

# 感染症流行予測調査における日本脳炎感受性試験の 検査系の代替法の検討について

矢澤 俊輔 佐賀由美子 松田 麻未<sup>1</sup> 鈴木 亮介<sup>1</sup>  
林 昌宏<sup>1</sup> 田島 茂<sup>1</sup> 谷 英樹

Examination of alternative methods for Japanese encephalitis susceptibility testing in national epidemiological surveillance program of vaccine-preventable diseases in Japan

Shunsuke YAZAWA, Yumiko SAGA, Mami MATSUDA, Ryosuke SUZUKI,  
Chang-Kweng LIM, Shigeru TAJIMA, and Hideki TANI

**目的：**当所では、「感染症流行予測調査」の一環として毎年日本脳炎ウイルス (JEV) の感受性調査を行っており、全年齢を対象としたヒトの JEV 抗体価並びに抗体保有率の調査を実施している。現在、抗体価の算出方法は、ウイルスを細胞に接種して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する「フォーカス法」が公定法となっている [1, 2]。しかし、この方法は、手順が煩雑で時間がかかることに加え、判定を目視でフォーカスを数えることによって行うため主観が入りやすい欠点がある。また、染色してフォーカスを作製する際には染色ムラが発生し、フォーカスのカウントができないこともある。ゆえに、簡便かつ正確なデータを出すためには、フォーカス法に変わる代替法が必要である。

近年、JEV のいくつかの構成遺伝子を欠損させて増殖できなくした single-round infectious particles (SRIPs) の作製が試みられている [3, 4]。SRIPs には、リポーター遺伝子としてナノ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。

さらに、流行予測調査の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のヒトの中和抗体価の測定ですでに用いられている、細胞変性効果 (CPE) を使った評価系を検討する。この評価系では VeroE6/TMPRSS2 細胞を用い、CPE を指標にして行っている。JEV の CPE 評価系はまだ行われていない。

本研究では、これらの方法が JEV の抗体価測定でも使用可能かどうか確認するため、感染症流行

予測調査事業での評価系として現行の評価系であるフォーカス法と、SRIPs 法および CPE 法が同等であるかどうか検討した。

## 材料および方法

### 1. 検体

様々な年齢のヒト血清 360 検体 (2019, 2021, 2023 年度, 各 120 検体) を用いた。これらの血清は、56℃, 30 分間で非働化处理し、被検血清とした。

### 2. 抗体測定法

#### (1). フォーカス法

検査術式 [2] に準じて実施した (一部試薬を変更)。すなわち、被検血清を、10% ウシ胎児血清 (FBS) および 1% Penicillin-Streptomycin 添加 Minimum Essential Medium Eagle (MEM; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) にて、5 倍～160 倍に 2 倍階段希釈した。1 × 10<sup>2</sup> FFU/50μl に調整した JEV-Beijing-1 株を希釈済み血清に等量混合し、37℃, 1 時間で中和反応 (最終血清希釈倍率 10 倍～320 倍) を行った。反応液 50μl を、96 ウェルプレートに単層培養した Vero Osaka 細胞 (国立感染症研究所より入手) に接種し、37℃, 2 日間培養した。培養後、培地を除去し、10% ホルマリン溶液で、20 分間室温で反応させて固定した後、PBS で洗い、乾燥させた。さらに、1 次抗体として抗 JEV ウサギ血清 (× 500, 国立感染症研究所より入手) を、2 次抗体として抗ウサギ抗ヤギ血清 (× 200), その後、標識抗体 (× 50, 共に VECTASTAIN Elite ABC Kit, Funakoshi,

1. 国立感染症研究所

Japan) を順次 40 $\mu$ l 添加し, 各 37 $^{\circ}$ C, 30 分間反応させた. 最後にペルオキシダーゼ反応 (Peroxidase Stain DAB Kit, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) にて染色した. 染色してできたフォーカスを目視もしくはルーペ下でカウントし, ウイルスコントロール (VC) のフォーカス数の半分以下になる最大血清希釈倍率を抗体価とした (図 1, 表).

## (2). SRIPs 法

JEV-SRIPs は, 既報の通り (5), 3 種類のプラスミド (pCMV-JEV-Beijing-1-prME, pCAG-YF-C, pCMV-YF-nluc-rep) から作製した. 1 dish あたり, pCMV-JEV-Beijing-1-prME 1.25 $\mu$ g, pCAG-YF-C 1.25 $\mu$ g, pCMV-YF-nluc-rep 2.5 $\mu$ g, ポリエチレンイミン (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, America) 25 $\mu$ l, Opti MEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, America) 250 $\mu$ l を混ぜ, 室温で 30 分静置した. 静置後, 単層培養した 293T 細胞 (JCRB 細胞バンクより入手) に全量接種してトランスフェクションし, 37 $^{\circ}$ C, 3 日間培養した. その後, 上清を回収し, JEV-SRIPs とした.

被検血清と最終濃度が 800 倍になるように希釈した JEV-SRIPs と混合し 37 $^{\circ}$ C, 1 時間中和反応を行った (最終血清希釈倍率 10 倍 ~ 640 倍). 96 ウェルプレートに単層培養した Vero Osaka 細胞に反応液 40 $\mu$ l 接種した. その後, 非働化済み 10%FBS および 1%Penicillin-Streptomycin 添加 MEM 培地 60 $\mu$ l を追加し, 37 $^{\circ}$ C, 1 日間培養した. 培養後, 培地を除去し PBS200 $\mu$ l で 1 回洗浄後, ルシフェラーゼ基質液 (Nano-Glo Luciferase Assay, Promega, Wisconsin, USA) 40 $\mu$ l を添加し, 振とうした. 反応液 20 $\mu$ l をホワイトハーフプレート (Corning, New York, USA) に移し, GloMax<sup>®</sup>Navigator マイクロプレートルミノメーター (#G2000, Promega Corporation) を用いて, ルシフェラーゼ活性を測定した (図 2). それぞれの希釈倍率ごとの測定値を JEV-SRIPs コントロール値で除し, 回帰直線を引くことで IC50 を求め抗体価とした. 抗体価が 640 倍を超えるものは「640 倍 $\leq$ 」, 10 倍未満のものは「<10 倍」と定義した. ただし, 相関係数を求めるときには, 抗体価が 320 倍を超えるものは「320 倍<」と定義した (表).

## (3). CPE 法

SARS-CoV-2 感受性調査のプロトコルに準じて実施した [6]. すなわち被検血清を, 2%FBS お

よび 1%Penicillin-Streptomycin 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) にて, 2 倍階段希釈した (2.5 倍 ~ 320 倍). 被検血清に, 100TCID<sub>50</sub>/25 $\mu$ l に調整した JEV-Beijing-1 株を等量加え, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間で中和反応を行った (最終血清希釈倍率 5 倍 ~ 640 倍). 反応液と 1.0  $\times$  10<sup>5</sup>/ml に調整した VeroE6/TMPRSS2 細胞 (JCRB 細胞バンクより入手) を等量混合し, 96 ウェルプレートに播種し, 37 $^{\circ}$ C, 5 日間培養した. 培養後, 顕微鏡観察にて CPE を確認し, CPE が確認されなかった最大血清希釈倍率を抗体価とした (図 3, 表).

## 3. 倫理審査

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実施した (R5-1).

**結果:** フォーカス法で求めた抗体価と SRIPs 法で求めた抗体価との間で相関関係を調べた. まず, フォーカス法で求めた抗体価と SRIPs 法で求めた IC50 は, 相関係数  $r = 0.935$  となり非常に強い相関が認められた. また, フォーカス法で求めた抗体価と CPE 法で求めた抗体価は, 相関係数  $r = 0.800$  となり強い相関が認められた.

**考察:** 今回, JEV の抗体価測定におけるフォーカス法 (現行法) に代わる新たな 2 つの方法に関して, 代替法として用いることが可能か検証したが, いずれの方法もフォーカス法と強い相関が認められた. 2 つの代替法にはそれぞれ利点がある. まず, SRIPs 法の利点は大きく 3 つある. 第 1 に, フォーカス法と比べ非常に簡便な点である. フォーカス法では, 中和試験と培養に 4 日かかるのに加えて, 染色して目視でカウントにも時間がかかる. 流行予測調査では検体数も 200 件以上あり多いため, さらに時間がかかる. また, フォーカスのカウントは, フォーカスがとても小さいため非常に労力がかかる. さらに, 染色ムラが発生し再試験になることもある. しかし SRIPs 法では, 染色の工程はなく, さらに試薬を入れて測定機器で測定するだけであり, 時間も労力もかからない. また, 反応液接種後の培養時間は既報 [3,4] では 2 日 ~ 3 日間であったが, 1 日でも傾向は変わらないことが分かったため今回のプロトコルに採用した (データ示さず).

第 2 に検査精度の向上が期待できる点である.



図1. フォーカス法の写真

(A) フォーカスの染色像. 96 ウェルプレートの1ウェルを拡大した写真. 褐色に染まる点一つ一つがフォーカスであり, この数を数える. (B) フォーカスカウントの様子. 下から光の当たる台の上に96 ウェルプレートを載せ, ルーベ越しにカウントする.

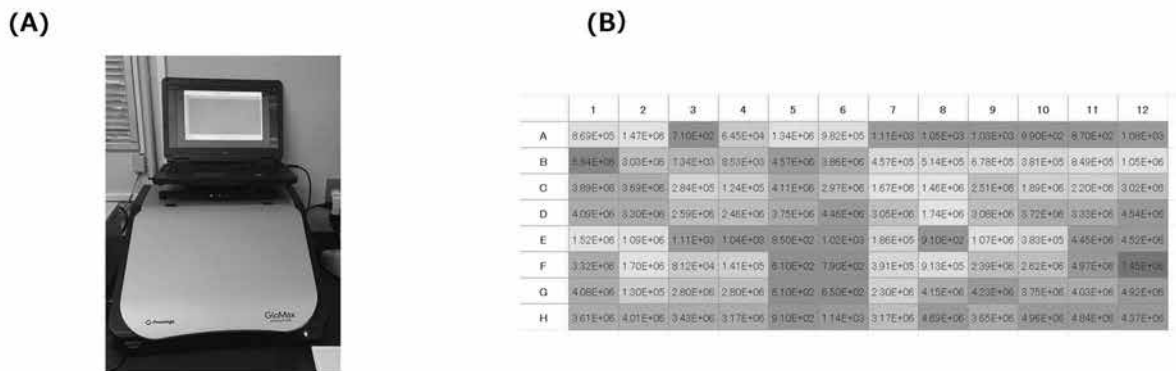


図2. SRIPs 法の写真

(A) GloMax®Navigator マイクロプレートルミノメーター. 96 ウェルプレートを入れて発光強度を測定する. (B) 測定後, 写真のように各ウェルの発光強度がエクセルの形式で表示される.

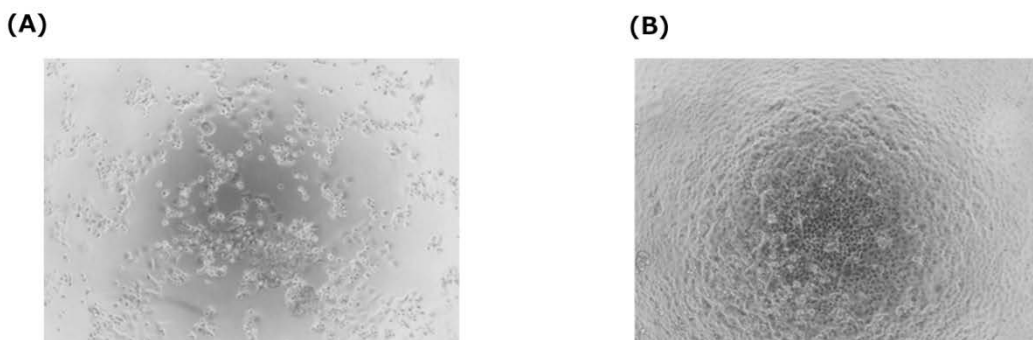


図3. CPE 法の写真

(A) CPE(+), (B) CPE(-)

表. 実際に測定した抗体価の例

(A) フォーカス法

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	30	100<	0	0	0	0	0	0	0	0
20	100<	100<	0	7	0	0	0	0	0	0
40	100<	100<	9	13	0	0	7	0	0	0
80	100<	100<	23	46	14	6	11	0	0	0
160	100<	100<	100<	100<	64	17	20	3	2	0
320	100<	100<	100<	100<	100<	22	55	5	16	5
抗体価	10	<10	80	40	80	320<	160	320<	320<	320<

VCのフォーカス数に対する割合 (%)

(B) SRIPs法

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	100<	100<	2	1	1	2	1	3	1	1
40	100<	100<	100<	72	19	7	3	8	2	1
160	100<	100<	100<	100<	100<	61	38	13	4	3
640	100<	100<	100<	100<	100<	100<	99	59	50	31
IC <sub>50</sub>	0	0	20	31	75	134	305	546	648	1011

VCのルシフェラーゼ活性に対する割合 (%)

(C) CPE法

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
40	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
80	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
160	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
320	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
抗体価	5	10	40	80	40	160	160	160	320	160

+ : CPE陽性、- : CPE陰性

(A) フォーカス法. ウイルスコントロールのフォーカス数を100%としたときの割合を表す. 50%以下になる最大血清希釈倍率を抗体価とする. (B) SRIPs法. ウイルスコントロールのルシフェラーゼ活性を100%としたときの割合を表す. 回帰直線を引くことで, IC<sub>50</sub>を求め抗体価とする. (C) CPE法. CPE (+)となる最大血清希釈倍率を抗体価とする.

フォーカス形成法はフォーカス自体が極めて小さく, 測定者が変わると抗体価が異なってしまう可能性がある. 一方, SRIPs法ではルシフェラーゼ活性を機械が測定し数値として出すので, 主観は入らない. 今回, SRIPs法の抗体価をIC<sub>50</sub>で出したが, フォーカス法では10倍未満~320倍以上までしか測定できなかったことに合わせるために, IC<sub>50</sub>が320以上の検体もすべて320<と定義した. しかし実際には, IC<sub>50</sub>だとフォーカス形成法以上

の範囲を測定することが可能であり, 今まで以上に正確な値を求めることができる.

第3に術者に対して病原性が著しく低いことである. フォーカス形成法では生ウイルスを使うのに対しSRIPs法では使用しない. そのため, 術者は最小限の防護着で操作を行うことができる.

本研究におけるもう一つの代替法であるCPE法にも利点はある. まず, 操作が簡便であることに加えて, 特別な試薬や機械が不要である点である.

フォーカス形成法では、抗体染色でフォーカスを染色するため、複数の試薬が必要である。また SRIPs 法では、JEV-SRIPs は現在のところ販売されておらず、自分で作製する必要があることに加え、測定機器を調達しなければならない。対して CPE 法では、JEV と細胞だけで試験することができる。また、CPE の判定も簡単である。しかし、SRIPs 法とは逆に生ウイルスを使うため必ずしも安全ではないこと、判定までに5日かかってしまい、時間がかかることが欠点である。

また、今回 SRIPs 法で求めた測定値の中には、1万倍希釈 ( $IC_{50}$ ) 以上となる検体が複数あった。しかし、実際これらの検体をより広範囲の希釈倍率で中和試験を行った結果、大きく下方修正された (データ示さず)。範囲を大きく超えた値のデータの解釈には注意が必要である。

さらに今回の研究では行わなかったが、SRIPs 法が JEV の診断や既感染者の推定に役立つ可能性がある。Maeki らの報告によると、JEV 患者のプラークアッセイを使った中和試験では、1,280 倍～20,480 倍以上の抗体価を示し [8]、今回の SRIPs 法での  $IC_{50}$  の一部検体はこの範囲に該当する。これらの検体は、直前に JEV に感染した可能性がある。フラビウイルス属に含まれたウイルスは互いに交差反応性があるため血清学的検査から診断するのが難しいが、Matsuda らは、複数のフラビウイルスの SRIPs を使ったそれぞれの中和試験によって他のウイルスの交差反応を否定できることを報告している [4]。この報告と合わせて、本研究の測定系が診断も可能であるか検証していく必要がある。

**結論：**SRIPs 法、CPE 法ともに日本脳炎感受性試験における現行法に代わる方法として使用可能であり、それぞれの利点と欠点を理解したうえで選択する必要がある。

## 出 典

本報告は、以下の論文に基づき、内容を日本語で要約・再構成したものである：Yazawa S, et al., *Journal of Virological Methods*, 2025 Apr 8: 115163

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、技術面および事務面でのご支援をいただいた川口泉氏にお礼申し上げます。また、有益な議論をしてくださった高崎智彦氏にも心より感謝申し上げます。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の科学研究費補助金 (課題番号: JP23fk0108656, JP24fk0108656) の助成を受けて実施されました。

## 文 献

1. 令和6年度感染症流行予測調査実施要領
2. 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所感染症流行予測調査事業委員会. (2019). 感染症流行予測調査事業検査術式令和元年度改訂版
3. R. Suzuki et al. (2014). *Gen Virol. Jan*;95 (Pt 1):60-65.
4. Matsuda et al. (2018). *Sci Rep. Nov* 9;8(1)
5. A. Yamanaka et al. (2021). *mSphere. Aug* 25 ;6(4)
6. Tuberculosis and Infectious Diseases Division, Health Bureau, Ministry of Health, Labor and Welfare, and National Institute of Infectious Diseases (2021), *Infectious Disease Epidemic Forecasting Survey Committee, 2021 National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases Project Testing Method, 2021.*
7. Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Health Service Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, Government of Japan Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Japan (2023). *Annual Report 2021 National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases.* <https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/yosoku/AnnReport/2021/00.pdf>.
8. T. Maeki et al. (2021). *mSphere. Aug* 25;6(4)