

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06395

研究課題名(和文) 愛玩動物用SFTSワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of SFTS vaccine for animals

研究代表者

森川 茂 (MORIKAWA, SHIGERU)

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：00167686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ネコの重症熱性血小板減少症候群(SFTS)感受性を実験感染により照明した。ワンヘルスの観点からネコのSFTSワクチン開発を行った結果、不活化ワクチンウイルス様粒子(VLP)ワクチンは致死感染防御効果は認められたが、発症防御効果が不十分であった。一方、DNAワクチンは発症防御効果、致死感染防御効果とも十分であったが4回の免疫が必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SFTSは、西日本を中心に人の患者が600名以上報告され、致死率が20%程度と非常に高いウイルス感染症である。さいきん、ネコがSFTSに最も感受性が高く60%程度の致死率であることが分かった。発症動物からの直接感染事例が獣医師、獣医看護師、飼育者で相次いで報告されている。そこでワンヘルスの観点からネコのSFTSワクチンの開発を行った。試作ワクチンの中ではDNAワクチンが最も有効であったが4回の接種が必要であり、改良あるいはmRNAワクチンの開発派が必要と考えられた。SFTSワクチンが出来ると流行地でのネコの発症予防とともに動物から人への直接感染を防御することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：The susceptibility of cats to SFTS was demonstrated by experimental infection of SFTS virus. A one-health perspective, a feline SFTS vaccine was developed. Among vaccine candidates, an inactivated vaccine and a recombinant virus-like particle (VLP) vaccine was found to be effective in protecting against fatal infection, but was insufficient in protecting against the onset of disease. On the other hand, a DNA vaccine was effective in preventing both onset and fatal infection, but required four immunizations.

研究分野：人獣共通感染症

キーワード：SFTS 重症熱性血小板減少症候群 ネコ ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome; SFTS) は、フェニウウイルス科バンダウイルス属に分類される SFTS ウイルス (SFTSV) による急性ウイルス感染症で、高熱、血小板減少、白血球減少、肝機能低下、出血、多臓器不全などを主徴とする。国内の SFTS 患者数は 600 名以上で致死率が約 20% と非常に高く、特に高齢者で致死率が高い。SFTSV は動物とマダニ間で病原巢を形成しており、ヒトはマダニから主に感染する。これまで動物は不顕性感染すると考えられてきたが、本研究開始前年に、ネコが SFTSV に感染するとヒト以上に重症化することが明らかになった。研究開始前の調査では SFTS 発症ネコが 50 症例以上確定診断され、致死率は 50% と極めて高く年齢に関わらず発症することが明らかになった。有効な特異的治療法もなく、獣医医療従事者や飼育者が発症動物から感染して発症した例も報告されている。研究開始後には、発症動物から獣医医療関係者、飼育者が直接感染する事例が相次いで報告されている。動物も人もワクチンも治療薬はなく、その開発が急務である。

## 2. 研究の目的

本研究は、愛玩動物の SFTS 発症予防だけでなく特にハイリスクな獣医師や飼育者への SFTSV 感染リスク低減という One Health の観点からも、愛玩動物 (特にネコ) に対する有効なワクチン開発を目的とする。比較的近縁なリフトバレー熱ウイルス (RVFV) では、不活化、弱毒生、サブユニット、VLP、DNA ワクチンなどが開発され検討され、不活化と生ワクチンが流行国で使用されている。本研究では、VLP ワクチン候補を作出する。VLP ワクチンを選択するのは、1) 3 種病原体等に指定されている SFTSV を大規模に培養することは実用上困難、2) 弱毒ワクチンの開発には実用化まで非常に長い年月がかかる、3) VLP は dendritic 細胞等の抗原提示細胞に取り込まれ MHC class I 及び class II 応答を刺激する、4) VLP では安全にワクチン製造が行える、5) VLP には NSs や L 蛋白質がないため、これらへの免疫応答からワクチン接種動物と感染動物の鑑別として "differentiate infected from vaccinated animals (DIVA)" が可能であることなどの理由による。また、VLP ワクチンの有効性が十分でない場合には DNA ワクチンも開発し検討する。

## 3. 研究の方法

1. ワクチンに用いる SFTS-VLP は、以下の 4 通りの系で作成する。何れも SFTSV GPC/NP を発現する。

1) 組み換えバキュロウイルスによる VLP 産生: ダブルプロモーター系のベクターを用いて SFTSV GPC と NP を発現する組換えバキュロウイルスを作製する。

2) 哺乳類細胞での一過性大量発現系での VLP 産生: 通常の pCAGGS 系で一過性に発現する系を検討し、更に高発現系が必要であれば ExpiCHO Expression System などを用いて検討する。

3) VLP 高度産生細胞株の樹立: pCAGGS 系や pKS 系 (EF-BOS promoter) による VLP 産生細胞株を樹立する。これらの系での発現量が不十分な場合には、TARGATT CHO 細胞株、TG-Sure Expression (IR/MAR)、Mammalian PowerExpress System 等の高発現系も検討する。

4) 組換えワクチニアウイルスによる VLP の産生: LC16mO 株を用いた SFTSV GPC/NP を発現する組み換えワクチニアウイルスを RK13 細胞に感染させて培養上清から VLP を精製する。微量に混在する組み換えワクチニアウイルスを UV 照射により不活化してワクチン候補とする。

これらの中で収量の多いものを VLP ワクチン候補とする。VLP をアルミアジュバンドと混合して筋肉内接種で免疫する。

2. 対照として SFTSV を Vero 細胞で培養して精製ウイルスを調整し、UV で不活化して不活化ワクチンとして用いる。

3. DNA ワクチン: VLP ワクチンの有効性が不十分であった場合に、DNA ワクチンを検討する。pcDNA3.1 ベースのプラスミドの CMV promoter 下流に SFTSV GPC cDNA を cloning 下 GPC 発現ベクターを作製する。

4. ワクチンの有効性試験: VLP、不活化ワクチンはアルミアジュバンドと混合してネコに筋肉内接種で免疫し、抗体応答を測定する。DNA ワクチンは GPC 発現ベクターをリポソームと混合して、圧縮空気圧による注入法で皮下免疫する。免疫したネコに抗体応答が見られたら、致死量の SFTSV で攻撃して感染防御、発症防御効果を確認する。また、免疫応答、ウイルス増殖、病理組織学的解析も行う。

## 4. 研究成果

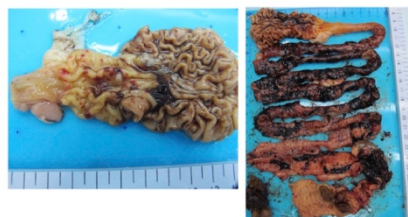
SFTS は動物由来マダニ媒介性急性ウイルス感染症であるが、ヒト以外の動物は不顕性感染すると考えられていたが、疫学的にネコからの直接感染が疑われる事例があったことから (Viruses,

2021 Jan 29;13(2):204)、動物の調査を行ったところ、ネコは感染するとほぼ発症し60%が死亡する事が明らかとなった (PLos One 2021, 16(1):e0238671)。ネコに SFTS ウイルスを実験的に感染すると、リンパ組織中の形質芽細胞が主要な標的細胞で(表1)、特に消化管症状が激しく、胃から直腸に至る全域で潰瘍性出血を呈し(図1)、自然感染ネコと同様60%の致死率であった。

表1. SFTS感染ネコの標的細胞

|            |                               |         |
|------------|-------------------------------|---------|
| CD3 (DAKO) | T cells                       |         |
| CD20       | B cells (not on plasma cells) | SFTS Ag |
| IBA1       | Macrophage                    |         |
| MUM1       | 胚中心細胞から形質芽細胞の段階               | SFTS Ag |
| PAX5       | 形質細胞は陰性                       |         |

図1. SFTSウイルス実験感染ネコの消化器症状



ネコのSFTSでは、胃潰瘍、消化管全般にわたる出血等の消化器症状が強く出る。体液、唾液、尿へもウイルス排泄される。

実験感染ネコの病理組織像はヒトの死亡症例と類

似し各種検査所見も良く一致するが(表2.)、ネコではより消化器症状が激しかった。また、血液、糞便、尿及び眼瞼ぬぐい等に大量のウイルスが排泄され、ヒトへの感染源となるリスクが確認された (Sci Rep. 2019, 9(1):11990)。

表2. SFTS患者と発症動物の検査所見

| Laboratory findings     | human | cats | cheetahs |
|-------------------------|-------|------|----------|
| Platelet dec. 血小板↓      | 95%   | 100% | 100%     |
| WBC dec. 白血球↓           | 86%   | 100% | 100%     |
| Neutrophil dec. 好中球↓    | 100%  | 67%  | 100%     |
| Lymphocyte dec. リンパ球    | 83%   | 100% | ND       |
| ALT increased           | 83%   | 100% | 100%     |
| AST increased           | 94%   | 100% | 100%     |
| A/G decreased           | 83%   | ND   | ND       |
| LDH increases           | 96%   | ND   | 100%     |
| Creatine kinase MB inc. | 60%   | 100% | 100%     |
| Protein urea 蛋白尿        | 84%   | ND   | ND       |
| Hematuria 血尿            | 59%   | ND   | ND       |

Human: Yu et al., N Engl J Med, 2011

(5 cases) (2 cases)

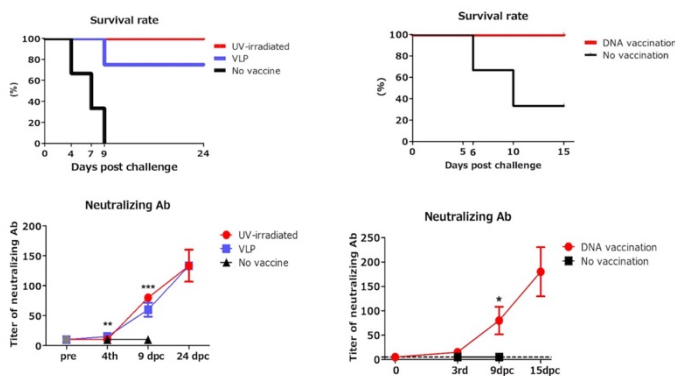
そこで、ネコの実験感染系を用いて、VLP ワクチンと不活化ワクチンの効果を検討した。まず、不活化 SFTS ウイルス、SFTS ウイルスのエンベロップ (GPC) 蛋白質とコア (N) 蛋白質からなる VLP をウイルスの100%不活化に要する UV 照射の10倍量の照射を2回行い、不活化を確認した。VLP も同様の処理を行い、両者を電子顕微鏡で観察すると、いずれも粒子構造が確認できた(図2)。また、SDS-PAGE 及び WB で精製 VLP の蛋白質を解析すると、SFTSV の NP と Gc が確認された。い

ずれも4回接種で抗体誘導が確認された。そこで致死量の SFTSV で攻撃すると、不活化ワクチン、VLP ワクチンとも致死感染に対して優れた防御効果が認められ、不活化ワクチンでは100%、VLP ワクチンでは80%が耐過した。Mock ワクチン接種ネコは100%死亡した。しかし、4回免疫後の中和抗体価は20倍と低く、SFTSV で攻撃後に100倍ほどに上昇したこと(図3左)、ウイルス血症も起きたことから、ウイルス感染は防御できないことがわかった。また、臨床症状も出現したことから発症防御効果は不十分で、ワクチン効果は十分ではないと判断された。

そこで、DNA ワクチンの効果を解析した。DNA を3回免疫すると中和抗体が検出されたため、追加で1回免疫した後に SFTSV で攻撃した。その結果、Mock ワクチン接種ネコは67%死亡したのに対し、DNA ワクチン接種ネコは100%耐過した(図3右)。さらに、臨床症状が認められなかったことから、不活化ワクチンや VLP ワクチンよりもワクチン効果が高かった。中和抗体は攻撃後に160倍まで上昇したことから感染防御効果はなかったが(図3右)、ウイルス血症レベルは低かった。

マウスへの免疫でも中和抗体誘導能は低かった。一方、抗体応答がよいウサギに DNA ワクチンを免疫すると3回接種で3000倍ほどの非常に高い中和抗体誘導が認められた。ウサギは体細胞性遺伝子変換 somatic gene conversion がより頻繁に起こること、相補性決定領域 CDR3 配列がより長くよりへ heterogeneous であり、抗体の特異性決定に大きな役割を担う CDR L 鎖が多様であることによると考えられた。以上の成績から DNA ワクチンは有効ではあるが、免疫回数が4回必要であることからワクチンと

図3. 不活化、VLP、DNAワクチンのネコSFTSモデルでの効果と中和抗体誘導



\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

しての実用化には問題がある。今後は、COVID-19 のワクチン開発で有用性が明らかになった修飾グリシンを導入した mRNA を脂質微粒子化するワクチン開発を検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Park Eun-sil, Fujita Osamu, Kimura Masanobu, Hotta Akitoyo, Imaoka Koichi, Shimojima Masayuki, Saijo Masayuki, Maeda Ken, Morikawa Shigeru | 4. 巻<br>16             |
| 2. 論文標題<br>Diagnostic system for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus RNA from suspected infected animals              | 5. 発行年<br>2021年        |
| 3. 雑誌名<br>PLOS ONE   | 6. 最初と最後の頁<br>e0238671 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.pone.0238671  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-              |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>11.Park ES, Shimojima M, Nagata N, Ami Y, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Watanabe S, Kurosu T, Kataoka M, Okutani A, Kimura M, Imaoka K, Hanaki K, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda K, Morikawa S. | 4. 巻<br>9           |
| 2. 論文標題<br>Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus causes lethal viral hemorrhagic fever in cats.  | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Sci Rep.   | 6. 最初と最後の頁<br>11990 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-019-48317-8  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Eunsil Park, 下島昌幸、吉河智城、永田典代、岩田奈織子3、鈴木忠樹、渡辺俊平、黒須剛、網康至、和田雄治、野口章1、西條政幸、前田健、森川茂 |
| 2. 発表標題<br>ネコのSFTSVワクチンの開発   |
| 3. 学会等名<br>第162回日本獣医学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>朴ウンシル、下島昌幸、吉河智城、永田典代、岩田奈織子3、鈴木忠樹、渡辺俊平、黒須剛、網康至、和田雄治、野口章1、西條政幸、前田健、森川茂 |
| 2. 発表標題<br>ネコのSFTSVワクチンの開発  |
| 3. 学会等名<br>第67回日本ウイルス学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                       | 備考 |
|---------------|--|---|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 朴 ウンシル<br><br>(Park Eun-sil)<br><br>(90750117) | 国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官<br><br><br><br>(82603) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|