

## 研究課題名 JEV-SRIPs を用いた抗体価測定方法の開発に関する研究

### 1 研究の概要

日本脳炎ウイルス (JEV) は、JEV に感染したブタ等を刺咬・吸血したコガタアカイエカによって媒介され、割合は少ないもののヒトに急性脳炎を引き起こす。ひとたび発症すると多くの症例は予後不良で死亡率は 20~40%とされており、生存しても神経学的後遺症を遺す割合が高い。日本ではワクチンの定期接種化に伴って、感染者は 1966 年の 2,017 人をピークに減少し、現在は年間数例のみ報告されている。しかし、厚生労働省の令和 2 年度感染症流行予測調査事業によると、調査した半数以上の都道府県において、感染源であるブタが JEV 抗体を保有していることが確認されている。また、同事業では感染源調査に合わせて感受性調査として、年代別のヒトの JEV 抗体保有率の調査も行っており、それによると 40 歳代以上になると抗体保有率が徐々に低下していくことも報告されている。ゆえに日本脳炎の現在の発生数は少ないものの、流行に備え定期的にブタとヒトの抗体保有状況を監視していくことが重要である。

前述した感染症流行予測調査事業は、毎年、各地方衛生研究所の協力のもと行われており、富山県衛生研究所でも毎年、感受性調査として 200 人以上のヒトの JEV に対する中和抗体保有状況を調べている。この調査は、生の JEV の感染中和を指標に評価しているが、200 を超える数の血清検体に対して、96 ウェルプレートを用いてウイルスのフォーカスを形成させ、抗体染色法によりその数をカウントしている (フォーカス法) ため、多大な手間と時間を要している。また、目視でカウントすることに加え染色ムラができることもあるため、カウントには個人差が生じる。そのため、この測定系を代替できるような簡便且つ再現性の高い新たな評価方法を構築することが必要である。

そこで本研究では、JEV の人工擬似ウイルスを用いた中和抗体の新たな測定系を検討する。フラビウイルス属ウイルスの人工擬似ウイルスについては、これまでにリバースジェネティクスによりエンベロープ遺伝子を欠損させて増殖できなくした一回感染性粒子 (SRIPs) と水疱性口内炎ウイルスを基盤としたシュードタイプウイルスの作製が試みられている。これらのウイルスには、リポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子が自身のゲノムに挿入されているため、ルシフェラーゼの活性を感染の指標にすることで、簡便且つ低コストで大規模に評価を実施することが可能となる。本研究での試みとして、両方の人工擬似ウイルスを用いて、どちらが感染症流行予測調査事業での評価系として、各地方衛生研究所で普及できるのに適しているか、比較検討してみる。

### 2 研究の方法

#### 2-1 研究対象

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律に従い厚生労働省感染症発生

動向調査事業において地方衛生研究所へ搬入された検体を保管し、試料とする。

## 2-2 実施方法

### 2-2-1 JEV-SRIPs の作製

Capsid 領域、pre-membrance-envelope 領域の欠如したレプリコンプラスミドと、欠如した領域を含むプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし JEV-SRIPs を作製する。作製した JEV-SRIPs を vero osaka 細胞に接種し、感染の成立の有無をルシフェラーゼ活性で測定する。

### 2-2-2 シュードタイプウイルスの作製

JEV のスパイクタンパク質を外套したシュードタイプ水疱性口内炎ウイルス (JEV-pv) を作製する。作製したシュードタイプウイルスを vero osaka 細胞に接種し、感染の成立の有無をルシフェラーゼ活性で測定する。

### 2-2-3 感染症流行予測調査で用いた検体を使った抗体価測定

過去に行った流行予測調査の血清で人工疑似ウイルスを用いた中和試験を行い、抗体価を算出する。その後、フォーカス法の抗体価と比較し相関が取れていることを確認する。

## 2-3 研究期間

2023 年許可日～2026 年 3 月末日

## 3 研究の実施体制

責任者：矢澤俊輔

研究協力者：福山圭、川上利恵、畷田嵩久、佐賀由美子、板持雅恵、谷英樹（富山県衛生研究所ウイルス部）

## 4 倫理的配慮

### 4-1 個人情報等の取扱い

「富山県衛生研究所の保有する個人情報等の安全管理に関する規程」（平成 28 年 7 月 27 日作成、令和 4 年 4 月 1 日改定）に従う。検体は、当所において個人を特定できない番号を付与する。検体の採取日、年齢、性別、ワクチン接種歴を連結し、その他の個人情報（氏名、生年月日、住所等）は削除し、匿名化する。

### 4-2 研究対象者に生じる負担並びに予測されるリスク及び利益、これらの総合的評価並びに当該負担及びリスクを最小化する方法

既存試料のみを用いることから、研究対象者に肉体的な危険性や不利益を生ずることは

ない。また、当該検体を用いてヒトの遺伝情報の解析は行わない。

#### 4-3 インフォームド・コンセントを受ける手続等（説明書及び同意書を含む。）

既保存検体については、以下の理由により、研究対象者から同意を得ない。

- 本研究に使用する患者臨床検体は感染症法に基づく調査を目的に採取された後、保存された試料であり、研究対象者に対して検体採取に伴う危険は発生しない。（本研究は、法令の規定により実施される研究により既に取得している試料を用いる。）
- 同手続きの免除によって研究対象者の不利益にならない。
- すでに採取された検体は、診断または感染拡大防止のための病原体検査を目的として検体採取が実施されているため、さかのぼって同意を得ることが困難である。ただし、研究対象者から拒否の申し出があった場合には、これに対応する。研究に協力を希望されない方は、下記の問い合わせ先までお知らせ下さい。

#### 4-4 その他参考となるべき事項

本研究は、富山県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得ている（令和5年6月13日、受付番号 R5-1）。

#### 【問い合わせ先】

富山県衛生研究所 ウイルス部

主任研究員 矢澤 俊輔

電話番号：0766-56-8143（受付時間：平日 9:00～17:00）