

#### D. 考察

全国に散在するラテンアメリカ人の心臓疾患患者でChagas病慢性期を示すケースは16名におよび、そのうち7名についてはPCRで*T.cruzi*-DNAが検出され病原体キャリアーであることが示唆されている。

Brazil, Boliviaの日系移住地でのシャーガス病感染状況は10~15%と略一致している。また、同様に在日ラテンアメリカ人のシャーガス病有症者の鑑別診断検査依頼のデータと献血者と比較すると、検査対象の平均年齢がブラジル人集団53歳、ボリビア人集団52歳と、明らかに献血対象者とは年齢的に隔たりが認められた略15歳若かった。

今回献血対象になった世代はほとんどがリスクの少ない世代であると考えられる。一方現在世界的に最もシャーガス病感染リスクの高いボリビアからの在日定住者は僅かであるが、南米で現在最も感染リスクが高いボリビア人集団を組織的に健診が出来ないのは、彼らのコミュニティーを把握するリーダーが居ないことにあり、今後もこの集団に関する情報の把握は大変困難と思われる。

Bilivai, Brazilの日系家族に対する*T.cruzi*抗体スクリーニングおよび、検査啓発を行い、その家族から、在日家族の状況を得て、今後の国内での健康相談、抗体検査の呼びかけを行うことが可能となった。

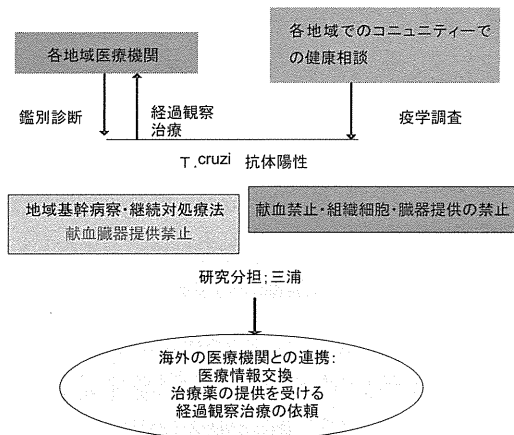
*T. cruzi*抗体検査キットの評価対象として用いたChagas-Stat-Pack (ChemBio-USA)は特異性が高くRecombinant antigenを用いて、中南米で広く用いられているスクリーニングキットである。抗

体をチェックするキットは多いが、一方で献血現場、医療現場で問題となる抗原のチェックシステム開発を急ぐことが急務である。そこでLAMP法による検討を今後推進することがのぞましい。今後在日ラテンアメリカ人を対象とした疫学調査の実施では地域特性を把握し成人を対象に検査を行うことが望ましいが、先天性感染シャーガス病検討のためには母親が抗体陽性の場合はその限りではない。中南米の治療指針では抗体陽性者が15歳未満であれば、必然的に治療対象となる。ラテンアメリカ人集団を中心に調査を継続すれば、更に潜在感染者が検出されるはずであり、早期発見につながり彼らにとっても、自身の健康管理に有益である。また在日平均年から考え、すでに献血年齢に達する、わが国での出生、成人が増加することは危惧せねばならない。彼らは日本人として献血する可能性が高い。また今回の先天性感染児のように、本人家族はまったくChagas病感染に気付いていないことがほとんどである。彼女らの出産に関係した医療機関従事者の抗体検査も行い、2次感染の有無について抗体検査を実施したが、幸いにも感染は否定された。しかしこのようなラテンアメリカ人の出産に関わった医療関係者はすでにかかなりの数になるはずである。

Boliviaでは慢性シャーガス病妊婦の約5%に先天性感染児の出産が報告されている。ラテンアメリカ人を対象にした検診調査ができたのも各地のNPO、NGO、及びブラジル領事館の協力が得られた結果である。地域社会医療の面からも意義があったと思われ、今後のラテンアメリカ人集住地域での活動の推進につ

ながりかつ、安全な献血協力への呼びかけにもなる。

## E. 結論



今後もラテンアメリカ人のシャーガス病慢性感染者を見出すために、南米からの定住者に対するブラジル領事館移動領事館業務、NPO,NGO、コミュニティーのイベント会場での健康相談会を利用することにより多くの検討が出来る。

ブラジル人を対象にしたイベントでも、ペルー人、ボリビア人などの他国の参加もあった。ラテンアメリカ人支援NPO,NGOの実施するネットワークを通じシャーガス病検診のみならず、ラテン諸国の知られざる感染症に対する啓蒙講演は彼らを受け入れる地域社会の医療機関関係者への呼びかけにもなりうる。献血現場で実施する問診票の改訂にも言及し、献血制限などの基本になる抗体スクリーニング検査実施方法などの提言を早急にまとめる必要がある。

## F. 健康危険情報

すでに南米長期滞在者(日本人)から抗体陽性者が検出されたことは、献血現場では日本人に対しても中南米滞在経験者には経過時間の長短に関係なく

*T. cruzi* 抗体スクリーニングは行うべきである。また数は少ないが在日ボリビア人の抗体陽性者については本疾患の慢性感染者妊婦からの出産時には先天性感染を配慮すべきであることが明らかで、産科、小児科領域への注意喚起を行う必要がある。今回の先天性感染児についても今後の献血輸血の禁止など健康管理面での注意を促す必要がある。また、本疾患流行地から移住してきたラテンアメリカ人で日本にて出産を経験した者たちに関して、疫学調査を拡大し、先天性感染者の検索の必要がある。シャーガス病慢性感染キャリアーの可能性を強く示唆する者は少なからず在日定住者ラテンアメリカ人の多くに存在する。

ラテンアメリカ人定住者が多い地域医療関係者には注意を促す啓蒙口演など情報の発信が不可欠。ラテンアメリカ人集住地域での献血パイロット地域をさらに広げての抗体スクリーニング検査の実施を提案する。

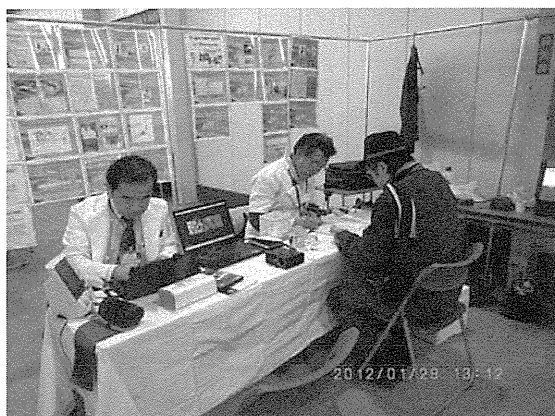
*T. cruzi* 抗体陽性者に対する対応についていかに示す。

### *T. cruzi*抗体陽性者に対する対処

- ・ 無症者:経過観察のため地域基幹病院を紹介
- ・ 有症者:症状に応じて地域基幹病院紹介(内科医循環器、消化器内科、産科、小児科)
  - ・ 現在Chagas病患者経過観察協力医療機関
- ・ 滋賀県: 守山成人病センター、甲賀病院、滋賀県立医大
- ・ 三重県: 市立四日市病院
- ・ 愛知県: 増子記念病院、豊田厚生病院、岡崎市民病院、名古屋記念病院、豊田ハートセンター
- ・ 静岡県: 聖隷三方原病院、JA厚生連 遠州病院
- ・ 神奈川県: 東海大学、大磯病院、鳥越クリニック、横浜市民総合医療センター
- ・ 群馬県: 大田総合病院

支援協力NPO・NGO  
NPO-MAIKEN(八王子)  
NPO-SABJA(青山)  
国際社会貢献センター  
Disque-Saude(ブラジル領事館)  
財団法人: 静岡県産業労働福祉協会

ラテンアメリカ人コミュニティーでの健康相談風景を示す。浜松ZIPAにて。



(20120129 浜松ZIPAにて健康相談会)

母国での治療を望む場合は以下の機関が協力可能である。1～3はブラジル国内、4～5はボリビア国内である。

### 海外での協力機関

- 1) Ambulatorio Chagas/ICC: PROCAPE-UPE  
Hospital-Oswald Cruz-Pernambuco-Brazil
- 2) USP-Faculdade de Medicina Dept-Infect  
Sao Paulo-Brazil
- 3) Serviço Publico Federal Conselh Regional  
de Medicina do Sao Paulo-Brazil
- 4) CENETROP/Banco Nacional de Sangre/  
SC-Bolivia
- 5) Programa Nacional de Chagas/SC.Bolivia

日系移住地での啓蒙口演は在日家族の状況把握に有効である。



(日本日リビア協会での啓蒙口演)

### F. 業績

論文:なし

学会発表:

60回日本感染症学会東日本学術集会;  
2011-10-26~28(山形)

日本感染症学会・抄録集:147P

在日ラテンアメリカ人の慢性慢性シャーガス病とWHO-WPROのシャーガス病非流行国対策について

慶應義塾大学医学部・熱帯医学寄生虫学 三浦 左千夫

G. 特許取得:なし

実用新案登録:なし

「血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」  
（H23－医薬－一般－003）

分担研究報告書

ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応及び  
国内献血におけるシャーガス病の感染リスクの把握

研究分担者 百瀬俊也（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課長）  
研究協力者 沖 学（日本赤十字社血液管理センター 検査課長）  
高松純樹（愛知県赤十字血液センター所長）  
鬼束惇義（岐阜県赤十字血液センター所長）  
南澤孝夫（静岡県赤十字血液センター所長）  
小島 精（三重県赤十字血液センター所長）  
内田茂治（日本赤十字社血液事業本部  
中央血液研究所 感染症解析部長）  
平 力造（日本赤十字社血液事業本部 製造管理課参事）  
五井 薫（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）  
石野田正純（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）

研究要旨：

ウエストナイルウイルス（以下、WNV という）の国内発生に備えて、現在備蓄している TMA 法の WNV-NAT 試薬（Procleix® WNV Assay）と日本赤十字社 4 ヲ所の NAT 施設へ導入しているロシュ・ダイアグノスティックス株式会社（以下、ロシュ社）製 cobas®s401 システムを用いた TaqMan PCR 法の WNV-NAT 試薬（TaqScreen® WNV assay）について、感度の比較検討を行った。

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴又は滞在歴を有する 2011 年（速報値）の献血申込（受付）者数及び献血者数を集計・解析した。平成 23 年 1～3 月の中南米居住歴のある献血申込（受付）者数 3,184 人（月平均 1,061 人）、献血者数 2,683 人（同 894 人）に対し、同年 4 月の問診票改訂以降の 4～12 月（9 ヲ月間）の中南米滞在歴のある献血申込（受付）者数 4,471 人（同 497 人）、献血者数 3,581 人（同 398 人）と半減した。国別で分類した場合、従来最も多かったブラジルは献血申込（受付）者数の月平均 448 人、献血者数の月平均 376 人からそれぞれ 116 人、93 人と約 1/4 に減少していた。このことは、東日本大震災の影響による減少も考えられるが、問診票の外国滞在歴に関する質問が、マラリアの感染リスクを想定した滞在期間を限定した質問になっていることから、中南米からの定住者の中南米滞在歴を拾えなくなった可能性が考えられる。

中南米地域からの定住者が多い東海四県（愛知県、静岡県、岐阜県、三重県）管内における献血申込（受付）者のうち同意を得た者に対し、*Trypanosoma cruzi* 抗体検査を実施した。平成 23 年 4 月～12 月現在、44 人（男性 31 人、女性 13 人）すべて陰性であった。年齢別では、20 代 8 人、30 代 23 人、40 代 11 人、50 代 2 人で、平均は 35.2 歳であった。

国籍別では、ブラジル 35 名、ペルー 3 名、メキシコ 1 名、日本 5 名であり、ブラジル人の出身地はサンパウロ州が 28 人と最も多く、以下パラナ州 5 人、マツト・グロッセ・ド・スル州、リオデジャネイロ州各 1 人であった。

## A. 研究目的

現在、WNV 国内発生に備えて TMA 法の WNV-NAT 試薬 (Procleix® WNV Assay : ノバルティス株式会社) を 5000 テスト分血液管理センターに備蓄している。本試薬は TMA 法の試薬であり、測定機器を保有しているのは京都府福知山市の血液管理センター及び東京都江東区の東京都赤十字血液センターである。

迅速かつ広域的な対応を可能とするため、日本赤十字社 4 カ所の NAT 施設へ導入されたロシュ社 cobas®s401 システムを用いて、TaqMan PCR 法の同社製 WNV-NAT 試薬 (TaqScreen® WNV assay) の感度について、TMA 法の WNV-NAT 試薬と比較検討した。

なお、両者の感度は、各社の参考資料によると TMA 法 8.2copies /mL (95%検出感度)、TaqMan PCR 法で 30copies /mL (95%検出感度) である。

また、国内献血におけるシャーガス病の感染リスクを把握することは、日本において、献血血液の重要な安全対策上の課題と言える。平成 23 年 4 月から外国居住歴・滞在歴の間診票が図 1 のとおり変更となったことによる中南米居住歴又は滞在歴を有する献血受付け者、献血者の推移を検討した。

さらにブラジル居住歴を有する献血受付け者が偏在している愛知県、静岡県、岐阜県、三重県東海 4 県において、中南米居住歴を有する献血申込者 (日本人の長期滞在歴を有する者を含む) に対して、同意を得た上で、シャーガス病に関する質問と *Trypanosoma cruzi* (以下、*T. cruzi*) 抗体検査を実施し、抗体陽性者への健康管理に繋げていく。

平成 22 年度 (2011 年 2~3 月) の実施状況は、46 名 (男性 35 名、女性 11 名) であり、全員陰性であった。年齢別では、20 代

18 人、30 代 12 人、40 代 12 人、50 代 3 人、60 代 1 人で、平均は 35.2 歳であった。国籍別では、ブラジル 36 人、ペルー 3 人、コロンビア 1 人、パラグアイ 1 人、日本 5 人であった。平成 23 年度も引き続き、東海 4 県におけるパイロットスタディを実施した。

## B. 研究方法

### 1. WNV

非感染性とした WNV 液 (WNV NATtrol® : ZeptoMetrix 社 10,000 copies /mL Strain:NYS2001-6263) を希釈用血漿で希釈し、50、30、10、5、2、0 copies /mL 濃度のウイルス添加血漿を作製し、TaqScreen®WNV Assay 試薬及び Procleix® WNV Assay 試薬を用いて NAT を 42 重測定した。

### 2. シャーガス病の感染リスク

中南米諸国の居住歴 (平成 23 年 1~3 月) 又は滞在歴 (同年 4~12 月) を有する献血申込 (受付) 者数及び献血者数を血液事業統一コンピュータシステムより抽出し集計・解析した。

中南米地域からの定住者が多い東海四県 (愛知県、静岡県、岐阜県、三重県) における献血申込 (受付) 者のうち中南米滞在歴を有する献血希望者に対し、予め献血会場に用意された本調査研究の説明書及び同意書を渡し、その内容を理解し同意書に署名した者を対象とした。併せて出身地、シャーガス病に関する認知度等の質問票に回答いただいた。別に検体を採血し、愛知県赤十字血液センターにてイムノクロマト法 (STAT-PAK®) 迅速検査を実施した。また、三浦班員の協力を得て、ELI

法（ORTHO®*T. cruzi* ELISA TEST System）及びイムノクロマト法（*Trypanosoma Detect*®）迅速検査による *T. cruzi* 抗体検査を実施した。

（倫理面への配慮）

中南米居住歴を有する者のシャーガス病の感染リスク調査については、予め献血会場に用意された本調査研究の説明書及び同意書を渡し、その内容を理解し同意書に署名した満 20 歳以上の者を対象とした。*T. cruzi* 抗体検査結果を通知し、抗体陽性者に相談医療機関を紹介するなど健康管理に活かすこととしたので、調査対象者に不利益はない。本調査に関して、別途個人情報管理者を指名し個人情報を適切に管理することとした。

本調査研究は、日本赤十字社血液事業研究倫理審査委員会において承認された。（研究倫理審査番号 2010-006）

### C. 研究結果

WNV 試薬の感度試験は、現在実施中であり、まだ結果が得られていない。

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴又は滞在歴を有する 2011 年（速報値）の献血申込（受付）者数及び献血者数を集計・解析した。平成 23 年 1～3 月の中南米居住歴のある献血申込（受付）者数 3,184 人（月平均 1,061 人）、献血者数 2,683 人（同 894 人）に対し、同年 4 月の問診票改訂以降の 4～12 月（9 ヶ月間）では、過去 1 年以内の中南米滞在歴のある献血申込（受付）者数 4,020 人、献血者数 3,244 人、過去 4 年以内に 1 年以上の中南米滞在歴のある献血申込（受付）者数 451 人、献血者数 337 人であり、その合計（重複あり）は、献血申込（受付）者数 4,471 人（月平均 497 人）、献血者数 3,581 人（同 398 人）であった。国別で分類してみると、従来最も多かったブラジルは、1～3 月の献血申込（受付）者数 1,344 人（月平均 448 人）、献血者数 1,127 人（月平均 376 人）から 4～12 月の献血申込（受

付）者数 1,040 人（月平均 116 人）、献血者数 835 人（月平均 93 人）と約 1/4 に減少していた。一方、メキシコは、1～3 月の献血申込（受付）者数 701 人（月平均 234 人）、献血者数 607 人（月平均 202 人）から 4～12 月の献血申込（受付）者数 1,525 人（月平均 169 人）、献血者数 1,240 人（月平均 138 人）となり、国別では最も多くなった。（表 1）。平成 23 年 4～12 月の中南米滞在歴のある献血申込（受付）者 4,471 人を、氏名表記を基に日本人（氏名漢字表記）、外国人（ミドルネーム又はカタカナ表記）に分類したところ、過去 1 年以内の滞在歴のある日本人 3,926 人、過去 1 年以内の滞在歴のある外国人 94 人、過去 4 年以内に 1 年以上の滞在歴のある日本人 376 人、過去 4 年以内に 1 年以上の滞在歴のある外国人 75 人であった（図 2・図 3）。その年齢分布を図 4 に示すが、平均年齢は 38.2 歳であった。

中南米地域からの定住者が多い東海四県（愛知県、静岡県、岐阜県、三重県）における献血申込（受付）者のうち同意を得た者に対し、*T. cruzi* 抗体検査を実施した。平成 23 年 4～12 月現在、44 人（男性 31 人、女性 13 人）すべて陰性であった。年齢別では、20 代 8 人、30 代 23 人、40 代 11 人、50 代 2 人で、平均は 35.2 歳であった。国籍別では、ブラジル 35 人、ペルー 3 人、メキシコ 1 人、日本 5 人であり、ブラジル人の出身地はサンパウロ州が 28 人と最も多く、以下パラナ州 5 人、マツト・グロソ・ド・スル州、リオデジャネイロ州各 1 人であった。44 人のうち、シャーガス病を知っていた者は 33 人、媒介虫であるサシガメを知っていた者は 32 人であり、いずれもすべてブラジル人であった。過去に *T. cruzi* 抗体検査を実施したことがある者は 5 人おり、すべてブラジル人であった。シャーガス病の家族がいる者はいなかった。（表 2・図 5）

#### D. 考察

シャーガス病の非流行地域の日本では、中南米からの定住者や中南米に長期滞在歴のある日本人の感染リスクを考慮する必要がある。献血時の問診上の取り扱いは、「シャーガス病の既往歴のある者から採血しないこと」としているが、感染者自身も無症候期には自覚していないことから、実際にはシャーガス病の既往歴を申告する者はいないと考えられる。現状においては、日本語を十分に理解していない外国人は献血に協力することが困難であること、中南米の一部地域はマラリア流行地と重なることなどから一定のバリアになっていると考えられる。

しかし、平成 23 年 4 月以降の中南米滞在歴のある献血者数の減少は、東日本大震災の影響により中南米出身定住者の減少も考えられるが、問診票の外国滞在歴に関する質問が、マラリアの感染リスクを想定した、滞在期間を限定した質問になっていることから、中南米出身定住者の中には問診項目に該当せず中南米滞在歴を拾えなくなった可能性が考えられる。

国籍別外国人登録者数（平成 22 年末現在）は、ブラジル約 23 万人、ペルー約 5.5 万人、ボリビア約 6 千人、アルゼンチン及びコロンビアが約 3 千人、パラグアイ及びメキシコが約 2 千人である。このことから、日本人、外国人別の分類では、日本人に分類されている中には日系人が含まれている可能性があるものの、過去 1 年以内の中南米滞在歴の多くは日本人旅行者が含まれていると考えられ、特にメキシコ滞在歴は、そのことが強く推察される。

幸い現在までのところ *T. cruzi* 抗体陽性者は認められていないが、評価できる数には至っておらず、引き続き中南米からの定住者が多い地域を中心とした疫学調査を継続して注視したい。

今後、調査結果を踏まえ、中南米滞在歴による献血制限や選択的スクリーニング検査

導入などの対策を検討することも考慮する必要がある。

#### E. 結論

日本では、現在のところ輸血を介して *T. cruzi* 感染事例は報告されておらず、シャーガス病感染リスクは低いと考えられるが、中南米滞在歴を有する献血者の中に、*T. cruzi* キャリアが存在する可能性は否定できない。引き続き中南米からの定住者が多い地域を中心とした疫学調査を継続して注視するとともに、中南米滞在歴による献血制限や選択的スクリーニング検査導入などの対策の必要性について検討するためにも、中南米滞在歴を正確に把握しておく必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表（予定）

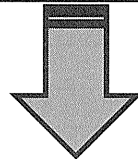
- 1) 百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、内田茂治、日野学、鬼束惇義、南澤孝夫、小島精、高松純樹、田所憲治：東海 4 県の中南米居住歴を有する献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査とシャーガス病に関するアンケート結果について、第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会、福島、2012 年
- 2) 石野田正純、百瀬俊也、柴田玲子、日野学：問診票改訂に伴う中南米滞在歴を有する献血者数の変動について、第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会、福島、2012 年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

旧版(～平成23年3月)

7	1980年(昭和55年)以降、海外に旅行または住んでいたことはありますか。 ① それはどこですか。(国、都市名 ) ② いつ、どのくらいの期間ですか。( ) ③ 1980年(昭和55年)～1996年(平成8年)の間に英国に通算1ヵ月以上滞在しましたか。 (はい・いいえ)	はい・いいえ
---	---	--------



現行(平成23年4月～)

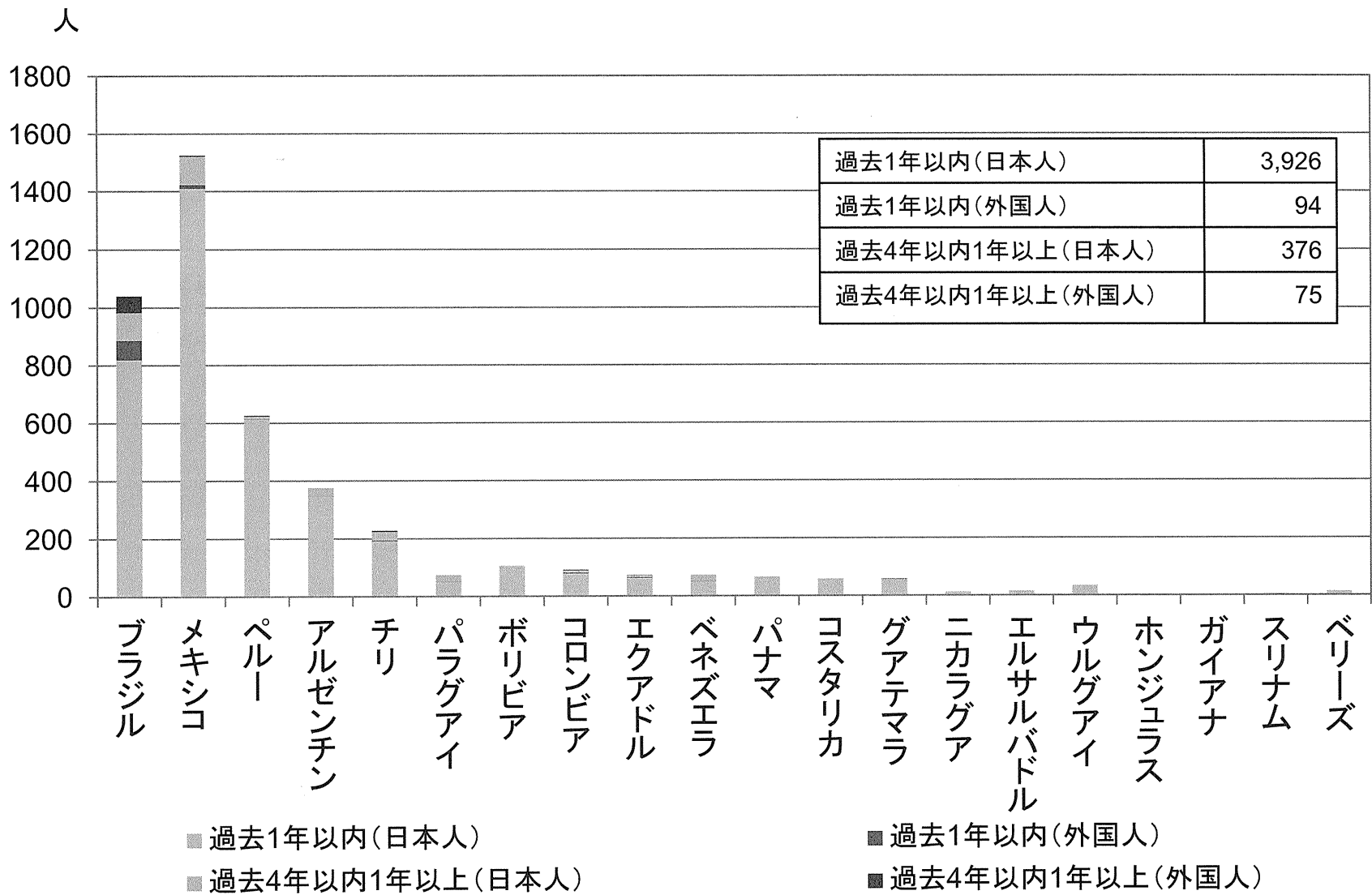
15	1年以内に外国(ヨーロッパ・米国・カナダ以外)に滞在しましたか。 (国名 )	はい・いいえ
16	4年以内に外国(ヨーロッパ・米国・カナダ以外)に <u>1年以上</u> 滞在しましたか。 (国内 )	はい・いいえ

図1. 問診票の改訂



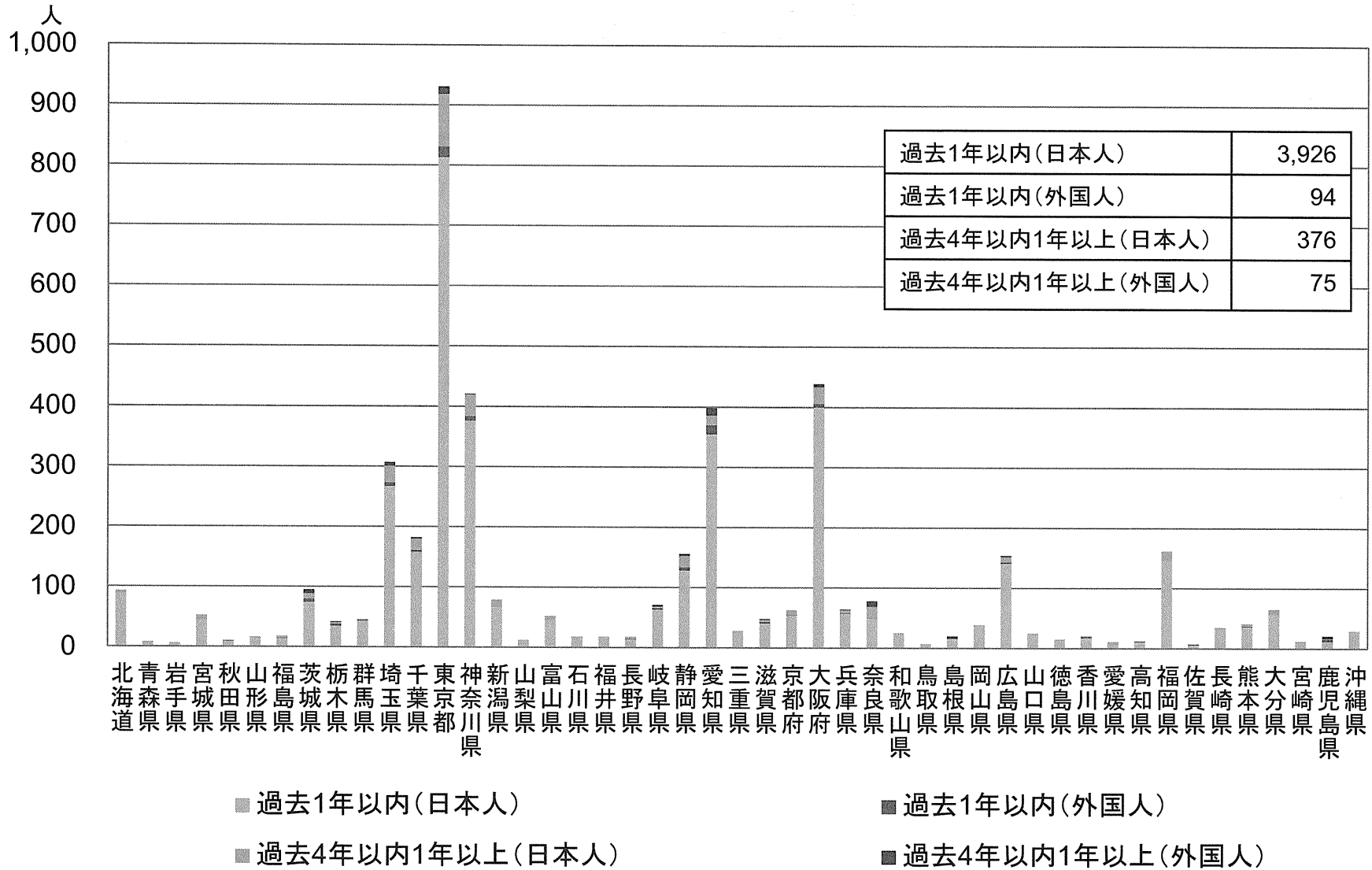
表1. 中南米居住歴のある献血申込(受付)者・献血者数(平成23年1-3月)  
 中南米滞在歴のある献血申込(受付)者・献血者数(平成23年4-12月)

国名	居住歴(旧問診票)		滞在歴(過去1年以内)		1年以上の滞在歴(過去4年以内)	
	献血申込(受付)者数 H23.1-3月	献血者数 H23.1-3月	献血申込(受付)者数 H23.4-12月	献血者数 H23.4-12月	献血申込(受付)者数 H23.4-12月	献血者数 H23.4-12月
ブラジル	1,344	1,127	886	726	154	109
メキシコ	701	607	1,423	1,159	102	81
ペルー	240	187	615	470	11	7
アルゼンチン	208	180	348	294	28	24
チリ	113	97	195	174	33	32
パラグアイ	105	88	51	40	23	15
ボリビア	71	61	93	72	12	7
コロンビア	61	47	82	69	9	5
エクアドル	42	36	64	49	9	6
ベネズエラ	53	47	51	36	22	18
パナマ	71	65	60	46	6	5
コスタリカ	62	50	50	34	9	5
グアテマラ	38	32	39	26	19	15
ニカラグア	34	27	8	1	4	1
エルサルバドル	18	13	10	7	4	3
ウルグアイ	18	15	31	30	3	3
ホンジュラス	0	0	0	0	0	0
ガイアナ	0	0	1	0	0	0
スリナム	0	0	2	1	1	0
ベリーズ	5	4	11	10	2	1
合計	3,184	2,683	4,020	3,244	451	337



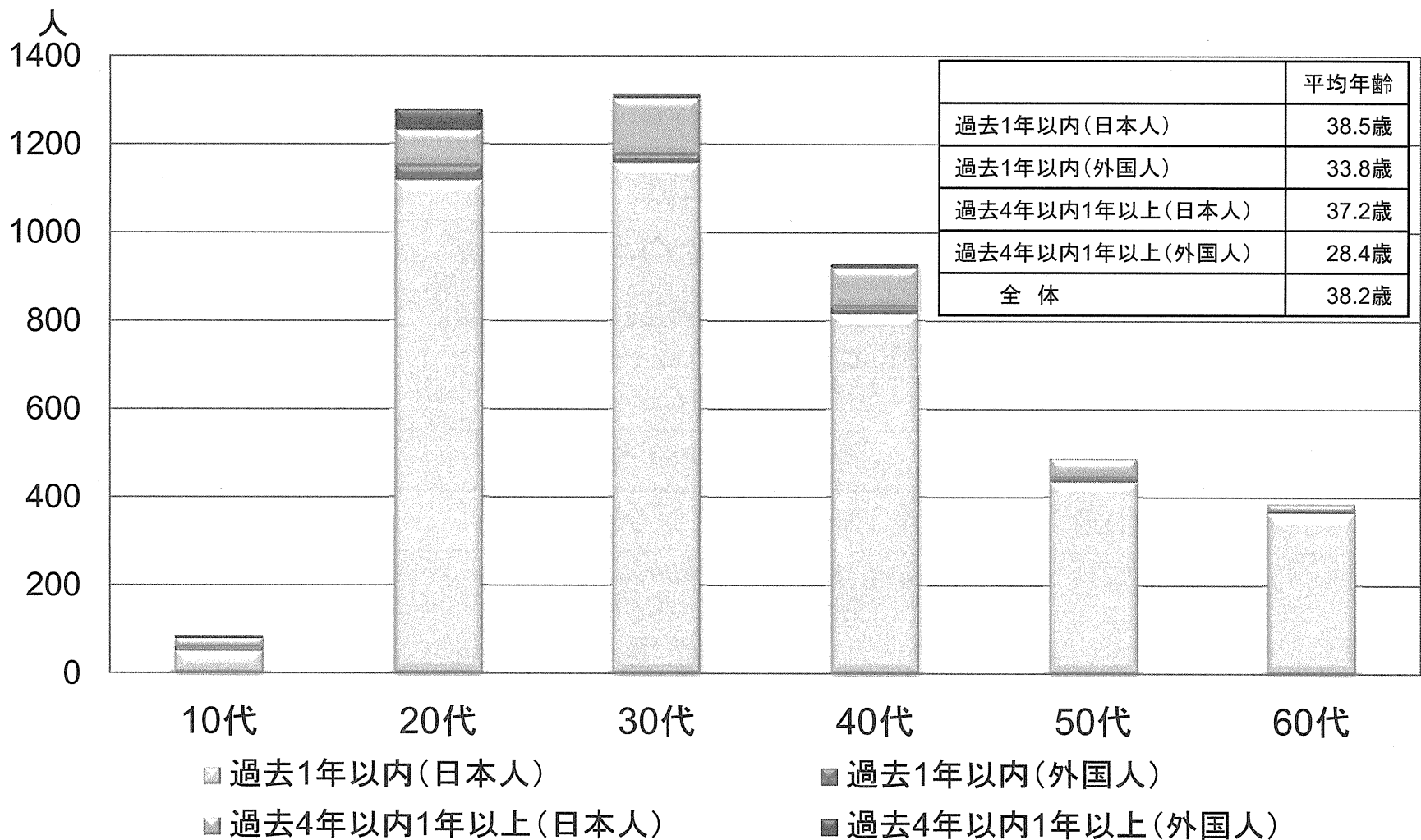
\* 重複回答を含む。

図2. 国別中南米滞在歴献血申込(受付)者数(H23.4-12月)



\* 重複回答を含む。

図3. 都道府県別中南米滞在歴献血申込(受付)者数(H23.4-12月)



\* 重複回答を含む。

図4. 中南米滞在歴のある献血申込(受付)者の年齢分布  
(H23.4-12月)

表2. 東海4県における*Trypanosoma cruzi*抗体検査  
パイロットスタディ(H23.4-12月)概要

協力者	44人(男性:31人、女性:13人) (うち献血者32人)
検査結果	3法: 全員陰性 ①スタットパック(迅速検査) ②ELISA法 ③ <i>Trypanosoma Detect</i> (迅速検査)
年齢	20代8人、30代23人、40代11人、50代2人: 平均35.2歳
国籍	ブラジル35人、ペルー3人、メキシコ1人、日本5人
ブラジル人の出身地	サンパウロ州 28人、パラナ州 5人、 マツト・グロッソ・ド・スル州1人、リオデジャネイロ州1人
シャーガス病・サシガメ 認知度	シャーガス病: 33人(すべてブラジル人) サシガメ: 32人(すべてブラジル人)
T.cruzi 抗体検査経験	5人(陰性)(すべてブラジル人)
家族にシャーガス病	0人

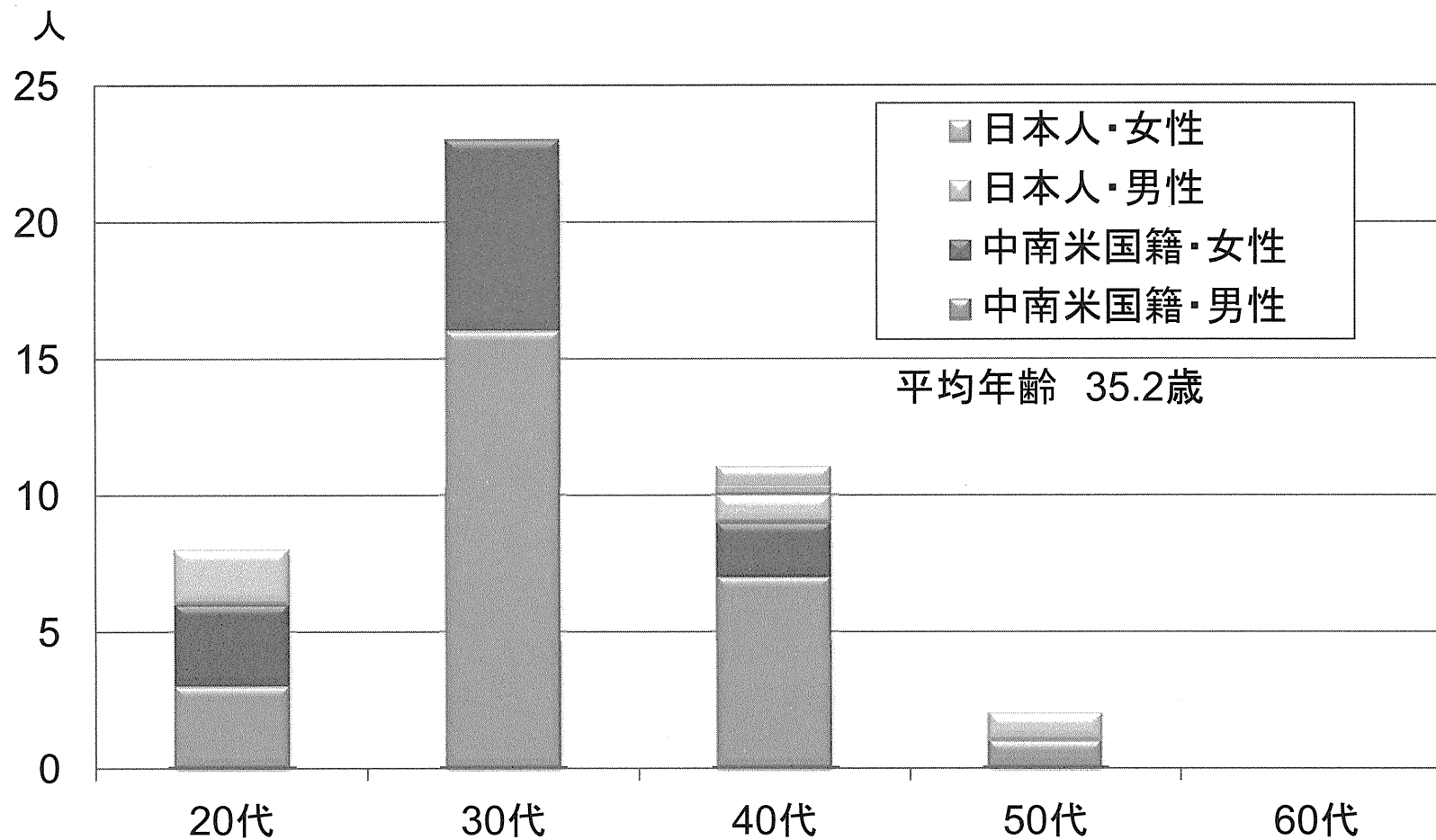


図5. *T. cruzi* 抗体検査パイロットスタディ協力者の年齢分布

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
「血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」  
(H23-医薬-一般-003)

## 分担研究報告書

### ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発

研究分担者 横山直明（帯広畜産大学・原虫病研究センター 准教授）

研究要旨：赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* によるバベシア症は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立している一方、人獣共通感染症としても重要であり、アメリカ北東部では地方病として知られている。近年、本症の世界的な感染拡大が報告されており、日本でも、1999年に神戸で輸血により本邦初の人感染例が発生した。そこで、本研究では“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的とした。平成23年度は、簡易・迅速遺伝子診断法として最近注目を浴びている LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法について、*B. microti* の Ribosomal DNA を標的遺伝子として検討を行った。その結果、デザインした LAMP プライマーは、*B. microti* ribosomal DNA 遺伝子の特異的に増幅し、既存の PCR 法よりも高い検出感度を示した。また、マウスを用いた感染実験では、赤血球寄生率が低い感染初期及び慢性期においても、LAMP 法により感染の検出が可能であった。更に、神戸の人感染血液を用いた LAMP 法においても、増幅が認められた。以上の結果を基盤にして、今後より多くの人の試料を用いてその実用性を検証する必要がある。

#### A. 研究目的

赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立しているが、感染ダニによる刺咬やキャリアーからの輸血により人にも感染し、人獣共通感染症として重要視されている。ヒトバベシア症は、アメリカ北東部の離島や沿岸地帯では地方病として知られている。最近、米国での感染拡大に加えて、中国、メキシコ、台湾、エジプト、南アフリカなどにおいても人感染例が報告され、その感染の拡大が懸念されている。日本でも、1999年神戸で輸血により本邦初の人感染例が報告され、血液製剤の安全性確保や更なる人への感染拡大防止のため、正確で迅速な血清並びに遺伝子診断法の開発が急務となっている。

本研究では、“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的としている。

#### B. 研究方法

##### (1) *Babesia microti* 遺伝子増幅用の LAMP プライマーの設計

*B. microti* 18s ribosomal DNA (rDNA) 遺伝子情報を基に、LAMP用のプライマー4種類 (FIP、BIP、F3、及びB3) を設計した。FIPとBIPについては、増幅遺伝子の塩基配列を確認するための制限酵素 (*Eco*RI) 切断サイトを含む配列を挿入した。また、PCR用のプライマーも同時に設計した。

##### (2) LAMP の特異性と感度の検討

*B. microti*、*Anaplasma*、*Ehrlichia*、及び *Plasmodium falciparum* の DNA サンプルを用いて、LAMP の特性を検討した。また、増幅産物を制限酵素で処理し、その遺伝子断片の塩基配列を確認した。また、標的の遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、10倍希釈系列を作製し、これを健康マウスの血液と混合し、PCR と LAMP を行いその検出感度を比較した。また、DNA の調整法についても、市販の DNA 抽出キットを用いた試料と、99度10分熱処理をした上清を DNA 抽出物とした2種類

の試料を作製した。

### (3) 実験感染マウスの試料を用いた評価

*B. microti* 実験感染マウスモデル系を用いて、標的遺伝子の定量解析を行った。最初に、作製したプラスミドベクターを段階希釈し、コピー数を基に Real-time LAMP を行ってスタンダードカーブを作成した。次に *B. microti* をマウスに感染させ、経時的に血液を採取し、標的遺伝子の定量解析を行った。

また、ヒトバベシア患者の血液を用いて、マウスモデル系と同様に Real-time LAMP を行い、標的遺伝子の増幅を検討した。

### (倫理面への配慮)

人の血液材料並びにマウスを用いた感染実験については、帯広畜産大学の倫理委員会並びに実験動物委員会の承認を得て実施した。

## C. 研究結果

### (1) LAMP 法の特異性の検討

*B. microti* の 18s rDNA 遺伝子の塩基配列に基づいて設計した 4 種類のプライマーを用いて LAMP 法を実施した結果、スメア状の陽性増幅が認められた。更に、増幅産物を制限酵素で切断しその配列を決定した結果、目的とする 18s rDNA 遺伝子が正確に増幅され、プライマーダイマー等の異常がないことが確認された。

また、マダニが同時に媒介しうる *Anaplasma*, *Ehrlichia*, そして血液塗沫を用いた顕微鏡診断において鑑別診断が必要となる *P. falciparum* の DNA サンプルを用いて LAMP 法の特異性を検討した。その結果、*B. microti* にのみ増幅が認められた。

### (2) LAMP 法の感度の検討

LAMP 法の検出感度を既存の PCR 法によるそれと比較を行った。最初に、市販のキットを用いて抽出した DNA サンプルを用いて LAMP 法と PCR 法の検出感度を比較したところ、LAMP の方が約 100 倍の高い感度を示した。次に熱処理による DNA 抽出物を用いて検討した結果、同様に LAMP 法は PCR に比べて約 100

倍の高感度を示した。また、市販のキットによって抽出した精製度の高い DNA サンプルと比較すると、熱処理による DNA 抽出物を用いた LAMP 法と PCR 法は両方とも 10 倍検出感度が低かった。

### (3) 実験感染マウスの試料を用いた評価

最初に、real-time LAMP による標的遺伝子の定量化について検討した。検出時間と標的遺伝子のコピー数をプロットした結果、直線上の検量線が得られた。次に *B. microti* をマウスに感染させ、経時的に血液を採取し、標的遺伝子の定量解析を行った。血液塗沫による原虫の検出は実験感染 6 日目で 1% 未満だったが、real-time LAMP 法による定量検出では 3 日目あるいは 4 日目から血中に含まれる微量の標的遺伝子を検出できることが示された。また、血液塗沫で検出できなくなった 28 日以降に血液を採取し real-time LAMP 法で測定したところ、長期に渡り原虫の DNA が増減を繰り返して検出されることがわかった。

### (4) Real-time LAMP 法による人患者の血液の検討

最後に実際のヒト感染血液を用いて検討を行った。発症者の血液から DNA を抽出し、real-time LAMP を行ったところ、1  $\mu$ l あたりに  $3.5 \times 10^6$  個の標的遺伝子が検出された。また反応後のプロダクトとそれを制限酵素処理して断片化したものを電気泳動で確認した結果、*B. microti* LAMP に特異的なバンドパターンが得られた。

## D. 考察

LAMP 法は、約 60 度の等温で短時間 (1 時間以内) に標的遺伝子を増幅することが可能である。また、特別の機器を必要とせず増幅の結果を目視で判定することも可能である。また、4 種類のプライマーを使用するため、特異性も高いとされている。これらの特徴は、多数の検体を短時間で検定する必要がある輸血の安全性を評価する方法として非常に適していると考えられる。

本研究では、輸血用血液の *B. microti* 感染の有無を評価する遺伝子診断法として LAMP 法の開発を試みた。*B. microti* の 18s



rDNA 遺伝子配列に基づいて設計した4種類のプライマーは、ダニによって媒介される *Anaplasma*, *Ehrlichia*, 及び臨床症状が類似しているため類症鑑別が必要となるマラリア原虫から遺伝子を増幅せず、この LAMP 法が *B. microti* に対して高い特異性を有することが明らかとなった。また、制限酵素によって切断される遺伝子配列を挿入することにより、後に増幅遺伝子の塩基配列の確認も可能となった。

また、この LAMP 法は、遺伝子診断法として最も広く普及している PCR 法と比較して約 100 倍高い感度を有していることが明らかになった。また、PCR 法に比べて、LAMP 法の反応は混雑物による影響を受けにくいという特性を有している。そこで、本研究でも DNA 抽出の簡易化を図るため、99 度 10 分熱処理した上清を DNA 抽出物として用い、その検出感度を比較した。その結果、市販キットを用いた精製度の高い DNA サンプルを用いた場合より、感度が 10 倍低くなることが判明した。それでもなお、市販精製キットと PCR のコンビネーションと比較して、熱処理と LAMP の組み合わせの方が 10 倍ほど高い感度を有していることが明らかになった。

更に、マウス感染モデル系を用いて、感染経過に伴う遺伝子検出の検討を行った。その結果、血液塗抹標本による原虫検出に長時間を有する赤血球感染率が 1.0%未満の感染初期や、原虫がほとんど血液中に認められない慢性期においても長期間 *B. microti* の 18s rDNA 遺伝子の増幅が認められた。更に、発症者の血液からも LAMP 法により *B. microti* の遺伝子増幅が確認された。従って、手法を応用することによって、終宿主となる野生げっ歯類のスクリーニングばかりでなく、人の輸血用血液からも *B. microti* 感染を検出できる新たな有用性が期待された。今後、より多くの人の血液試料を用いて、実用化に向けた評価が必要である。

## E. 結論

本研究において、*Babesia microti* の 18s rDNA 遺伝子を標的とした LAMP 法が確立された。この方法は、PCR 法より高い感度を示し、人患者の血液から抽出した DNA サンプルからも標的遺伝子の増幅が認められた。今後、多数の人血液試料を用いて、LAMP 法の実用化について更に検討する必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

なし

### 2) 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
「血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」  
(H23-医薬-一般-003)

分担研究報告書

献血制限に関わる昆虫学的研究：疾病媒介蚊の吸血時期と移動分散範囲に関する基礎研究

研究分担者 津田良夫 (国立感染症研究所・昆虫医科学部 室長)

上野動物園で 2009 年に採集されたアカイエカの吸血蚊を用いて、吸血源動物の同定を行った。131 個体のサンプルを分析し、DNA の塩基配列の類似性によって鳥類 17 種と哺乳類 5 種が吸血源となっていると推定された。これらの吸血源動物の中で飼育場所が特定できるものについて、飼育場所と吸血個体が採集された場所の距離を測定して、吸血後のアカイエカの移動分散距離を求めた。新鮮な血液を持った個体の平均移動分散距離は 30.6m および 66.7m で 40m 以内の個体が多かった。これに対して完成卵を持った個体は 350m を移動しており、血液を消化中の個体は 10m から 350m の範囲の様々な距離を移動していた。これらの結果から、アカイエカは吸血後数日間に少なくとも 350m を移動すると結論した。市街地の大規模公園で行ったアカイエカの吸血源動物の調査では、99% 以上の個体が野鳥を吸血していた。公園で採集されたアカイエカの吸血蚊が採集場所を中心とする半径 350m の範囲から移動してきたと仮定して推定飛来範囲を描いたところ、この公園の 89% が含まれることがわかり、この公園で得られたサンプルの吸血源動物同定結果と矛盾はなかった。

A. 研究目的

蚊は吸血と産卵を繰り返して一生を終わる。吸血に関連した行動と吸血後の潜伏・産卵行動はまったく別の生理的反応に基づいて行われている。したがって、吸血のために飛来する個体の移動分散と潜伏・産卵個体の移動分散を比較すると、移動場所や分散範囲が大きく異なると予想される。

蚊によって媒介される病原体の流行を想定し、感染の中心からどの程度の範囲を献血制限範囲とするかを決定するために重要な情報として、問題となる病原

体の媒介者である蚊が飛翔する範囲がある。

蚊の飛翔範囲の推定はほとんどの場合、吸血のために探索飛翔する個体を用いて行われている。しかし、吸血に成功した個体はその後の数日間に起こる卵巣の発育と産卵を無事に経過するために好適な場所に移動する。蚊媒介性病原体の感染拡大を考える場合、感染者から吸血して病原体を取り込んだ蚊がどの程度の範囲まで分散していくかという空間的な広がりが必要である。したがって、従来行われている吸血飛来個体の飛翔範囲だけで

なく、吸血に成功した個体の移動分散に関する情報も加味して、防除対策の実施範囲や献血制限範囲を決定するべきである。

アカイエカの吸血飛来範囲は記号放逐再捕獲実験によって、少なくとも 1.2km と推定されている。本研究は吸血した個体が、その後どの程度の範囲まで移動するかを目的として行った。

吸血した成虫の移動分散範囲を推定するために、吸血させた蚊を多数準備し、これを用いて記号放逐再捕獲実験を行うことが考えられる。しかし、この方法によると多数の産卵雌を放逐することになり、調査地域内の蚊の発生量の増加を導く可能性があり好ましくない。そこで、本研究では野外で既に吸血した個体を採集し、その個体が保持していた動物血液から DNA を抽出し、吸血源となった動物を推定して、その動物のいた場所と採集場所の距離を吸血した蚊の移動分散距離の推定に用いることを考えた。また、このような調査に適した調査地として、多種類の動物が飼育されている動物園を選んでサンプルを採取した。

## B.研究方法

分析に用いたサンプルは上野動物園で 2009 年に採集されたアカイエカの吸血蚊である。吸血蚊の腹部から抽出した DNA を抽出し、脊椎動物のミトコンドリア DNA16SrRNA 遺伝子 (16SrRNA) を標的とした PCR を行い、増幅産物の塩基配列を決定して GenBank に登録されている塩基配列データと比較した。動物園で飼育されており、吸血場所の特定が可能なケースについて、吸血個体の採集場所と吸血源となった飼育動物の飼育場所の距離を地図上で測定した。吸血したアカイエカの推定移

動分散範囲の妥当性を評価するために、東京都立林試の森公園で調査したアカイエカの吸血源動物の同定結果と推定移動範囲の関係を考察した。

## C.研究結果

アカイエカの吸血源動物と推定された動物のリストを表 1 に示した。分析に用いた 131 個体のうち 54 個体では DNA の増幅が見られず同定できなかった。DNA の塩基配列の類似性 (99%以上) によって種類が同定されたのは鳥類 17 種、哺乳類 5 種であった。これらの吸血源動物のうち飼育場所が 1 ヶ所に限られ移動距離が推定できたのは、9 ヶ所で飼育されている 15 種類であった。

吸血個体の推定移動距離の頻度分布を図 2 に示した。採集された吸血蚊は保持している血液の量と状態によって、Full-fed、Partial-fed、half-gravid、Gravid の 4 種類に分類した。Full-fed は新鮮な血液を満腹に吸った個体、Partial-fed は新鮮な血液を少しだけ吸った個体、half-gravid は血液を消化中で腹部が部分的に黒色を呈する個体、Gravid は完成卵を持つ個体で腹部白くて卵で膨らんでいる個体である。新鮮な血液を持った個体の平均移動分散距離は 30.6m および 66.7m で 40m 以内の個体が多い。これに対して完成卵を持った個体は 350m を移動しており、血液を消化中の個体は 10m から 350m まで移動距離は様々であった。

図 2 の結果から、吸血したアカイエカは卵を成熟させ産卵するまでの期間 (ふつう 3~4 日間) に、少なくとも 350m の距離を移動すると推定された。

東京都立林試の森公園の林床に群生するシャガなどの植物上で 2007 年に採集された蚊の種類と個体数を表 2 に示した。

アカイエカは合計 248 個体の吸血蚊が採集されている。これらの吸血蚊サンプルの吸血源動物を同定したところ、ハシブトガラス、シジュウカラなど 13 種類の野鳥から吸血しており、ヒトから吸血していた個体はわずか 1 個体だけであった。林試の森公園は 700m×250mの大きさがある。この公園の吸血蚊の採集場所を中心として、動物園の調査で推定された吸血個体の移動分散距離 350mを半径とする円を描いて図 3 に示した。公園の 89%はこの円内に含まれており、公園に生息する野鳥から吸血したアカイエカが、この採集場所に移動・潜伏することは可能であり、吸血源動物の 99%以上が野鳥であったという分析結果と矛盾しない。

#### D. 考察

アカイエカは吸血後 3~4 日で卵を成熟させ産卵する。この期間中にはまったく吸血せず、水分や糖分の補給を行う以外は潜伏に適した場所に留まっていると考えられている。しかしながら、図 2 の half gravid 個体のデータに示されているように、実際には卵巣を發育させながら、あちこちの潜伏場所を転々と動き回っていると思われる。完成卵を保持している Gravid 個体は 350m離れた場所から移動した個体しか得られていないが、これは技術的な制約のためと思われる。Gravid 個体の場合、動物血液はほとんど消化されているため、血液残渣から DNA が増幅される例は少ない。そのため、仮に近い距離から移動してきた Gravid 個体が採集されていたとしても、吸血源動物が同定できなかった可能性が高い。

林試の森公園で採集されたアカイエカ

の吸血蚊が採集場所を中心とする半径 350m の範囲から移動してきたという推測は、この公園で得られたサンプルの吸血源動物同定結果から考えて、妥当であると思われる。

過去に推定された吸血のために飛来するアカイエカの移動範囲 1.2km と本研究で推定された吸血後の移動距離 350m をどのように総合するかという問題については、今後の生態学的な検討を要する。これらの推定値を単純に合計した 1.55km という移動分散範囲は、もっとも単純な考えであり、献血制限範囲に関するひとつの科学的根拠となりうるだろう。

#### E. 結論

動物園で得られたアカイエカの吸血蚊を用いて吸血源動物を同定し、同定された吸血源動物の飼育場所と吸血蚊の採集場所の距離に基づいて、吸血後のアカイエカの移動分散距離を推定した。その結果アカイエカは吸血後産卵するまでの 3~4 日間に少なくとも、350m は移動すると推定された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他