なプラークがみられなかった。

これらの結果から、培養細胞における SFTSV 感染に対する感受性は、動物種により異なることが示され、ウイルス感染性、増殖性、病原性の解析をする際の有用なツールとして、今後の SFTSV 研究に有用であると示された。

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。