

東海4県のパイロットスタディⅡ期のアンケート調査により、「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者の背景は、男性が73%、女性が27%と男性が多く、平均年齢35.1歳、67%が40歳未満の若い世代であり、献血回数は42%が初回献血であった。大多数の88%がブラジル出身であり、日本滞在年数は平均15年であることが明らかとなった。

また、幼少時の家の構造が土壁と回答した件数が3%、家族にシャーガス病と診断された者が1.5%と、シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。

東海4県の中南米出身献血者（カテゴリー1）の対象457名中 *T. cruzi* 抗体陽性者は1名のみであったこと、全国で中南米出身献血者（カテゴリー1）は2,149人/年であったこと、東海4県の他のカテゴリー（2・3）での疫学調査から陽性者は認められていないことから、全国で1年間に *T. cruzi* 抗体陽性となる献血者は5人以下と推計された。

一方、中南米滞在歴等を有する献血者の約3/4を占め、ほとんど日本人と考えられるカテゴリー3「中南米諸国に通算4週間以上滞在した」の滞在期間等の基準については、今後の調査、検討により見直しが必要であると考えられる。

E. 結論

1. WNV-NAT

TMA法のWNV-NAT試薬（Procleix® WNV Assay）とTaqMan PCR法のWNV-NAT試薬（TaqScreen® WNV assay）の感度試験を実施し、TMA法試薬の方が、TaqMan PCR法試薬と比べ高く安定した結果が得られたが、両者とも各社が示している感度とほぼ同等であり、十分な結果が得られた。国内感染発生時のWNV-NATを加えたNATスクリーニングの検査所要時間をシミュレートしたところ、WNV対象NAT検体が先行して検査できる場合は、通常検査に比べ40分程度の延長で対応できる事が確認できた。

2. シャーガス病の感染リスク

本研究の対象である東海4県の中南米出身献血者の中から1名の *T. cruzi* 抗体陽性者が認められた。中南米滞在歴等を有する献血者数から推計すると、全国で *T. cruzi* 抗体陽性となる献血者は5人以下/年と考えられた。

献血時のシャーガス病の安全対策として、平成24年10月15日から中南米滞在歴等のある献血者の血液は、輸血用血液として用いない製造制限を講じている日本では、輸血を介したシャーガス病の感染リスクはきわめて低いと考えられる。

<謝辞>

今回のWNV-NATの研究にWNV液を分与いただいたイタリア National Center for Immunobiologicals Research and Evaluation (CRIVIB) の Dr. Giulio Pisani と米国 CBER/FDA の Dr. Maria Rios に深謝いたします。

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

- 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

- 3) 百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、石野田正純、松本千恵子、内田茂治、日野学、高松純樹、田所憲治：東海4県の中南米からの定住者の献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査パイロットスタディと日本における中南米からの定住者の献血者数の推計について、第53回日本熱帯医学会大会、帯広、2012年
- 4) 古澤秀明、森安浩之、後藤康仁、増田久美子、馬場明美、沖学、山中烈次、平力造、百瀬俊也、河敬世：我が国におけるウエストナイルウイルス (WNV) 感染発生時の献血血液の検査、第37回日本血液事業学会総会、札幌、2013年
- 5) S. Momose, Y. Furui, M. Ishinoda, T. Takahashi, S. Igarashi, Y. Sayama, S. Miura, C. Matsumoto, S. Uchida, S. Hino, A. Onitsuka, T. Minamizawa, M. Hamaguchi, M. Okada, J. Takamatsu, M. Satake, M. Minami, K. Tadokoro : ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* TEST AND QUESTIONNAIRE SURVEY IN JAPAN FOR BLOOD DONORS NATIVE OF LATIN AMERICA, 24th Regional Congress of the ISBT, Kuala Lumpur, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1. 我が国におけるウエストナイルウイルス感染発生時の献血者への対応

感染媒体	流行地から帰国後4週間以内の渡航者	人 港湾又は空港近隣の労働者又は居住者	左記以外の人
感染源	海外	外来蚊又は輸入動物	国内
献血制限範囲	渡航者本人	感染が疑われた場所から半径数km以内及び接する市区町村の居住者	感染が確認された人の行動範囲+半径10数km以内及び接する市区町村の居住者
制限期間	感染確認後120日まで	蚊のいなくなる時期から4週後(11月頃を目安)まで	感染が確認された人が所在する地方ブロック単位
NATの実施	必要なし	必要なし	必要なし

感染媒体	港湾又は空港で採取された蚊	蚊 左記以外(日本に生息している蚊)
感染源	海外	国内
献血制限範囲	感染が確認された蚊の採取地の半径数km以内及び接する市区町村の居住者	感染が確認された蚊の採取地の半径10数km以内及び接する市区町村の居住者
制限期間	蚊のいなくなる時期から4週後(11月頃を目安)まで	蚊のいなくなる時期から4週後(11月頃を目安)まで
NATの実施	必要なし	感染が確認された蚊の採取地の都道府県単位

感染媒体	輸入鳥又は輸入動物	鳥又は動物 左記以外でペットとして飼育している鳥又は動物	国内に生息する野鳥又は野生動物
感染源	海外	国内	
献血制限範囲	感染が確認された輸入鳥等の採取地の半径数km以内及び接する市区町村の居住者	感染が確認されたペットの採取地の半径10数km以内及び接する市区町村の居住者	感染が確認された野鳥等の採取地の半径10数km以内及び接する市区町村の居住者
制限期間	蚊のいなくなる時期から4週後(11月頃を目安)まで	蚊のいなくなる時期から4週後(11月頃を目安)まで	蚊のいなくなる時期から4週後(11月頃を目安)まで
NATの実施	必要なし	必要なし	採取地の都道府県単位

平成17年度第1回薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会資料

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か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1年以上滞在しましたか。(国内)	はい/いいえ

図1. 問診票の改訂

**中南米地域出身の方、または
(ラテンアメリカ)
中南米地域に通算4週間以上
滞在された方々へ**


下記1～3のいずれかに該当する方は、
献血の受付時にご申告をお願いいたします。

*シャーガス病の安全対策のため、いただいた血液は、
血漿分画製剤用の原料血漿として利用させていただきます。

1. 中南米諸国で生まれた、又は育った。
2. 母親が、中南米諸国で生まれた、又は育った。
3. 上記1.に該当しない方で、中南米諸国に通算4週間以上滞在した。

《中南米地域対象国(地域)》

- ・アルゼンチン
- ・ウルグアイ
- ・エクアドル
- ・エルサルバドル
- ・ガイアナ
- ・グアテマラ
- ・コスタリカ
- ・コロンビア
- ・スリナム
- ・チリ
- ・ニカラガ
- ・パナマ
- ・パラグアイ
- ・ブラジル
- ・ペルー
- ・ベネズエラ
- ・ペルー
- ・ペルー
- ・ボリビア
- ・ホンジュラス
- ・メキシコ
- ・フランス領ギアナ
- ・フォークランド諸島(領土)



*シャーガス病とは、主に中南米地域の熱帯に分布する寄生性原生動物(原虫)に感染することから、感染が疑われる地域では、献血は献血者本人が献血した血液が20～30日間と長く検出されることがあり、従って、その地域の献血者(献血者)の献血を中止して、献血を再開するまで、献血を中止する必要があります。
この際、献血者本人が、献血した血液が20～30日間と長く検出されることがあり、従って、その地域の献血者(献血者)の献血を中止して、献血を再開するまで、献血を中止する必要があります。
詳しくはこちら [献血者サービス] [献血]

日本赤十字社
Nippon Red Cross Society

図2. 日本赤十字社のシャーガス病に対する安全対策(中南米出身者等への周知)

表2. WNV感度試験 (TaqMan PCR法)

日本赤十字社血液管理センター実施

回数	cps/mL	検査本数	WNV-USA				WNV-ITA			
			陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)	陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)
			1	100	6	6	0	0	100.0	6
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	5	1	0	83.3	4	2	0	66.7
	5	6	4	2	0	66.7	0	6	0	0.0
	1	6	1	5	0	16.7	0	6	0	0.0
	0.5	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
	0	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
2	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	4	2	0	66.7
	5	6	5	1	0	83.3	0	6	0	0.0
	1	6	0	6	0	0.0	1	5	0	16.7
	0.5	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
	0	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
3	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	3	3	0	50.0
	5	6	4	1	1	80.0	3	3	0	50.0
	1	6	1	4	1	20.0	0	6	0	0.0
	0.5	6	1	5	0	16.7	0	6	0	0.0
	0	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
4	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	4	2	0	66.7
	5	6	5	0	1	100.0	1	5	0	16.7
	1	6	3	3	0	50.0	0	6	0	0.0
	0.5	6	0	6	0	0.0	0	6	1	0.0
	0	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
合計	100	24	24	0	0	100.0	24	0	0	100.0
	50	24	24	0	0	100.0	24	0	0	100.0
	10	24	23	1	0	95.8	15	9	0	82.5
	5	24	18	4	2	61.9	4	20	0	16.7
	1	24	5	18	1	21.7	1	23	0	4.2
	0.5	24	1	23	0	4.2	0	23	1	0.0
	0	24	0	24	0	0.0	0	24	0	0.0

95%検出感度 (PROBIT分析): 11.0 copies/mL 33.4 copies/mL

95%検出感度 (ロシュ社社内資料): TaqScreen® WNV assay 23.0 copies/mL

表3. WNV感度試験 (TMA法)

日本赤十字社血液管理センター実施

回数	cps/mL	検査本数	TMA法 (WNV-USA)				TMA法 (WNV-ITA)			
			陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)	陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)
			1	100	6	6	0	0	100.0	6
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	5	6	6	0	0	100.0	3	3	0	50.0
	1	6	6	0	0	100.0	2	4	0	33.3
	0.5	6	3	3	0	50.0	0	6	0	0.0
	0	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
2	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	5	6	6	0	0	100.0	5	1	0	83.3
	1	6	6	0	0	100.0	3	3	0	50.0
	0.5	6	1	5	0	16.7	1	5	0	16.7
	0	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
3	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	5	6	6	0	0	100.0	4	2	0	66.7
	1	6	5	1	0	83.3	1	5	0	16.7
	0.5	6	5	1	0	83.3	0	6	0	0.0
	0	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
4	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	5	1	0	83.3
	5	6	6	0	0	100.0	4	2	0	66.7
	1	6	6	0	0	100.0	1	5	0	16.7
	0.5	6	6	0	0	100.0	0	6	0	0.0
	0	6	0	6	0	0.0	0	6	0	0.0
合計	100	24	24	0	0	100.0	24	0	0	100.0
	50	24	24	0	0	100.0	24	0	0	100.0
	10	24	24	0	0	100.0	23	1	0	95.8
	5	24	24	0	0	100.0	16	8	0	66.7
	1	24	23	1	0	95.8	7	17	0	29.2
	0.5	24	15	9	0	62.5	1	23	0	4.2
	0	24	0	24	0	0.0	0	24	0	0.0

95%検出感度 (PROBIT分析): 1.2 copies/mL 13.3 copies/mL

95%検出感度 (ノバルティス社参考資料): Procleix® WNV Assay 8.2 copies/mL

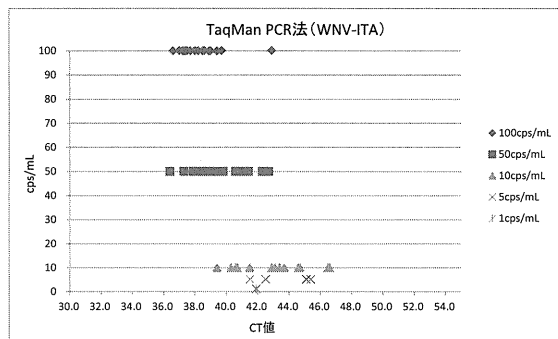
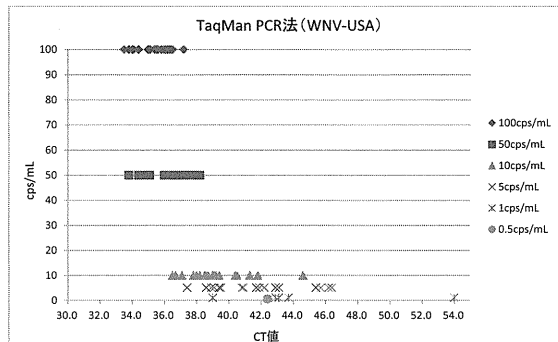


図3. WNV感度試験 (TaqMan PCR法) のCT値分布

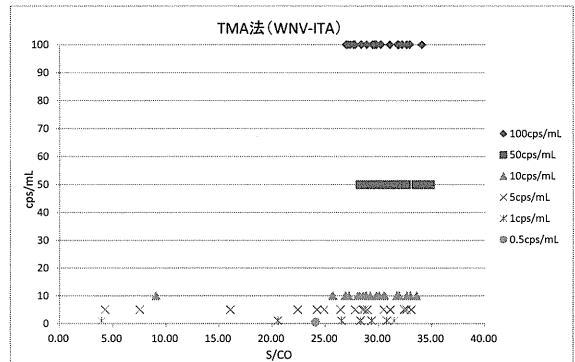
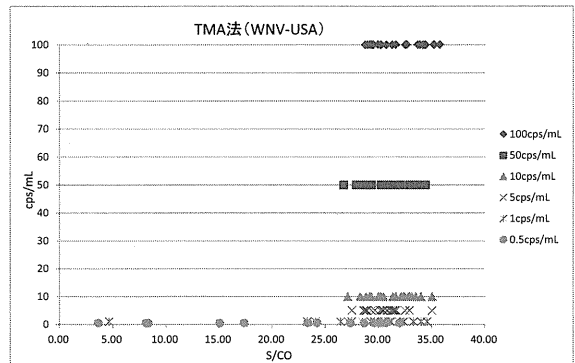


図4. WNV感度試験 (TMA法) のS/CO値分布

表4. WNV-USA低濃度域の検討

cps/mL	検査本数	TaqMan PCR法 (WNV-USA)				TMA法 (WNV-USA)			
		陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)	陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)
1	8	4	4	0	50.0	8	0	0	100.0
0.5	8	1	6	1	14.3	5	3	0	62.5
0.1	8	1	7	0	12.5	2	6	0	25.0
0.05	8	0	8	0	0.0	2	6	0	25.0
0	8	0	8	0	0.0	0	8	0	0.0

表5. WNV及びJEV 特異性・交差反応性試験

WNV 特異性試験 (NY99株)

TaqMan PCR法						TMA法					
濃度 (cps/mL)	検査本数	陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)	濃度 (cps/mL)	検査本数	陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)
300	6	6	0	0	100	300	6	6	0	0	100
100	6	6	0	0	100	100	6	6	0	0	100
30	6	5	1	0	83.3	30	6	6	0	0	100
10	6	2	4	0	33.3	10	6	6	0	0	100
1	6	0	6	0	0	1	6	6	0	0	100
0.1	6	0	6	0	0	0.1	6	1	5	0	16.7

JEV (Beijing-1株) 交差反応性試験

TaqMan PCR法						TMA法					
濃度 (PFU/mL)	検査本数	陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)	濃度 (PFU/mL)	検査本数	陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)
1000	6	6	0	0	100	1000	6	6	0	0	100
500	6	6	0	0	100	500	6	5	1	0	83.3
100	6	6	0	0	100	100	6	2	4	0	33.3
50	6	6	0	0	100	50	6	1	5	0	16.7
10	6	6	0	0	100	10	6	0	6	0	0

<シミュレーション実施方法>

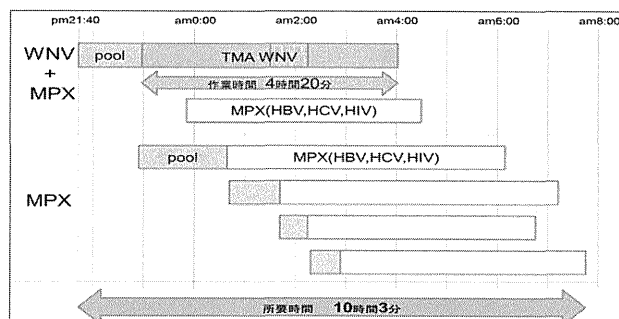
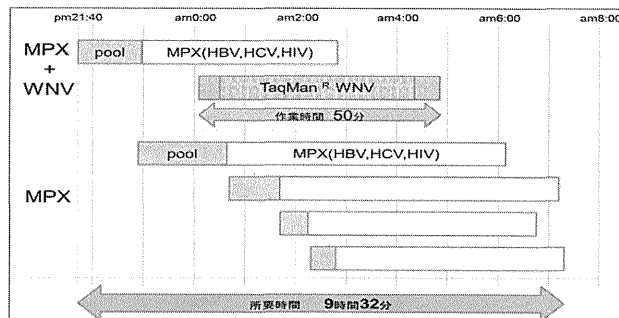
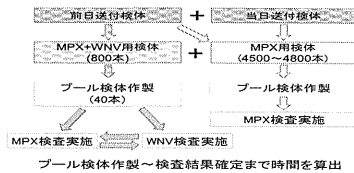


図5. 実検体を用いた検査シミュレーション

表6. 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

表7. 中南米渡航歴・居住歴のある
献血申込者数・献血者数

H22年度	申込者数	献血者数
渡航歴	42,075 (3,506/月)	35,988 (2,999/月)
居住歴	12,123 (1,010/月)	10,190 (849/月)
合計	54,198 (4,517/月)	46,178 (3,848/月)

H22年度
全体数 6,391,003 5,329,676

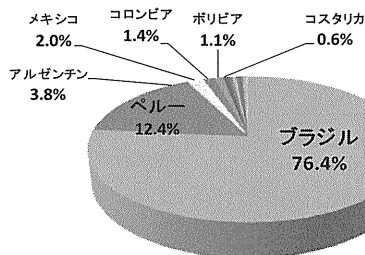


図6. 中南米居住歴のある国別外国人献血者割合

表8. 中南米居住歴のある国別献血者数
(日本人・外国人別)

H22年度 国名	中南米居住歴のある 献血者数		
	日本人	外国人	合計
アルゼンチン	637	64	701
ウルグアイ	57	1	58
エクアドル	139	3	142
エルサルバドル	71	2	73
ガイアナ	0	0	0
グアテマラ	130	6	136
コスタリカ	160	11	171
コロンビア	172	23	195
スリナム	4	0	4
チリ	329	6	335
ニカラグア	112	1	113
パナマ	238	4	242
パラグアイ	322	8	330
ブラジル	2,991	1,299	4,290
ベネズエラ	156	7	163
ベリーズ	11	2	13
ペルー	526	211	737
ボリビア	267	18	285
ホンジュラス	1	0	1
メキシコ	2,167	34	2,201
仏領ギアナ	0	0	0
合計	8,490	1,700	10,190

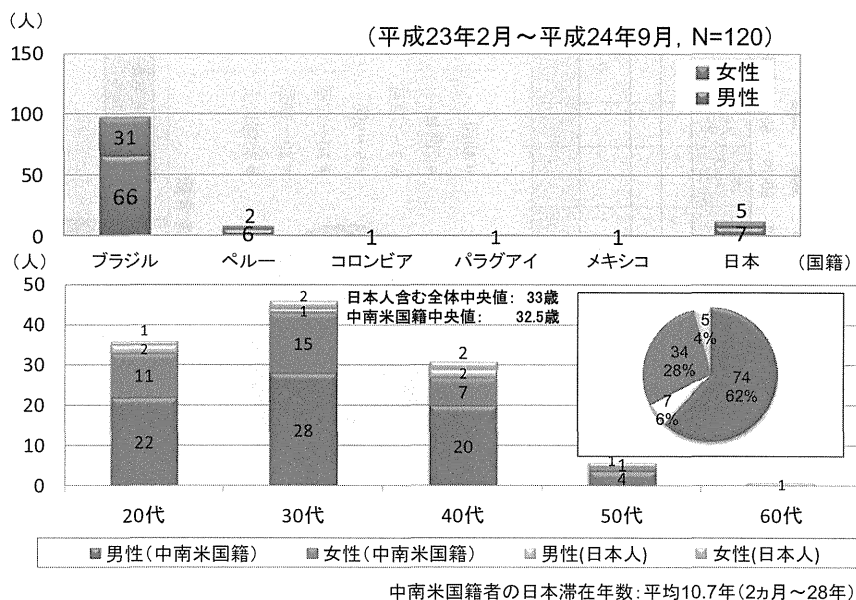


図7. 東海4県パイロットスタディ I 期対象者の背景

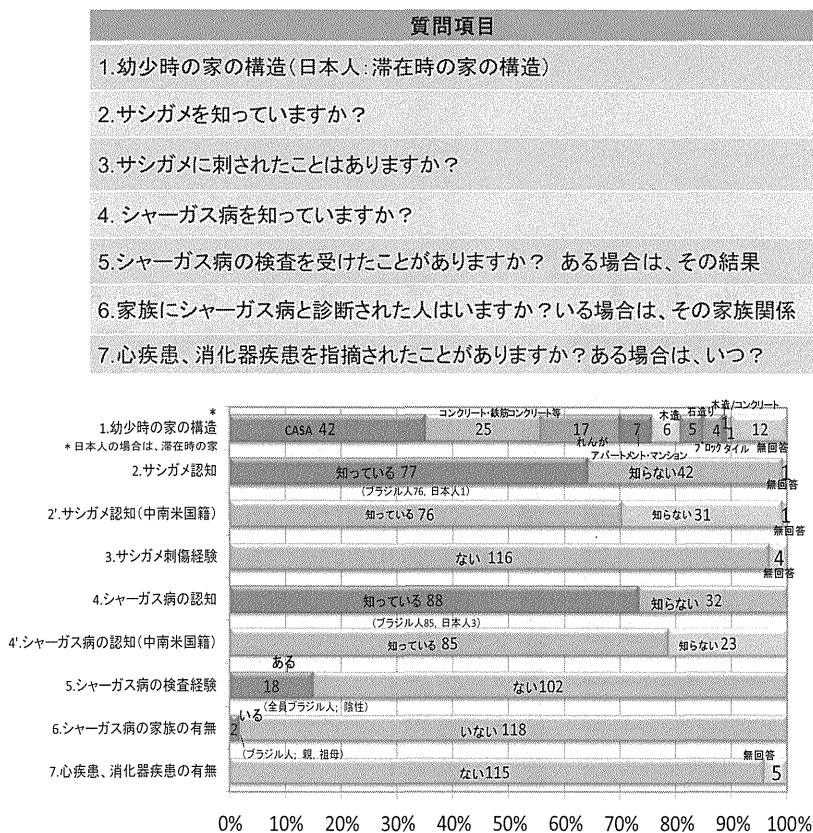
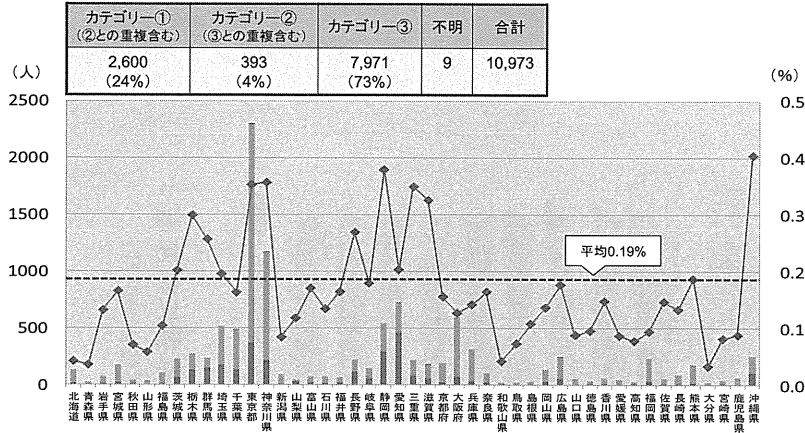


図8. 東海4県パイロットスタディ I 期対象者に対するアンケート調査結果(平成23年2月～平成24年9月)

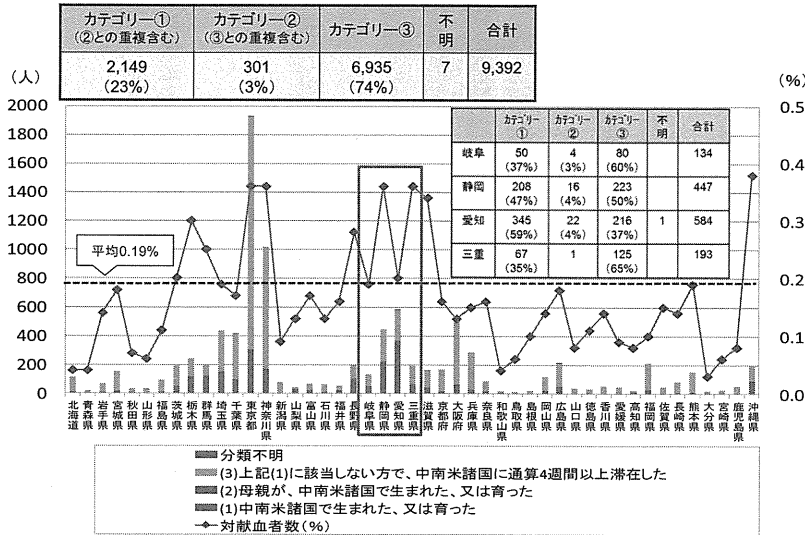
＜都道府県別中南米滞在歴等を有する受付者数＞

平成24年10月15日～平成25年10月14日(1年間)

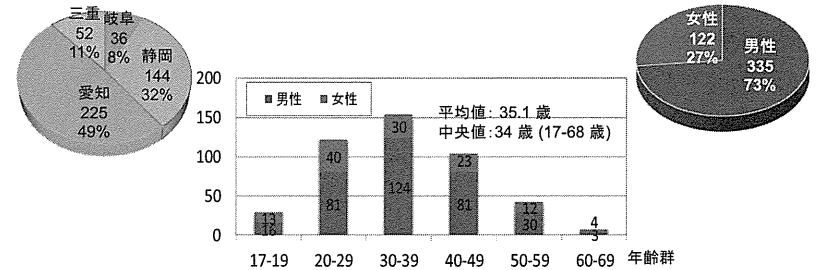


＜都道府県別中南米滞在歴等を有する献血者数＞

平成24年10月15日～平成25年10月14日(1年間)



カテゴリー①対象者: 457名



国籍	ブラジル	ペルー	アルゼンチン	ボリビア	エクアドル	コロンビア	チリ	パラグアイ	ホンジュラス	メキシコ	コスタリカ	日本	不明	合計
男	271	25	2	4	1	3	2	0	0	1	0	16	10	335
女	109	2	2	0	0	1	0	1	1	0	0	4	2	122
合計	380	27	4	4	1	4	2	1	1	1	0	20	12	457
出身国	401 (88%)	32 (7%)	4	4	1	5	3	1	2	1	1	複数国 2		457

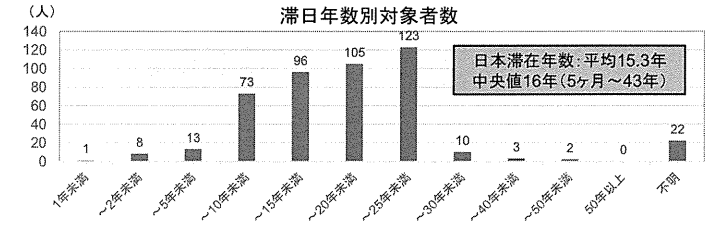
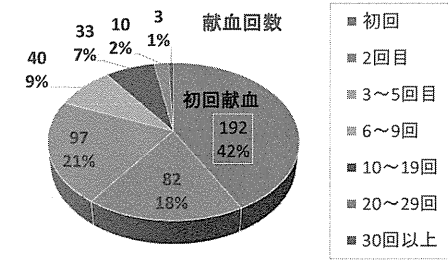


図9. 中南米滞在歴等を有する受付者数・献血者数

図10. 東海4県パイロットスタディⅡ期の実施状 (平成25年1月8日～11月30日)

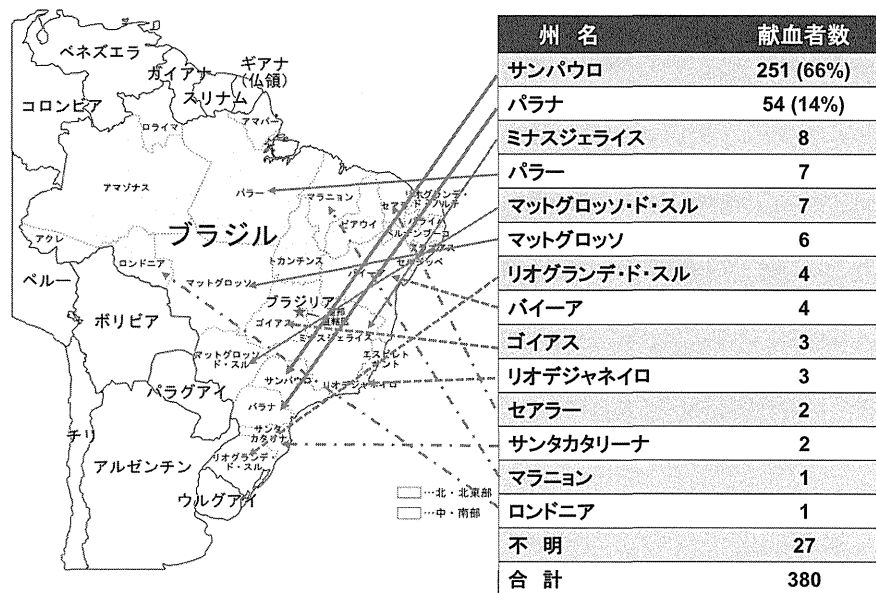


図11.ブラジル国籍献血者の出身州の分布(平成25年1月8日～11月30日)

質問項目
1. 幼少時の家の構造(日本人:滞在時の家の構造)
2. サシガメを知っていますか?
3. サシガメに刺されたことはありますか?
4. シャーガス病を知っていますか?
5. シャーガス病の検査を受けたことがありますか? ある場合は、その結果
6. 家族にシャーガス病と診断された人はいますか? いる場合は、その家族関係
7. 心疾患、消化器疾患を指摘されたことがありますか? ある場合は、いつ?

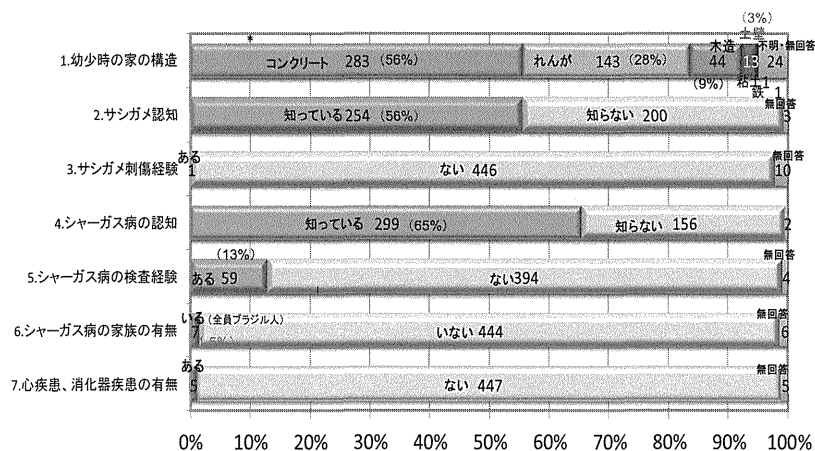


図12. 東海4県パイロットスタディⅡ期対象者のアンケート調査結果(平成25年1月8日～11月30日)

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 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。本研究は3年間にわたり、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) 法および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) の開発について、実験モデルの系を用いて検討を行った。その結果、設計した LAMP プライマーは、*B. microti* ribosomal DNA 遺伝子を特異的に増幅し、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。一方、大腸菌により発現させた組換え BMN1-17 蛋白質を用いた ICT は、*B. microti* に対する高い特異性を示した。ハムスターを用いた感染実験では、赤血球寄生率が検出されるほぼ同時期に ICT により抗体の検出が可能であった。また、神戸の人感染血液を用いた LAMP 法および ICT においても、標的遺伝子の増幅並びに抗体検出が可能であった。以上の結果を基盤にして今後、国内ばかりでなく海外の流行地で得られた人の試料を用いてこれらの遺伝子および血清診断法の実用性を検討する必要がある。

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を目的とした。主として実験動物モデル系を用いて、簡易・迅速遺伝子診断法として最近開発された LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) について、実

験モデルの系を用いて検討を行った。また、日本で最初に認められ、*B. microti* 感染者の試料を用いて、人患者への有用性について検討した。

B. 研究方法

(1) LAMP の開発

B. microti 18s ribosomal DNA (rDNA) の遺伝子情報を基に、LAMP用のプライマー4種類 (FIP、BIP、F3、及びB3) を設計し、遺伝子増幅の条件検討を行った。また、*B. microti*、*Anaplasma*、*Ehrlichia*、及び *Plasmodium falciparum* の DNA サンプルを用いて、LAMPの特異性ならびに感度についても検討を行った。

(2) 実験感染マウスを用いた LAMP の評価

B. microti をマウスに感染させ、経時的に血液を採取し、Real-time LAMP を標的遺伝子の定量解析を行った。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。

(3) ICT の開発

B. microti に特異的な BMN1-17 の組換え蛋白質を大腸菌に発現させ、SDS-PAGE および ウェスタンブロットを行い、組換え蛋白質の分子量と抗原性について検討を行った。次に異なる蛋白質濃度 (10~1,000 mg/ml) および pH (5.0~7.0) の条件検討を行い、rBMN1-17 抗原と金コロイド (50nm) への最適な標識条件の検討を行った。次に、得られた金コロイド標識 rBMN1-17 蛋白質をサンプルパットに、rBMN1-17 蛋白質と抗ウサギ BMN1-17 蛋白質 IgG をニトロセルロース膜へジェット塗布し ICT ストリップを作製した。更に、ハムスターの陽性、陰性コントロール、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いて得られた ICT ストリップの特異性について検討を行った。

(4) 実験感染ハムスターを用いた ICT の評価

ハムスターを用いて *B. microti* 感染実験を行い、継時的に血液試料を採取した。血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の算定、IFAT、rBMN1-17 を用いた ELISA 及び ICT の検出感度を比較した。また、ヒトバベシア患者の血液を用いて、rBMN1-17 蛋白質を用いた ICT により患者血清の抗体検出について検討した。

(5) ヒト血液試料

神戸医療大学薬学部より日本で最初の人バベシア患者、献血者、その他 111 検体のヒト血液の提供を受けた。これらの試料は、インフォームドコンセントを実行して採血されている。

また、エール大学より、60 検体の人血清の提供を受けた。これらの血清は、インフォームドコンセントを実行して得られている。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、帯広畜産大学実験動物委員会の承認を得て実施した。また、人の血液材料を用いた実験については、帯広畜産大学、神戸医療大学、エール大学の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) LAMP 法の特異性と感度の検討

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、63 度で 90 分の反応条件で LAMP 法を実施したところ、スミア状の陽性増幅が認められた。また、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ていることが確認された。さらに、マダニに媒介される可能性が考えられる *Anaplasma*, *Ehrlichia* や形態的にバベシアに類似性が認められる *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、特異性が高いことが示された。

精製 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 倍高い感度を示した。

(2) 実験感染マウスの試料を用いた real-time LAMP 法の評価

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ところ、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* 感染マウスでは、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 日以降も real-time LAMP 法により感染の検出が可能であった。

(3) *Babesia microti* BMN1-17 組換え蛋白質を用いた ICT) ストリップの作製

B. microti BMN1-17 抗原を ST 融合蛋白質として大腸菌に発現させた。この蛋白質は可溶性で、SDS-PAGE により、約 75kDa の GST 融合蛋白質として認められ、GST を除いた分子量は約 50kDa と推定された。また、rBMN1-17 蛋白質を用いてウェスタンブロットを行ったところ、約 50kDa に主要バンドが確認され、GST 蛋白質にはバンドが認められなかった。

次に、組換え抗原を用いて金コロイド標識の条件について検討した結果、組換え BMN1-17 蛋白質の濃度が 200mg/ml、pH 5.0 で金コロイド標識が最良であった。得られた

金コロイド標識 rBMN1-17 蛋白質、BMN1-17 蛋白質と抗ウサギ BMN1-17 蛋白質 IgG を用いて、ICT ストリップを作製し、特異性について検討を行った。その結果、ハムスターの陽性血清、陰性血清、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いて検討を行ったが、陽性コントロールにのみバンドが確認され、他のサンプルでは陽性ラインは認められなかった。

(4) 実験感染ハムスターの試料を用いた ICT の評価

ハムスターに *B. microti* を感染実験させ、継時的に血液を採取して、血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の測定、IFAT、rBMN1-17 を用いた ELISA 及び ICT の抗体検出感度を比較した。赤血球寄生率は、実験感染後 5 日目に 1% を越えて急激に増加し、約 2 週間後にピークを迎えた後、8 週後に 1% 以下に減少した。ELISA では、5 日目から抗体が検出され始め、1 週間ほどで急激に上昇してその後高い値を維持した。一方、ICT と IFAT では 7 日後から検出され始め、その後抗体が継続的に検出された。

(5) ヒト検体を用いた診断法の検討

マウスおよびハムスターで高い特異性と感度が認められた、LAMP と ICT について、日本で初めて認められた人バベシア患者、献血者の検体を用いてその有用性について検討した。LAMP では、バベシア患者と感染源と考えられる献血者の DNA から、標的遺伝子の増幅が認められた。また、ICT でも、患者血清および感染源とされる献血者血清で陽性バンドが認められた。

さらに、111 例の人血液より得られた DNA を用いて LAMP を実施した。その結果、IFA で抗体陽性を示した 61 検体中、LAMP で陽性を示した検体は 5 検体のみであった。また、抗体陰性が確認されている 50 検体中 1 例で LAMP 陽性反応が確認された。しかし、*B. microti* の神戸株、ミュンヘン株、グレイ株の DNA でも遺伝子の増幅が認められた。

また、ICT の人血清の有用性について検討するため、アメリカのエール大学より 60 例の人患者の血清の提供を受けた。今後、これらの血清を用いて ICT の人への応用の可能性について検討する予定である。

D. 考察

本研究では、輸血による感染が懸念される人バベシア症に対する迅速で正確な血清及び遺伝子診断法の開発を目的とした。迅速で PCR よりも簡便な遺伝子増幅法である 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 種類のプライマーを用いた LAMP 法は、*B. microti* の遺伝子のみを増幅し、ダニによって媒介される *Anaplasma*, *Ehrlichia*、形態や臨床症状が類似しているマラリア原虫の遺伝子を増幅せず、高い特異性を有することが明らかにされた。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、増幅遺伝子の塩基配列の確認も可能であった。更に、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、熱処理した血液上清を用いても遺伝子増幅が認められ、DNA 抽出の簡易化も可能であった。*B. microti* 感染マウスを用いた実験では、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、*B. microti* の 18s rDNA 遺伝子の増幅が認められた。

ICT は、ニトロセルロースなどの毛細管現象を利用した免疫学的測定法の 1 つである。微小金属粒子やラテックス粒子などを標識体として用い、検出対象が存在すると、多孔質体上に設けられた判定部位に標識体が捕捉されることで判定部位が発色し、検出対象の存在が確認できる。この方法は、血清試料などを滴下するだけで操作が簡便であり、判定時間も約 15 分と短い。また判定は目視で可能であり、コスト面からも利点がある。

本研究では、血液中の *B. microti* 抗体の検出をする迅速血清診断法として ICT の開発を試みた。最初に、*B. microti* の遺伝子を大腸菌に組み込み、約 50kDa の可溶性 BMN1-17 蛋白質として発現させた。この組換え抗原を用い

て作製したICTストリップは、*B. microti*のハムスター感染血清にだけ陽性バンド認められ、ダニに媒介されるアナプラズマやエールリキアの感染血清ではバンドは認められず、*B. microti*に対する高い特異性が認められた。また、ハムスター感染モデル実験では、感染後5日に赤血球内に*B. microti*に認められ、ELISAによっても抗体が検出された。ICTでは、やや遅れてIFATと同様感染後7日後に抗体が検出された。一般的にICTはELISAと同程度の検出感度を有するとされている。しかしながら、本研究ではICTによる抗体検出がELISAよりも若干遅れたことから、更にICTの検出感度を上げる改善が必要である。

以上の実験動物モデルでの結果に基づき、日本で初めて感染が確認され人試料を用いて、real-time LAMP法およびICTを実施した。その結果、LAMP法により*B. microti*に特異的なバンドパターンが得られた。また、ICTにより、*B. microti*重症感染発症患者および不顕性の血液ドナーの血清中から抗体が検出された。更に、100例以上のヒトDNAサンプルを用いて、LAMP法を実施した。しかしながら、61例の抗体陽性者のDNAサンプルを用いたLAMP法で、5例より陽性反応が認められなかった。しかし、3株の*B. microti*から抽出されたDNAを陽性対照として用いたところ、3種の株で遺伝子増幅が認められた。これら神戸株、ミュンヘン株、グレイ株はそれぞれ日本、ドイツ、アメリカから分離されたものであり、地理的に非常に隔だっているにも関わらず遺伝子増幅が認められたことは、本LAMP法が世界的な*B. microti*の検出に使用可能であると示唆される。また、アメリカの流行地で採取された人血清を用いて、ICTの有用性の検討は今回期限内に実施できなかった。しかしながら、ICTの作製に使用されたBMN17遺伝子情報はミュンヘン株から得られており、世界的に非常に良く保存されている。このミュンヘン株の遺伝子情報に基づいて作製され組換え蛋白質を用いたICTにより、地理的および遺伝的に遠い神戸の患者血清で抗体を検出できたことから、本ICTの実用化の可能性は高いと考えられる。今後、更により多くの人血清数を用いて、これらの遺伝子ならびに血清診断法のその有用性について検討する必要がある。

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法および組換えBMN1-17蛋白質を用いたイムノクロマト(ICT)法が確立された。LAMP法は、PCR法より高い感度を示し、日本初の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。また、ICTによりハムスター実験感染モデルにおいて、IFATやELISAとほぼ同様の感度が示された。更に、*B. microti*発症患者と血液ドナーの血清中からも抗体が認められた。LAMP法とICTは国際的に応用できる可能性を有しており、今後その実用化に向けて、多数の人血液試料を用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

1. Iseki H., Alhassan A., Kim C., Saito-Ito A., Inokuma H., Kawazu S., Masuzawa T., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Babesia microti* Infection. (準備中)
2. Iseki H., Kim C., Ishizaki T., Saito-Ito A., Minoda Y., Inokuma H., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of an immunochromatographic test for convenient serodiagnosis of human babesiosis. (準備中).

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)分担研究報告書

献血制限に関わる昆虫学的研究：疾病媒介蚊の移動分散に関する基礎研究

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)

献血制限に関わるヒトスジシマカとアカイエカの分散範囲を推定した。東京都内の公園で6月から11月の期間にヒトスジシマカを採集し、実験室内における平均余命を求めたところ、最も短かったのは9月の採集雌で13.8日、最も余命が長かったのは、6月の採集蚊で平均40.8日だった。林に生息するヒトスジシマカを対象として行われたマーキング実験結果から、1日当たり移動距離を推定し、平均移動距離は、 10.1 ± 10.6 m、最長移動距離は44mであった。成虫に与えるダメージが小さい個体識別マーキング法を考案し、石垣島の住宅街でヒトスジシマカを対象としてマーキング実験を実施した。個体識別マークを行って放逐した個体数は、232個体で、再捕獲されたのは43個体、再捕獲率は0.21であった。放逐された個体が再捕獲された48例について、再捕獲するまでに要した日数を求めたところ、最長8日、最短1日で、平均は 2.5 ± 1.7 日であった。再捕獲された48例のうち、放逐された場所とは異なる場所で再捕獲された例について個体別に1日当たりの平均移動距離を求めたところ 35 ± 22 mで、観察された1日の最長移動距離は92mであった。献血制限に関わるヒトスジシマカの“最大”分散範囲を、野外調査により得られた成虫の最長余命40.8日と1日当たり最大移動距離92mの積によって、3,753.6mと推定した。

上野動物園で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。過去の研究でアカイエカが吸血源動物の探索のために動き回る範囲の推定値として得られた1.2kmと、本研究で得られた吸血後の移動距離を加算した1.55kmは、献血制限範囲に関するひとつの科学的根拠を与えられる。

A.研究目的

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。本研究は我国における重要な2種の疾病媒介蚊、アカイエカとヒトスジシマカを取り上げて、成虫の移動分散範囲に関する基礎的な情報を得ることを目的として実施された。

ヒトスジシマカは、デング熱やチクングニヤ熱など熱帯・亜熱帯地方で大流行を繰り返し、近年温帯地方でも流行が確認されている蚊媒介性疾患の重要な媒介蚊である。ヒトスジシマカが一生涯の間に動き回る範囲は、この蚊によって媒介される病気が流行した際にその拡大速度や拡大範囲を知る上で最も基本的かつ重要な情報である。疾病媒介蚊の分散範囲の推定には、従来マークを付けた蚊を放逐してその後の分散過程を追跡するマーキング法が用いられてきた。ヒトスジシマカ成虫の分布に関してこれまで行われた研究では、成虫の分散行動が住宅街周辺の並木や住宅の庭木、公園や緑地などの植生と密接に関係していることが示されている。そのため、成虫の移動分散は一方方向的に起こるのではなく、潜伏に適した茂みの間を転々として行き来するような短距離の動きを繰り返して起こっていると考えられる。このような動きの研究には、個体識別マーキングによって、同一個体の動きを追跡する手法が最も有効であるとされている。

本研究ではヒトスジシマカの個体識別マーキング実験を行うとともに、野外で採集された成虫の余命を実験室で調査した。こ

れらの実験によって得られた結果に基づき、本種の分散範囲の推定を行った。

アカイエカは特にウエストナイルウイルスの潜在的な媒介蚊として医学的に重要な種類である。本種の移動分散範囲は蛍光塗料でマークした多数の個体を放逐することによって調べられており、少なくとも1.2kmは移動することが明らかにされている。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おり、アカイエカに関する移動分散範囲の推定も未吸血の成虫を使って行われている。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も重要である。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べきである。本研究は吸血したアカイエカが、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。

B.研究方法

ヒトスジシマカの移動分散範囲の推定：成虫の寿命と1日当たりの移動距離をマーキング実験によって求め、その積によって分散範囲の推定を行った。

吸血飛来成虫の平均余命：東京都立林試の森公園で6月から11月の期間にヒトスジシマカの人囀採集を行った。採集されたヒトスジシマカの雌成虫を持ち帰り $26.5 \pm 0.1^{\circ} \text{C}$ 、相対湿度 $58 \pm 0.9\%$ 、16時間日長に

調節した飼育室で飼育し、すべての個体が死亡するまで死亡日と死亡個体数を毎日記録した。この調査結果に基づいて、野外捕集蚊の実験室内における平均余命を求めた。

マーキング実験による移動距離の測定：ヒトスジシマカが1日の間に動き回る範囲を知るために、1個体ずつ異なるマークを付けて放逐し、複数の採集場所で再捕獲を継続して行って、個体ごとに動いた軌跡を調べた。個別マークは、左右の翅それぞれに3か所、合計6ヶ所に、マジックペンで印をつけて行った。2012年7月24日から8月2日に感染研の構内とその周辺で合計199頭のヒトスジシマカを採集しマークして放逐したが、再捕獲された個体数がわずかに3頭と少なく、分析できるデータが得られなかった。そのため、同様の方法によって1990年に長崎市の市街地に隣接した林内で実施した調査結果から、44個体の再捕獲データを取り出して分析を行った。

胸部への個体識別マーキング法の検討：翅にマークを行うことによるダメージが大きいと考え、ダメージが小さく抑えられる方法として胸部背面にマークする方法を検討した。予め氷の塊の上に濾紙を乗せ、低温で湿った状態にしておき、この上にクロロフォルムで軽く麻酔した蚊を乗せた。胸部背面5ヶ所に塗料でマークを付けた。塗料には、修正液として市販されている水性ミスノンを適当な濃度に希釈して用いた。また、3種類の食品用色素（赤、青、黄色）を少量混ぜて、3種類の異なる塗料を作った。合計4色の塗料と5ヶ所のマーク箇所の組み合わせによって、 $5^5-1=3124$ 個体を区別できる。

野外における個体識別マーキング調査：

2013年3月17日から3月27日の期間、石垣島の住宅街でマーキング実験を行った。実験地として住宅や商店、公共のビル、2つの緑地がある約230m×250mの区画を設定し、その中に4ヶ所の採集場所を選んだ。採集場所Aは、調査のために滞在した民宿の庭先である。採集場所BとCは民宿の東にある大きな緑地で、Bは緑地の入り口付近、Cは緑地の奥に位置している。採集場所Dは大きな緑地から南東に約92m離れた小規模の緑地の入口である。

蚊の採集は毎日8:00と14:00の2回行った。各採集場所に採集者一人が10分間とどまり、吸血のために飛来する蚊を吸虫管で採集した。採集された蚊は、場所ごとに紙コップに入れて持ち帰った。カップから蚊を1個体ずつ吸虫管で取り出し、マークの有無をチェックした。マーク虫はマークを確認し、採集された場所を記録して紙コップに戻し、その日のうちに採集された場所から放した。無マーク虫には識別マークをつけて、その日のうちに採集された場所から放逐した。マーキングは初めの7日間継続して行い、その後の3日間は捕獲だけを行った。

アカイエカの吸血個体の移動分散に関する研究：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。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。

C. 研究結果

ヒトスジシマカの移動分散範囲の推定：

野外で採集されたヒトスジシマカの飼育室における平均余命には、調査した月によって大きな変動がみられた。最も短かったのは 9 月の採集雌で 13.8 日、最も余命が長かったのは、6 月の採集蚊で平均 40.8 日だった。

長崎市の林で行ったマーキング実験では、合計 856 雌に個別のマークをつけて、林の中に放逐した。林内の 10 か所で再捕獲と再放逐を 15 日間繰り返した。放逐後に、2 回再捕獲された個体のデータが 44 組えられた。各個体について再捕獲された 2 ケ所の採集場所の直線距離を移動距離として、1 日の平均移動距離を推定した。その結果、1 日当たりの平均移動距離は、 10.1 ± 10.6 m、最大移動距離は 44 m であった。

石垣島の住宅街では調査期間中にヒトスジシマカ 309 個体が採集された。このうち個体識別マークを行って放逐した個体数は、232 個体で、再捕獲されたのは 43 個体（うち 5 個体は 2 回再捕獲）、再捕獲率は 0.21 (48/232) であった。

採集場所ごとに再捕獲率を求めて表 1 に示した。採集場所 B の再捕獲率は 0.4 で、ほかの採集場所の再捕獲率よりも有意に高かった。

4 ケ所の採集場所間についてマーク虫の

動きを表 2 にまとめて示した。同一行に示された値は、例えば採集場所 A の場合、採集場所 A から放逐された個体のうち 3, 2, 3, 0 個体が採集場所 A, B, C, D で再捕獲されたことを示している。つまり、採集場所 A で放逐された 8 個体のうち同じ場所 A で再捕獲された個体は 3 個体 (37%) である。採集場所 B と D の場合も採集場所 A と同様に、放逐された場所に留まりそこで再捕獲された個体の割合は低く、それぞれ 30, 25% であった。これに対して採集場所 C では、放逐された 26 個体のうち放逐場所に留まりその場所で再捕獲された個体の割合は 88% と非常に高かった。

表 2 の同一欄に示された値は、採集場所 A を例にすれば、採集場所 A で再捕獲された 3, 0, 1, 1 個体がそれぞれ、採集場所 A, B, C, D から放逐された個体であったことを示している。この結果は、採集場所 C, D から採集場所 A へ移動してきた個体がいることを示しているが、その頻度は低かったことを意味している。採集場所 B と D へ移動してきた個体の数は表の第 2, 4 欄に示されているように少なく 1 あるいは 2 個体に過ぎなかった。これに対して、採集場所 C は本研究で再捕獲された 48 個体のうち 35 個体が再捕獲された場所であり、このうち 34% に相当する 12 個体は他の場所から C へ移動してきたことがわかった。特に、表 1 で放逐された個体の再捕獲率が最も高かった採集場所 B の場合、この場所から放逐された 10 個体のうち 7 個体は採集場所 C で再捕獲されていたことがわかった。

放逐された個体が再捕獲された 48 例について、再捕獲するまでに要した日数を求めたところ、最長 8 日、最短 1 日で、平均

は 2.5 ± 1.7 日であった (表 3)。再捕獲された 48 例のうち同じ場所で再捕獲された例は 31 例だった。これらを除外して、放逐された場所とは異なる場所で再捕獲された例について分析したところ、再捕獲までに要した日数は 2.8 ± 1.8 日、再捕獲された場所までの距離は平均 69 ± 22 m であった。また、各個体について 1 日当たりの移動距離を計算して、17 例について平均移動距離を求めたところ、 35 ± 22 m であった。また、観察された 1 日の最長移動距離は 92m であった。

本研究で観察された最長余命 40.8 日と 1 日当たり最長移動距離 92m の積として、“最大”分散範囲を推定すると、 $40.8 \times 92 = 3,753.6$ m であった。

アカイエカ吸血個体の移動距離の推定：

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 4 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。

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 40

m 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。

これらの結果から、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。

D. 考察

ヒトスジシマカの動きが生息場所の植生に強く影響されていることは多くの研究で報告されている。我が国の場合、都市域であっても緑地や公園が散在し、これらがヒトスジシマカの潜伏場所を提供している。したがって、都市域であってもヒトスジシマカの分散範囲を推定するとき、緑地や茂みの空間分布を考慮することが大切である。

本研究で示されたように、ヒトスジシマカは好適な茂みへ移動して、そこに留まる傾向がある。長崎市の林の内部で行われたマーキング実験で求められた 1 日の移動距離は平均 10.1 ± 10.6 m、最長 44m であった。これに対して、石垣島の住宅街の場合、1 日の平均移動距離は 35 ± 22 m、観察された 1 日の最長移動距離は 92m であった。これらの結果は、ヒトスジシマカが好適な林の中に留まる傾向があるため、1 日の移動距離は林の中では短く、緑地が点在するような住宅街では長くなることをはっきり示している。

ヒトスジシマカの分散範囲は好適な茂みがあれば狭くなり、好適な茂みがなければ広くなると予想される。分散範囲を 1 日の移動距離によって推定する場合、もうひとつの重要なパラメーターは、成虫の寿命である。本研究の調査では、吸血のために飛来

する成虫の平均余命は、最短 13.8 日、最長 40.8 日であることが示された。

献血制限に関わるヒトスジシマカの移動分散範囲の推定は、通常行われる平均値に基づく推定ではなく、いわゆる過大推定である方が適切である。したがって、本研究で観察された最長余命 40.8 日と 1 日当たり最大移動距離 92m を掛け合わせて得られた、3,753.6m を“最大”分散範囲とするのが妥当だろう。

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きた。しかしながら、本研究の結果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なかったが、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。

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

献血制限に関わるヒトスジシマカの“最大”分散範囲を、野外調査により得られた成虫の最長余命 40.8 日と 1 日当たり最大移動距離 92m の積によって、3,753.6m と推定した。

吸血後のアカイエカの移動分散距離が少なくとも 350m と推定された。吸血源動物の探索のために動き回る範囲の推定値 1.2km と吸血後の移動距離を加算した 1.55km という値は、献血制限範囲に関するひとつの科学的根拠を与えると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda, Y. and Kim, K.S. 2012. Ecology of mosquitoes inhabiting a park in urban Tokyo, Japan: density of biting *Aedes albopictus* and laboratory estimation of the residual longevity. *Medical Entomology and Zoology* 63: 223-230.

2. 学会発表

津田良夫. ヤブカの個体識別マーキング法の検討：石垣島におけるヒトスジシマカとオオクロヤブカを用いた実験. 第 65 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2013 年 10 月 25 日, 川口市.

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

なし

表 1. マーク放逐されたヒトスジシマカの放逐場所による再捕獲率の違い

採集場所	ヒトスジシマカ		
	再捕獲数	放逐数	再捕獲率
Site A	8	54	0.15
Site B	10	25	0.40
Site C	26	125	0.21
Site D	4	28	0.14
Total	48	232	0.21

表 2. 4つの採集場所間で観察されたヒトスジシマカ（マーク虫）の動き

放逐場所	再捕獲場所				合 計
	Site A	Site B	Site C	Site D	
Site A	3	2	3	0	8
Site B	0	3	7	0	10
Site C	1	1	23	1	26
Site D	1	0	2	1	4
合 計	5	6	35	2	48

表 3. 再捕獲されたヒトスジシマカの再捕獲までの日数、再捕獲された場所までの距離、1日当たりの移動距離

	平均	標準偏差	最大	最小	観察数
すべての再捕獲個体					
再捕されるまでに要した日数	2.5 日	1.7	8 日	1 日	48
異なる場所で再捕獲された個体：					
再捕されるまでに要した日数	2.8 日	1.8	7 日	1 日	17
再捕獲場所までの距離	69m	22	95m	48m	17
1日当たり移動距離	35m	22	92m	8m	17