(Appended form No. 3)

Abstract of Doctoral Thesis

Name:Samuel Nyampong

Title:Infectious stability against high temperatures and strain-dependent pathogenicity in a mouse model of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus
(重症熱性血小板減少症候群ウイルスの高温耐性とマウスモデルにおけるウイルス株による病原性の解析)

Abstract of thesis:

Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) is an emerging tick-borne zoonotic pathogen that poses a significant public and veterinary health threat in East Asia, including Japan. Since its discovery, SFTSV has been recognized as highly pathogenic, causing severe febrile illness characterized by thrombocytopenia, leukopenia, multi-organ dysfunction, and high case fatality rates in humans. Domestic cats are also highly susceptible, frequently developing severe or fatal disease, underscoring the virus's importance for One Health. The tick *Haemaphysalis longicornis* primarily transmits the virus. Despite increasing reports of human and animal infections, critical aspects such as environmental stability and the determinants of pathogenicity remain incompletely understood. In this study, we investigated these features using comparative virological analyses and experimental infection models.

In Chapter 1, to assess environmental stability, we compared SFTSV with Kabuto Mountain virus (KAMV, same class and order as SFTSV), Japanese encephalitis virus (JEV, a representative enveloped virus from a different family), and feline calicivirus (FCV, a non-enveloped virus). Viral infectivity was measured after incubation at various temperatures and after chemical or physical inactivation, using either focus-forming or plaque-forming assays. Among the tested viruses, SFTSV showed markedly greater stability at 4°C, 23°C, and 37°C. While KAMV, JEV, and FCV exhibited progressive loss of infectivity, SFTSV maintained infectious titers longer, indicating enhanced environmental persistence. SFTSV also demonstrated greater resistance to heat inactivation at 56°C and 94°C. These findings suggest that, despite being enveloped, SFTSV possesses substantial physical stability, which may increase transmission risk in contaminated environments, clinical specimens, and laboratory settings.

Conversely, SFTSV was effectively inactivated by common disinfectants and sterilization procedures. Ethanol, sodium hypochlorite, and ultraviolet irradiation each rapidly reduced viral infectivity, confirming that standard disinfection protocols remain effective when applied properly. These results provide practical guidance for infection prevention and biosafety, emphasizing the need for rigorous decontamination to reduce the risk of transmission from contaminated biological materials in veterinary clinics, hospitals, and research laboratories.

In parallel, in Chapter 2, we investigated viral determinants of pathogenicity using A129 mice

(About 800 words in English)

(Appended form No. 3)

deficient in the type I interferon receptor, a well-established model of severe SFTSV infection. Previously, two amino acid residues in the Gc glycoprotein (Gly581 and Ser934) were identified as critical determinants of fatality. To extend these findings, we experimentally evaluated multiple SFTSV strains, including newly isolated feline strains, in this mouse model. Infection outcomes varied considerably, with mortality rates ranging from 20% to 100%. Notably, all strains, including those with lower fatality, carried the previously identified virulence-associated residues (Gly581 and Ser934) in Gc, suggesting that additional viral genetic factors modulate pathogenicity.

Detailed sequence comparisons revealed unique amino acid substitutions in strains with attenuated pathogenicity. The Sh-F149 strain (40% mortality) possessed a unique Ile745 residue in Gc. The Yg-F197 strain (40% mortality) carried several distinct substitutions: Thr172 in NSs, Gly20 and Arg113 in Gn, and Arg307, Val371, Pro374, and Asn1610 in the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). These differences may contribute to virulence attenuation in A129 mice, potentially by affecting viral replication efficiency, immune evasion, host cell interactions, or protein function. Although the precise mechanisms remain unclear, these findings indicate that SFTSV pathogenicity is multifactorial, influenced by a broader set of genetic determinants beyond the previously identified Gc residues.

To determine whether pathogenicity correlated with in vitro replication capacity, we assessed the growth kinetics of some selected strains in Vero E6 and TLT cell lines. No significant differences were observed among strains, with mortality rates ranging from 20% to 100%. Phylogenetic analysis showed that all examined strains belonged to genotype J1, except the Ng-F125 strain, whose L segment belonged to genotype J3. This indicated that Ng-F125 was a reassortant virus. Together, these results indicate that neither in vitro replication efficiency nor viral genotype alone directly predicts pathogenicity in A129 mice. Instead, subtle amino acid variations likely play critical roles in shaping in vivo virulence.

In summary, this research provides detailed insights into SFTSV's environmental stability and factors influencing its pathogenicity. The virus's notable stability across a range of temperatures and its resistance to heat inactivation highlight the importance of strict biosafety protocols when working with potentially contaminated samples. Additionally, identifying new amino acid substitutions that may be associated with reduced virulence enhances our understanding of the molecular basis of SFTSV's pathogenicity. These results aid in refining risk assessments, improving infection control protocols, and guiding future studies on viral virulence mechanisms, ultimately aiding in the better management and prevention of SFTSV infections in both humans and animals.

(About 800 words in English)

（別紙様式第 10 号）

学位論文審査の結果の要旨

氏　　名	Samuel Nyampong
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　准教授　松本　祐介
	副　査：山口大学　准教授　下田　宙
題　　目	Infectious stability against high temperatures and strain-dependent pathogenicity in a mouse model of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus （重症熱性血小板減少症候群ウイルスの高温耐性とマウスモデルにおけるウイルス株による病原性の解析）

審査結果の要旨：

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）は、中国で初めて確認された新興感染症で、マダニ媒介性の SFTS ウイルス（SFTSV）が原因となる。SFTSV は、フェニュイウイルス科バンダウイルス属に分類され、エンベロープを有し、S（アンビセンス鎖）、M（マイナス鎖）、L セグメント（マイナス鎖）の 3 分節で構成される RNA を遺伝子に持つ。

SFTS はアジアの複数の国で発生報告があり、日本では西日本を中心に関東、北海道でも患者が確認されている。ヒト以外にもネコ、イヌ等の伴侶動物の発症例が報告されており、SFTS 患者・患畜は、主に発熱、消化器症状、白血球減少、血小板減少を呈し、致死率はヒトで約 30%、ネコで約 60%と高い。ヒトや動物は SFTSV を保有するマダニにより感染するが、ヒトーヒト感染、動物からヒトへの感染も確認されており、SFTS は高い病原性を示す人獣共通感染症として、感染リスク対策が重要となる。

本研究では、臨床サンプルの感染リスク対策のひとつとして、SFTSV の温度感受性及び不活化効果を調べるとともに、SFTSV の高い病原性に関連すると思われるウイルス側の要因について、感染マウスモデル及びアミノ酸配列の比較により予測した。

第 1 章　異なる温度条件下における感染性 SFTSV の安定性に関する検証

SFTSV は主にマダニの吸血により感染するが、SFTSV 感染患者、感染動物からヒトへの感染例も報告されている。そのため、臨床現場において SFTSV を含む血液、体液等の臨床検体からの感染リスクが問題となり、個人防護具の着用や、消毒・滅菌の徹底が、感染予防上重要となる。そこで、SFTSV で汚染された臨床検体の感染リスクを考える上で、シーズン

2, 000 字以内

を通した温度条件下での感染性 SFTSV の安定性、及び高温に対する不活化効果に関する情報は有益となる。本研究では、異なる温度条件化における感染性 SFTSV の経時、経日的変化を調べるとともに、消毒薬及び紫外線照射による不活化効果を検証した。

はじめに、SFTSV とともに、カブトマウンテンウイルス（KAMV）（フェニュイウイルス科）、日本脳炎ウイルス（JEV）（フラビウイルス科、エンベロープあり、RNA ウイルス）、ネコカリシウイルス（FCV）（カリシウイルス科、エンベロープなし、RNA ウイルス）を比較対象として、5×10^5 ffu/mL（SFTSV）または pfu/mL（KAMV、JEV、FCV）に希釈したウイルス液を、4°C、23°C、37°C 下に置き 1−7 日後のウイルス力価、56°C、94°C 下に置き 1 分、10 分、30 分、60 分間後のウイルス力価をそれぞれ測定した。その結果、7 日後において、SFTSV は 37°C で $10^{2.71}$ ffu /mL 、23°C で $10^{1.73}$ ffu /mL の減少にとどまった一方、KAMV、FCV では 37°C、23°C のいずれの温度でも、JEV では 37°C で検出限界以下となり、SFTSV は対象ウイルスに比べて、シーズンを通した室温を想定した温度下における感染性 SFTSV の高い安定性を示した。また、94°C では KAMV、JEV、FCV いずれも 1 分間以内に検出限界以下となった一方、SFTSV は 1 分後では $10^{1.94}$ ffu /mL、10 分後で検出限界以下、56°C では KAMV、JEV、FCV いずれも 30 分後までに検出限界以下となった一方、SFTSV は 60 分後でも $10^{2.32}$ ffu /mL の減少にとどまり、高温、特に一般的な血清の非動化条件（56°C 、30 分間）に対する感染性 SFTSV の安定性が示された。また、SFTSV を含む血液サンプルを用いた検証でも同様の結果が示された。

次いで、SFTSV に対する 70%エタノール、100ppm 次亜塩素酸（ウイルス液を 9:1 で混合）、254nm、265nm、275nm の紫外線照射による不活化効果を検証した。その結果、エタノール、次亜塩素酸は 1 分間以内に検出限界以下、紫外線 254nm では 2.99 mJ/cm^2、265nm では 3.57 mJ/cm^2、275nm では 5.44 mJ/cm^2 により 10^2 ffu /mL のウイルス力価減少が確認された。したがって、エタノールや次亜塩素酸の消毒薬、紫外線照射による SFTSV の高い不活化効果が確認された。

以上の結果より、室温、高温条件下における感染性 SFTSV の安定性が示された。一方、一般的な消毒薬、紫外線照射により、SFTSV の感染リスクを減少させる有用性が確認された。

第 2 章　I 型インターフェロンノックアウト A129 マウスにおける病原性に関わる SFTSV アミノ酸配列の検証

SFTSV 感染における病態発現機序には宿主側とウイルス側の要因が関わる。しかしながら、ヒトやネコに対する SFTSV の高い病原性については不明な点が多い。そこで本研究では、複数のネコ由来 SFTSV 株を対象に、I 型インターフェロンノックアウト（A129）マウスに対する病原性と各ウイルス株の遺伝子配列を基に、SFTSV の病原性に関するアミノ酸の予測を行った。また、各ウイルス株の培養細胞における増殖性、分離 SFTSV 株の分子系統解析を行った。

はじめに、国内の SFTSV 感染が確認されたネコの血清または血しょうから、Vero E6 細胞を用いてウイルス分離を行い 14 株の SFTSV を得た。これらのウイルス株を 10^4 ffu/マウスで A129 マウスに皮下感染させ、経日的に病態を観察した結果、各ウイルス株は 20-100%の致死性を示し A129 マウスに対して異なる病原性を示すことがわかった。また、20%、40%、60%、80%、100%の致死率を示すウイルスを 1 株ずつ 5 株選定し、感染 3 日後の A129 マウス臓器（肝臓、腎臓、脳）におけるウイルス遺伝子コピー数を比較した。その結果、統計的な

（別紙様式第 10 号）

有意差はでなかったが、致死率に相関したウイルス遺伝子コピー数の傾向がみられた。

次いで、14 株の SFTSV の遺伝子配列を決定し、各ウイルス株のアミノ酸配列を比較したところ、各株間でバリエーションが確認された。そこで、特に A129 マウスでの致死性に差がみられるが遺伝子配列が近い SFTSV 株の 2 ペアに着目し、Ng-F95（致死率 100%）と Yg-F197（同 40%）、Fk-F258（同 100%）と Sh-F149（同 40%）のアミノ酸配列を比較した。その結果、Ng-F95 と Yg-F197 では NSs 領域に 1 か所、Gn 領域に 2 か所、RdRp 領域に 4 か所のアミノ酸の違いがみられ、これらのアミノ酸の違いのいずれかが A129 マウスでの病原性に関与することが示唆された。また、興味深いことに、Fk-F258 と Sh-F149 では、Gc 領域の 1 か所にのみアミノ酸の違いがみられ、この違いが A129 マウスでの病原性に関与することが示唆された。

また、A129 マウスでの致死率が 20%、40%、60%、80%、100%を示す 5 株について、アフリカミドリザル由来の Vero E6 細胞、トラ由来の TLT 細胞における増殖性を比較したところ、培養上清中のウイルス量に差がなかった。

さらに、本研究で分離した SFTSV14 株について分子系統解析を行ったところ、13 株については S、M、L セグメントのいずれも国内で主流となる J1 タイプであったが、長崎県のネコ由来の Ng-F125 株は S、M セグメントが J1 タイプ、L セグメントが J3 タイプを示すリアソータントウイルスであることがわかった。

以上の研究により、常温及び高温条件下における感染性 SFTSV の安定性が示されるとともに、SFTSV の病原性に関わると予想されるアミノ酸が示され、SFTSV 感染に対する予防、病原性解析に有用な情報が得られた。

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