

201427055A

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

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

血液製剤及び献血血の安全性確保と安定供給の  
維持のための新興・再興感染症に関する総合的研究

(H26-医薬A-一般-002)

平成26年度 総括・分担研究報告書

平成27 (2015) 年 3 月

研究代表者 倉 根 一 郎

(国立感染症研究所)

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  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

# 血液製剤及び献血の安全性確保と安定供給の 維持のための新興・再興感染症に関する総合的研究

(H26－医薬A－一般－002)

平成26年度 総括・分担研究報告書

平成27（2015）年3月

研究代表者 倉根一郎

(国立感染症研究所)

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 血液製剤及び献血血の安全性確保と安定供給の維持のための新興・再興感染症に関する総合的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1  
研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・副所長）

## II. 分担研究報告

1. バベシア感染の検査法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11  
研究分担者：横山直明（帯広畜産大学・原虫病研究センター）
2. 住宅街におけるヒトスジシマカの移動分散に関する研究・・・・・・・・・・・・15  
研究分担者：澤邊京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部）
3. ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応に関する研究・・・・・・・・21  
研究分担者：五十嵐滋（日本赤十字社・血液事業本部）
4. 血液製剤による *Leishmania* 感染予防のための開発・・・・・・・・・・・・・・23  
研究分担者：岡田義昭（埼玉医科大学病院・血液・細胞移植部）
5. ジカウイルス遺伝子高感度検出法の開発と評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・29  
研究分担者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）
6. 輸血血液における HTLV-2 の検出法開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・35  
研究分担者：大隈和（国立感染症研究所・血液・安全性研究部）
7. 国内におけるシャーガス病疑い例の検査経験および輸血用血液製剤中に  
おける *Trypanosoma cruzi* 原虫の動態について・・・・・・・・・・・・・・・・・・39  
研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・副所長）

- ## III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47

# I. 総括研究報告書

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  
（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）

総括研究報告書

血液製剤及び献血血の安全性確保と安定供給の維持のための新興・再興感染症  
に関する総合的研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所 副所長）

研究要旨：

献血血の安全性確保と安定供給のため、シャーガス病、リーシュマニア症、バベシア症および蚊媒介性ウイルスを対象として検査法・スクリーニング法等の開発、媒介蚊に関する研究を行った。

リーシュマニア症については輸血による感染症を防止するためにリーシュマニア遺伝子の検出法を検討し、kineto-plast DNA が適していることを明らかにした。また、鞭毛型原虫の血液製剤中での生存率を検討し、血液の保存中に 2Log 程度減少することを明らかにした。シャーガス病については中南米出身者 7 名が抗体陽性、その内 6 名が PCR 陽性、3 名からトリパノゾーマクルージが分離された。日本人には陽性者は確認されなかった。バベシア症については、ELISA および ICT 作製を目的として検討を行なった。ヒトバベシア感染の血清学的に診断するための純度と濃度の高い組換え抗原の産生が可能となった。また、組換え抗原を用いた ELISA によりヒト感染血清中の抗体を検出する事が可能となった。

媒介性ウイルス感染症として、ウエストナイルウイルスについて輸血用血液スクリーニング用の核酸増幅検査システムを活用した国内感染発生時における WNV スクリーニングの追加実施方法について確認した。ジカ熱がデング熱同様日本国内で発生し、デング熱流行と誤判断される場合を想定し、高感度遺伝子検出法を確立した。ウイルス媒介蚊については、調査区画内における蚊の移動分散の様子を調査した。実験期間中の平均気温 19.2°C の条件で、ヒトスジシマカとオオクロヤブカの 2 種を用いて実験した結果、前種では放逐場所から少なくとも 95 m、後種では少なくとも 167 m を移動した個体が確認された。

HTLV-2 については、PCR primer セットを新規に複数準備し、PCR を用いた HTLV-2 核酸検査法を確立した。最も増幅効率の良い primer セットを選択し、10 コピー/10<sup>4</sup> 細胞程度の感度を確認できた。

研究分担者：

本部長)

五十嵐滋（日本赤十字社血液事業本部 副 大隈 和（国立感染症研究所 血液・安全

性研究部 室長)  
岡田義昭 (埼玉医科大学血液・細胞移植部  
部長)  
澤邊京子 (国立感染症研究所昆虫医科学部  
部長)  
高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一  
部 室長)  
横山直明 (帯広畜産大学原虫病研究センタ  
ー 教授)

研究協力者：

倉光 球 (国立感染症研究所 血液・安全  
性研究部 研究員)  
相良康子 (日本赤十字社九州ブロック血液  
センター 課長)  
佐竹正博 (日本赤十字社中央血液研究所  
副所長)  
佐山勇輔 (日本赤十字社中央血液研究所)  
平 力造 (日本赤十字社血液事業本部  
課長)  
津田良夫 (国立感染症研究所昆虫医科学部  
研究員)  
日野 学 (日本赤十字社血液事業本部  
総括管理監)  
三浦左千夫 (日本赤十字社血液事業本部中  
央血液研究所客員研究員)  
モイ メンリン (国立感染症研究所ウイルス  
第一部研究員・長崎大学熱帯医学研究所  
准教授)

#### A. 研究目的

これまで日本に存在しなかった病原体  
(トリパノゾーマクルージ、リーシュマニ  
ア等の原虫やデングウイルスやウエストナ  
イルウイルス等)の国内への侵入や、国内

に存在しても大きな問題とされなかった病  
原体 (バーベシア) 等による、輸血を介し  
た感染が問題となる。これらの病原体は、  
いずれも血液を介して感染することが報告  
されているが、現在わが国においては献血  
血についてこれらの病原体の検査はなされ  
ていない。さらにヒトT細胞白血病ウイル  
ス1型(HTLV-1)については検査法の確立等  
が進んでいるが、HTLV-2については検査法  
は確立されていない。これらの病原体によ  
る感染症が国内で発生した場合に備え、輸  
血用血液や血液製剤の安全性確保と安定供  
給のための検査法の開発と標準化、血液ス  
クリーニング法の標準化を行う。さらに、  
現在患者診断のための検査が確立されてい  
る病原体についても、血液製剤の安全性確  
保のための、より感度の高い新検査法の開  
発や改良(H26-28)を行う。上記蚊媒介性ウ  
イルスが国内に侵入した場合には、地域的  
な献血制限を考慮すべき状況も発生するこ  
とから、媒介蚊の生態を把握することが献  
血制限区域を考える上で必須な情報となる。  
本研究は、以上のように、種々の病原体に  
関して、検査法開発や検査情報を科学的知  
見から検討することによって献血血の安全  
性確保と安定供給に貢献することを目的と  
する。

#### B. 研究方法

1. 国内におけるシャーガス病疑い例の検  
査および輸血用血液製剤中におけるトリパ  
ノゾーマクルージ (*T. cruzi*) の動態：

1) シャーガス病疑い例の検査：

2012年10月から2014年8月の間に医療機  
関およびNGOなどから連絡のあった提供者

から血液を採取した。提供者は、1)LA出身者、2)サンガメとの暴露歴、3)LA地域に滞在歴のある方を対象とした。提供者から検体採取時に主治医などを介し、十分に本研究の概要を説明後、同意書に署名をいただいた。さらに、提供者にアンケート調査を行い、サンガメとの接触歴などを調査した。検体は、血清学検査法、および血液培養を行った。

2) 輸血用血液製剤中におけるトリパノゾーマクルージの動態：

トリパノゾーマクルージは南米出身者から分離された2株(1. JRC Tc-1/DTUs TcV、2. JRC Tc-2/DTUs TcII)を使用した。輸血用血液製剤はそれぞれ4名の献血者由来の濃厚血小板および新鮮凍結血漿を用いた。培養したトリパノゾーマクルージを各製剤へ接種後、PCは20~24 °C、60 rpm、FFPは凍結(-20 °C以下)により保存をおこなった。PCは接種後0, 2, 3, 4, 7日経過時、FFPは凍結融解前後をそれぞれ一部採取したサンプルを段階希釈後、培養を行った。培養は、最大50日間観察し、顕微鏡下でトリパノゾーマクルージの活動が確認されたものを陽性と判定した。

2. 血液製剤によるリーシュマニア感染予防のための開発

1) リーシュマニアの培養法

ショウジョウバエ細胞培養液に最終濃度が10%になるように牛胎児血清を添加して25°C、炭酸ガス濃度5%で培養した。原虫の数は、顕微鏡下に細胞計算盤で数えた。

2) PCRによる検出

文献から *Leishmania* 原虫のPCRによる検出法を検索し、マルチコピー存在する遺伝

子を標的としたプライマーを作成した。リボソーム遺伝子 *kinetoplast DNA* を増幅するプライマーを作成し、PCRを実施した。核酸は、2種の *Leishmania* 原虫をそれぞれ  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10$ 、 $3$  個に調整し、DNAを抽出した。溶出した1/3の核酸をPCRに添加し32サイクルの増幅を行なった。検出はゲルを用いた電気泳動で増幅産物の有無で行なった。

(3) 血液製剤中での生存率の解析

鞭毛型原虫を  $10^8$  匹/mL に調整し、全血(4°C保存)、5%アルブミン(室温：血小板製剤を想定)に添加し、全血は経時的にサンプリングしながら最長4週間、5%アルブミンは最長7日間保存した。経時的に採取した検体は、ショウジョウバエ細胞培養液を用いて10倍ずつ段階希釈した。25°C、CO<sub>2</sub>5%で2週間培養し、増殖してくる原虫の有無を顕微鏡下に観察した。各希釈で観察できたウェル数を用いてウイルス感染価と同様に TCID<sub>50</sub> を計算し、生存していた原虫数とした。

3. 変異型 CJD 発生動向

変異型 CJD の発生状況を英国と WHO の CJD サーベイランスから経時的に評価した。

4. バベシア感染の検査法に関する研究：

1) ヒト血清試料エール大学公衆衛生学部 Peter Kraus 教授より60検体のヒト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おり、非感染者血清10例、陽性血清49例、感染の有無が不明の1例を含んでいる。

2) Bmn1-17の組換え蛋白質の産生 *B. microti* からDNAを抽出し、*bmn1-17* 遺伝子をクロ

ーニングしてpGEX発現ベクターに組み込み、GST融合蛋白質として大腸菌に発現させた。次に、この融合蛋白質をPreScission Protease で処理し、GSTを除去した。更に、限外濾過フィルターを用いることにより、バッファー交換及び蛋白質の濃縮を行なった。

3) 組換え蛋白質の抗原性の検討Bmn1-17組換え蛋白質を精製・濃縮後、*B. microti* 抗グレイ株に感染したハムスターおよびミュンヘン株に感染したマウス感染血清を用いてウエスタンブロットを行い、その反応性について検討した。また、ミュンヘン株に感染したマウス血清を用いたELISAによっても、抗原性について検討した。

#### 4) 人血清を用いた ELISA の実施

96 穴プレートの 1 ウエル当たり Bmn1-17 組換え蛋白質 0.2・g を一晩 4℃ でコーティングした。その後、3%スキムミルク-PBS でブロック後、100倍希釈した人血清 100・1 と 37℃ 1時間反応させた。T-PBS で洗浄後、抗ヒト IgG 抗体で 37℃ 1時間反応させた。T-PBS で洗浄後、DAB 基質と室温で反応させ、15分後に OD<sub>415</sub> 値を測定した。

5. ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応に関する研究：同実施体制の見直しにより、ウエストナイル熱の国内発生に備えた対応についても、実施施設を近畿 BBC 福知山分室（京都府福知山市）から関東甲信越 BBC（東京都江東区）へと変更するとともに、PANTHER システムと同システム用の WNV-NAT 用試薬（Procleix WNV Assay on the Procleix PANTHER System）を用いた測定系へ移行することとした。今回は、WNV-NAT 用試薬の添付文書に記載さ

れている PANTHER システムにおける感度や特異性を、従来検討してきた e-SAS システムや Tiglis システムと比較検討した。

1) 感度試験：Health Canada WNV Reference Standard を使用した PANTHER システム、e-SAS システム、Tiglis システムの 50%LOD と 95%LOD を試薬感度として評価した。

2) 遺伝子型別検出状況：PANTHER システムと TIGRIS システムにおける WNV 遺伝子型別（遺伝系統）の検出状況について評価した。

#### 6. ジカウイルス遺伝子高感度検出法の開発と評価

GenBank からジカウイルスの塩基配列を収集し、アライメントした後、塩基配列 835-911 と 1086-1162 の位置にプライマーおよびプローブセット（ZIKV860 Set, ZIKV1107 Set）を選択した（表1）。これらは、我々の保有するジカウイルスおよびデング熱輸入症例（11症例）のデングウイルスおよびデング熱を疑った発熱患者の検体（18症例）を用いて評価した。

#### 7. 住宅街におけるヒトスジシマカの移動分散に関する研究：

石垣島の住宅街を調査地に選んだ。蚊を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麻酔した蚊を乗せた。胸部背面が上になるように位置を修正して、背面の1あるいは2ヶ所に塗料でマークをつけた。4色の塗料を用いて5つの採集場所を区別できるようにマークした。実験期間の最初の3日間、各採集場所で人囀りに飛来するヤブカ類を捕獲した。ヒトスジシマカとオオクロ

ヤブカの2種が飛来したので、これら2種をマーキングの対象とし。捕獲した成虫は生かして持ち帰り5種類の異なるマークをつけて、飼育ケージで砂糖水を与えて飼育した。3日目の夕方、5ヶ所の採集場所のそれぞれからマークを付けたヒトスジシマカ45~77(合計301)個体、オオクロヤブカ56~80(合計336)個体を放逐した。蚊の再捕獲は翌日から毎日午前(9:00頃)と午後(14:00頃)の2回行った。4人の採集者がローテーションを組み、各採集場所に採集者一人が8分間とどまって、吸血のために飛来する蚊を吸虫管で採集した。採集者は1ヶ所での採集が終了した後、次の採集場所に移動し8分間採集することを繰り返し、5ヶ所の採集場所それぞれで再捕獲を行った。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。成虫はクロロフォルムで殺して、マークを確認し個体数とともに記録した。再捕獲は4日間継続して実施した。

#### 8. 輸血血液におけるHTLV-2の検出法開発に関する研究

1) HTLV-2 PCRとアガロース電気泳動：HTLV-2を検出可能な複数のPCR primerセットを用意し、キット添付のプロトコルに従って、HTLV-1感染細胞株(TL-0m1)又はHTLV-2感染細胞株(Ton1)のgenomic DNAを非感染者の末梢血単核球(PBMC)のgenomic DNAで希釈したものをを用いてPCRを行った。PCR断片は、0.8%アガロース電気泳動で検出した。

2) 臨床検体の準備：日本赤十字社九州ブロック血液センターの献血スクリーニング検査においてHTLV-1陽性であるものの、確

認検査のWestern blot (WB)法で判定保留となった検体のうち、HTLV-1核酸検査を実施しプロウイルスDNAが検出されなかった検体を選択した。

#### (倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる場合には、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を遂行した。

#### C. 研究結果

1. 国内におけるシャーガス病疑い例の検査および輸血用血液製剤中におけるトリパノゾーマクルーシの動態：

シャーガス病の病原体である *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) の感染者(キャリア)では、末梢血や臓器に原虫が存在するため、輸血や移植などによって患者に *T. cruzi* が伝播する可能性がある。シャーガス病の可能性のある中南米出身者と日本人から検体を得て、1) 検査方法を評価しつつキャリアの状態を把握し、2) 輸血用血液製剤中に *T. cruzi* を接種して各輸血用血液製剤中の *T. cruzi* の動態を解析した。研究期間中に中南米出身者10名、日本人10名から検体が提供された。血清学検査により、LA出身者7名が抗体陽性、その内6名がPCR陽性、3名から *T. cruzi* が分離された。サシガメとの接触歴が不明な方からも *T. cruzi* 感染者が認められた。日本人には陽性者は確認されなかった。濃厚血小板(PC)中では、増殖可能な *T. cruzi* は接種2日目以降から減少し、3 log程度減少したが、PCの有効期間を通じて増殖可能な *T. cruzi* が認められたことから、輸血による感染リスクが示された。新鮮凍結血漿(FFP)は

一度の凍結融解により、5 log以上減少し、検出限界以下となった。両製剤とも株による大きな差は認められなかった。

## 2. 血液製剤によるリーシュマニア感染予防のための開発

### 1) Leishmania 原虫の PCR による検出

文献から3組(2組はリボゾーム遺伝子を検出)のプライマーを選択肢、*L. donovani* と *L. amasonensis* の検出を行なった。図1に示すように ribosomal DNA に比べて kinetoplast DNAの方が高感度であり、原虫3個体からでも陽性となった。

### 2) 血液製剤中での Leishmania 生存率の解析

血小板を想定した5%アルブミンでの生存率は、経時的に減少したが、7日目で約2Log減少であった。赤血球を想定した全血の4°C保存では現在の有効期間である3週間後は、室温保存のアルブミンと同様に約2Log減少した(図2)。

## 3. 変異型 CJD 発生動向

2012年から3年間に英国では1名、フランスでは2012年に2名感染者の報告があったが、それ以後の発生はなかった。2000年に発生のピークがあり、第2次の発生ピークが危惧されているがその兆候は認められなかった。

## 4. バベシア感染の検査法に関する研究:

多数の血清を検査するための ELISA およびイムノクロマト法 (ICT) の開発を目的とし、*B. microti* の純度の高い組換え蛋白質の調整、組換え蛋白質の抗原性の検討、人感染血清による組換え抗原を用いた ELISA の有用性について検討した。その結

果、純度と濃度が高い *B. microti* の bmn1-17 の組換え蛋白質の作製が可能となった。この組換えタンパク質と2種類の株に感染した実験動物血清を用いたウエスタンブロットにより、その抗原性が確認された。また、この抗原を用いた ELISA は、ミュンヘン株に対するマウス抗体の検出が可能であった。更に、アメリカの流行地の人陽性血清中60例を用いて ELISA を行ったところ、本 ELISA はアメリカで得られている感染結果と非常に高い相関を示した。

## 5. ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応に関する研究:

### 1) 感度試験

PANTHER システム、TIGRIS システムおよび e-SAS システムによる WNV の検出感度は Table 1 のとおりであり、PANTHER システムは従来と同等以上の感度を有していることが確認された。

### 2) 遺伝子型別検出状況

組織培養した各 WNV を使用し4重測定による検出率で比較した結果 (Table 2) から、遺伝系統1では、両システム間に差はないが、遺伝系統2の低ウイルス濃度での試験では PANTHER システムにおいて検出率が高い傾向にあるが、大きな差はないことが確認された。

## 6. ジカウイルス遺伝子高感度検出法の開発と評価

ZIKV860 Set, ZIKV1107 Set とともに ZIKV 遺伝子を増幅した。11人のデング熱患者血清を検査した結果、どちらのセット (Set) とも非特異的な反応を示さなかった。しか

し18の非デング発熱患者の検体のうち1検体でZIKV860セットによる増幅に際して37サイクルでカーブの上昇があり判定保留となった。当該検体は溶血した検体であったため患者由来の遺伝子が非特異的に反応した可能性が考えられた。

#### 7. 住宅街におけるヒトスジシマカの移動分散に関する研究：

調査区内にある5つの茂みを採集場所として、マークしたヒトスジシマカ45~77(合計301)個体、オオクロヤブカ56~80(合計336)個体を放逐した。放逐後4日間再捕獲を行い、ヒトスジシマカ27.9%(84個体)、オオクロヤブカ18.5%(62個体)が再捕獲された。再捕獲されたヒトスジシマカ84個体のうち放逐場所と異なる場所で捕獲されたのはわずかに2個体(2.4%)で、地図上で求めた最長移動距離は95mであった。これに対して、オオクロヤブカは再捕獲された個体の17.8%(13個体)が放逐場所以外で捕獲され、最長移動距離は167mだった。実験期間中の日平均気温は低く15.3~21.5℃を推移し、期間全体の平均気温は19.2℃とやや涼しい天候であった。調査期間中の低温によって、蚊の移動分散活動が抑えられ、そのことが高い再捕獲率や分散範囲の縮小の形で現れたと考

#### 8. 輸血血液におけるHTLV-2の検出法開発に関する研究

##### 1) HTLV-2 primerのスクリーニング

Primerの設定については、HTLV-1 (NCBI Accession No. J02029), HTLV-2 (NC\_001488), HTLV-3 (DQ093792), HTLV-4 (NC\_011800) 遺伝子の相同性を解析し、特

に相同性の高い遺伝子領域(nts 7,000-8,000bps)で複数の候補Primerを設定した。

HTLV-1遺伝子およびHTLV-2遺伝子がそれぞれ染色体にインテグレートされている細胞株TL-0m1およびTon1からgenomic DNAを抽出し、設定したForward primerとReverse primerを組み合わせて、それぞれのウイルス遺伝子のPCR増幅を検討した。その結果、15パターンのPrimerセットの組み合わせのうち、Fwd1-Rev4, Fwd3-Rev3, Fwd5-Rev3の3セットが高いPCR増幅効率を示した。この中で、PCR増幅が最も良好であったFwd3-Rev3を増幅Primerとして選択した。

##### 2) HTLV-2 primerの感度確認

次に、TL-0m1およびTon1から抽出したgenomic DNAを非感染者PBMCから抽出したgenomic DNAで段階希釈し、増幅Primer Fwd3-Rev3を用いたPCRの感度を調べた。その結果、TL-0m1では、感染細胞のゲノムが2 pg/reaction (希釈率で $10^{-3}$ %)まで検出が可能であった。またTon1では、20 pg/reaction (希釈率で $10^{-2}$ %)まで検出可能であった。これらの結果から、Fwd3-Rev3 primerでは、HTLV-1は1コピー/ $10^4$ 細胞、HTLV-2は10コピー/ $10^4$ 細胞までの低い割合で末梢血中に存在した場合に検出が可能であると考えられた。

#### D. 考察

本研究期間中に、*T. cruzi*の感染を疑われたLA出身者10名中7名が抗体陽性であり、その6/7がPCRも陽性であり、*T. cruzi*が分離された提供者も確認された。これまで日本在住の中南米出身者の一部に、*T. cruzi*感染者がいることが知られていた

が、本研究においてもキャリアが認められた。しかし、日本在住中南米出身者のキャリア中に、どのくらいの割合で *T. cruzi* の原虫血症が認められ、さらにシャーガス病の症状を有するキャリアが存在するかについては不明であり、今後規模を大きくした調査が必要と思われる。近年の人々の往来のグローバル化などにより、流行地出身者だけでなく、日本人による流行地への渡航などによって、シャーガス病などの中南米日本では稀な疾患に罹患する可能性も大きくなっている。日本においてはシャーガス病は稀な疾患であることから、医療機関などにおいても認識しづらく、今後シャーガス病をはじめとした疾患に対しては、国内でも医療関係者における認知度をより上げる必要がある。また、シャーガス病における検査方法の評価では、血清学検査法に用いた ELISA およびイムノクロマト法の両試験で結果に差異は認められず、PCR 法および血液培養からも *T. cruzi* DNA および *T. cruzi* の検出が確認された。従って、シャーガス病疑い患者に対し、これら検査方法は有効な方法であることが示唆された。さらに、今回、*T. cruzi* の DTUs を解析したところ、各提供者からの出身地域と分離された *T. cruzi* の DTUs の地域との間には矛盾がないことが示された。従って、*T. cruzi* の DTUs を同定することにより、その *T. cruzi* の地域性を推察するには有効な方法であることが示唆された。

リーシュマニア症は、地中海沿岸やインド、南米に存在することから旅行者や長期滞在者、さらに在日している感染国出身の人から日本に持ち込まれる可能性がある。我が国においては、ベクターが存在しない

ので輸血や臓器移植を介した感染が問題となる。献血者の中に感染者が非常に少ないと考えられることから現在の血液製剤の製法や保存方法によってどの程度除去されるか、また死滅するのかを検討した。鞭毛を有する鞭毛型原虫を用いて生存率を解析したが、実際のヒト感染では原虫は単球の中に無鞭毛型原虫として存在している。次年度は、無鞭毛型原虫を用いた解析を予定している。

バベシア症については、特異性と感度の高い血清診断法の開発には高純度・高濃度の組換え抗原が必要である。本研究では、GST 融合蛋白質として大腸菌で産生された bmn1-17 組換え蛋白質を Pre- Scisson Protease で処理する事により、GST を除去した。更に、限外濾過フィルターを用いることにより、バッファー交換及び従来行っていた透析法に比較して 15 倍以上蛋白質を濃縮する事が可能になった。Bmn1-17 組換え蛋白質とマウス血清を用いてウエスタンブロットでは、目的とするバンドとそれ以外の複数のバンドが認められた。しかし、Bmn1-17 組換え蛋白質を用いた ELISA では、感染と非感染のマウス血清で、大きな OD 値の差が認められ、ELISA 用抗原としての可能性が示唆された。更に、アメリカの流行地で採集された人血清を用いた ELISA では、アメリカでの診断結果と高い相関が認められた。

ジカウイルスはデングウイルスと同じくフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスである。臨床症状は発熱・痛み・発疹を 3 主徴とするデング熱と類似の発熱性疾患である。日本国内に生息するデングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカは、ジ

カウイルスにも感受性があると推測されているが、詳細は不明である。2014年の夏にデング熱が国内流行したことから、ジカ熱の流行の可能性も考慮しておく必要がある。

ウイルス媒介蚊については、本研究とほぼ同じ調査地で前年（2013年）3月にマーキング実験を実施している。前年の調査結果と本研究で観察されたマーク虫の再捕獲率を比較すると、ヒトスジシマカの場合、2013年は20.7%、2014年は27.9%で本研究の方が高い再捕獲率であったが、その違いは統計的には有意ではなかった。ヒトスジシマカの場合は、放逐場所とは異なる場所で再捕獲された個体の割合が本研究の方が有意に高く、したがって多くの個体は放逐後にあまり動き回っていないことが示唆された。これらの結果は、本研究の場合、前年に比較して放逐された個体の活動性がやや鈍く、そのため分散範囲も狭かった可能性があることを示唆している。本研究の実施期間中の平均気温（19.2℃）は2013年の実験期間中の平均気温（23.3℃）よりも4度も低く、しかも放逐した日の平均気温が15.3℃と最も低かった。昆虫の活動性は気温によって強く影響されるので、本研究の実施期間中の低温がマーク虫の活動を不活発にしたと思われ、このことが高い再捕獲率や分散範囲の縮小の形で現れたものと思われる。

活動性が低かったとはいえ、少なくとも92 mと95 mを移動したヒトスジシマカが確認されており、これのデータは気温が低い状態での本種の移動分散範囲を推測する上で重要な結果である。

HTLV-2について、将来的に国内にHTLV-2の感染例が発生した場合を想定して、

HTLV-2を検出できるPrimerをスクリーニングし、良好にPCR増幅を示すPrimerセットを同定した。今回新規に検討したPrimerでは、PBMC 10<sup>4</sup>細胞中に10コピー程度の感染細胞を検出できることが予測されたが、この感度は1反応で使用したDNA量（200ng）から推測した場合、PCRの検出限界付近の感度であると考えられる。よって新規Primerは、HTLV-2に対しても比較的高い感度を持っていると考えられる。

## E. 結論

リーシュマニア症についてリーシュマニア遺伝子の検出法を検討し、kineto-plast DNAが適していることを明らかにした。鞭毛型原虫の血液製剤中での生存率を検討し、血液の保存中に2Log程度減少することを明らかにした。シャーガス病については中南米出身者7名が抗体陽性、その内6名がPCR陽性、3名からトリパノゾーマクルージが分離された。サシガメとの接触歴が不明な方からも感染者が認められた。日本人には陽性者は確認されなかった。

バベシア症については、ヒトバベシア感染の血清学的に診断するための純度と濃度の高い組換え抗原の産生が可能となった。また、組換え抗原を用いてのELISAによりヒト感染血清中の抗体を検出する事が可能となった。ウエストナイルウイルスについては輸血用血液スクリーニング用の核酸増幅検査システムを活用した国内感染発生時におけるWNVスクリーニングの追加実施方法について確認した。ジカ熱がデング熱同様日本国内で発生し、デング熱流行と誤判断される場合を想定し、高感度遺伝子検出法を確立した。ウイルス媒介蚊については、調査区画内にお

ける蚊の移動分散の様子を調査した。実験期間中の平均気温が 19.2°C で、ヒトスジシマカは放逐場所から少なくとも 95 m、オオクロヤブカは少なくとも 167 m を移動した個体が確認された。HTLV-2 については、PCR primer セットを新規に複数準備し、PCR を用いた HTLV-2 核酸検査法を確立した。最も増幅効率の良い primer セットを選択し、10 コピー/10<sup>4</sup> 細胞程度の感度を確認できた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 英文論文

Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, Matono T, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Euro Surveill* 19(4). pii: 20683

Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, et al. Identification of TL-0m1, an Adult T-Cell Leukemia (ATL) Cell Line, as Reference Material for Quantitative PCR for Human T-Lymphotropic Virus 1. *J Clin Microbiol*. 2015;53(2):587-596.

###### 2) 和文論文

栢谷健太郎、清水恒弘、篠原 浩、土戸康弘、モイ メンリン、高崎智彦. オーストラリア渡航中に発症したロスリバーウイルス

感染症の本邦発報告. *感染症学雑誌*. 88(2):155-159 (2014)

##### 2. 学会等発表

###### 1) 国際学会

なし

###### 2) 国内学会

佐山勇輔、三浦左千夫、松本千恵子、内田茂治、佐竹正博、田所憲治: 日本国内におけるシャーガス病疑い例の検査経験、第 89 回日本感染症学会学術講演会、京都、2015 年

佐山勇輔、松本千恵子、三浦左千夫、内田茂治、佐竹正博、田所憲治: 輸血用血液製剤中における *Trypanosoma cruzi* の動態、第 84 回日本寄生虫学会大会、東京、2015 年

高崎智彦. 緊急企画: 70 年を経ての再来〜デング熱国内流行 2014. 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会. 平成 26 年 10 月 23-25 日 (岡山市)

高崎智彦. 緊急報告「デング熱—今年の国内流行」. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10-12 日 (横浜市)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告書

分担研究報告書

バベシア感染の検査法に関する研究

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：**バベシア症は、ダニ媒介性の赤血球内寄生原虫病で、主として動物に感染する。*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、人にも感染し人獣共通感染症の原因として重要である。*B. microti* による人バベシア症はアメリカ北東部では地方病として知られているが、近年世界的な感染の拡大が報告されている。日本でも、1999年に神戸で輸血により本邦初の *B. microti* の人感染例が発生した。そこで、本研究では輸血用血液や血液製剤の安全性確保と安定供給のために、*B. microti* 感染に対する血清及び遺伝子診断法の開発と標準化、血液スクリーニング法の標準化を目的とした。平成26年度は、多数の血清を検査するためのELISAおよびイムノクロマト法（ICT）の開発を目的とし、*B. microti* の純度の高い組換え蛋白質の調整、組換え蛋白質の抗原性の検討、人感染血清による組換え抗原を用いたELISAの有用性について検討した。その結果、純度と濃度が高い *B. microti* の bmn1-17 の組換え蛋白質の作製が可能となった。この組換えタンパク質と2種類の株に感染した実験動物血清を用いたウエスタンブロットにより、その抗原性が確認された。また、この抗原を用いたELISAは、ミュンヘン株に対するマウス抗体の検出が可能であった。更に、アメリカの流行地の人陽性血清中60例を用いてELISAを行ったところ、本ELISAはアメリカで得られている感染結果と非常に高い相関を示した。

#### 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。しかし、人にも感染し、人獣共通感染症として重要で、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。人への感染は主としてダニによる刺咬によるが、アメリカでは、近年キャリアーからの輸血により感染する例が増加しており、その対策が急がれている。また、本症は米国での感染拡大に加えて、中国、メキシコ、台湾、アフリカやヨーロッパ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ている。そのため、血液製剤の安全性確保や更なる人へのバベシア症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、バベシア症に対する迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を作製し、感度・

特異性の確認と標準化、我が国および献血血液における抗体陽性状況および遺伝子陽性状況の調査開発することを目的としている。平成26年度は、ELISAおよびICTの作製を目的とし、*B. microti* の純度の高い組換え蛋白質の調整、組換え蛋白質の抗原性の検討、人感染血清による組換え抗原を用いたELISAについて検討した。

#### B. 研究方法

##### （1）ヒト血清試料

エール大学公衆衛生学部 Peter Kraus 教授より60検体のヒト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おり、非感染者血清10例、陽性血清49例、感染の有無が不明の1例を含んでいる。

##### （2）Bmn1-17の組換え蛋白質の産生

*B. microti* からDNAを抽出し、*bmn1-17* 遺伝子をクローニングしてpGEX発現ベクターに

組み込み、GST融合蛋白質として大腸菌に発現させた。次に、この融合蛋白質を PreScission Protease で処理し、GSTを除去した。更に、限外濾過フィルターを用いることにより、バッファー交換及び蛋白質の濃縮を行なった。

### (3) 組換え蛋白質の抗原性の検討

Bmn1-17組換え蛋白質を精製・濃縮後、*B. microti*抗グレイ株に感染したハムスターおよびミュンヘン株に感染したマウス感染血清を用いてウエスタンブロットを行い、その反応性について検討した。また、ミュンヘン株に感染したマウス血清を用いたELISAによっても、抗原性について検討した。

### (4) 人血清を用いた ELISA の実施

96 穴プレートの1ウエル当たり Bmn1-17組換え蛋白質0.2 $\mu$ gを一晩4 $^{\circ}$ Cでコーティングした。その後、3%スキムミルク-PBSでブロック後、100倍希釈した人血清100 $\mu$ lと37 $^{\circ}$ C1時間反応させた。T-PBSで洗浄後、抗ヒト IgG 抗体で37 $^{\circ}$ C1時間反応させた。T-PBSで洗浄後、DAB基質と室温で反応させ、15分後にOD<sub>415</sub>値を測定した。

### (倫理面への配慮)

人の血液材料を用いた実験については、帯広畜産大学、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) *B. microti* の組換え蛋白質の調整

*B. microti* グレイ株の遺伝子情報にもとづき、bmn1-17組換え蛋白質をGST融合蛋白質として大腸菌を用いて産生した。PreScission Protease 処理により GST が除去され、純度の高い組換え蛋白質が得られた。また、精製後限外濾過フィルターを用いることにより、バッファー交換と蛋白質濃度をこれまでの透析法に比べて100倍以上に濃縮する事が可能となった。

### (2) 組換え蛋白質の抗原性の検討

*B. microti* グレイ株に感染したハムスターおよびミュンヘン株に感染したマウス血清を用いてウエスタンブロットを行った結果、目的のバンドおよびそれ以外のバンドが認められた。しかし、ミュンヘン株に感染し

たマウス血清を用いたELISAを行なったところ、0.5のOD値が認められたが、悲感染マウス血清では0.1以下のOD値であった。

### (3) 人感染血清によるbmn1-17組換え抗原を用いたELISAの討

エール大学より得られた60例の人血清を用いてELISA(IgG)を行い、アメリカで得られた結果と比較した。非感染者血清10例および感染記録が不明の1例は、0.2以下のOD値を示した。陽性と判定されている残りの49例中、35例が1.0以上、8例が0.5~1.0、3例が0.32~0.38のOD値を示した。また、IAFTでIgGが3.2倍以下、IgMが1.28倍と6.4倍であった2例は0.12と0.14と低いOD値を示した。以上、Bmn1-17組換え抗原を用いたELISAは、アメリカで得られている結果と高い相関を示した。

## D. 考察

特異性と感度の高い血清診断法の開発には高純度・高濃度の組換え抗原が必要である。本研究では、GST融合蛋白質として大腸菌で産生されたbmn1-17組換え蛋白質をPreScission Proteaseで処理する事により、GSTを除去した。更に、限外濾過フィルターを用いることにより、バッファー交換及び従来行っていた透析法に比較して15倍以上蛋白質を濃縮する事が可能になった。Bmn1-17組換え蛋白質とマウス血清を用いてウエスタンブロットでは、目的とするバンドとそれ以外の複数のバンドが認められた。しかし、Bmn1-17組換え蛋白質を用いたELISAでは、感染と非感染のマウス血清で、大きなOD値の差が認められ、ELISA用抗原としての可能性が示唆された。

更に、アメリカの流行地で採集された人血清を用いたELISAでは、アメリカでの診断結果と高い相関が認められた。すなわち、血液塗抹標本で原虫が確認された例やIAFTにより高い抗体価を示した陽性血清では、ELISAではIgGに対する高いOD値が認められた。しかし、陽性と診断された2例については、健康者と同様0.2以下の低いOD値であった。これらの血清はIFATでIgGが3.2倍以下、IgMが1.28倍と6.4倍であり、感染初期の患者からの血清と推察される。今回のELISAは感染後期から検出されるIgGを測定した結果であり、今後感染初期に主として検

出される IgM を測定する事により、高い OD 値を示す可能性が高い事が予想される。以上の結果は、Bmn1-17 組換え蛋白質を用いた ELISA は、人のバベシア感染の診断にも有用である事が示唆された。今後、IgM を測定する ELISA を行なうとともに、ICT ストリップとその評価を行なう必要がある。

#### E. 結論

本研究では、多数の血清を検査するための ELISA および ICT 作製を目的として検討を行った。その結果、人バベシア感染の血清学的に診断するための純度と濃度の高い組換え抗原の産生が可能となった。また、組換え抗原を用いた ELISA は人感染血清中の抗体を検出する事が可能で、これまで得られている診断結果とほぼ一致した。今後これらの結果により、組換え抗原を用いたイムノクロマトスティックを作製し、アメリカで得られた人血清を用いて特異性や感度について検討を行う予定である。

#### F. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Iseki H., Takemae H., Ishizaki T., Kim C., Saito-Ito A., Inokuma H., Krause P., Igarashi I. and Yokoyama N.; Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human babesiosis. (準備中).

##### 2) 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

住宅街におけるヒトスジシマカの移動分散に関する研究

|       |       |                 |
|-------|-------|-----------------|
| 研究分担者 | 澤邊京子  | 国立感染症研究所・昆虫医科学部 |
| 研究協力者 | 津田良夫  | 国立感染症研究所・昆虫医科学部 |
|       | 前川芳秀  | 国立感染症研究所・昆虫医科学部 |
|       | 小川浩平  | 国立感染症研究所・昆虫医科学部 |
|       | 糸川健太郎 | 国立感染症研究所・昆虫医科学部 |

住宅街の中に商店、公共のビル、博物館、複数の緑地が含まれる約 300 m×250 m の調査区画を設定し、胸部背面に異なる色素でマークした蚊を放逐して、調査区画内における蚊の移動分散の様子を調査した。調査区内にある 5 つの茂みを採集場所として、マークしたヒトスジシマカ 45～77 (合計 301) 個体、オオクロヤブカ 56～80 (合計 336) 個体を放逐した。放逐後 4 日間再捕獲を行い、ヒトスジシマカ 27.9% (84 個体)、オオクロヤブカ 18.5% (62 個体) が再捕獲された。再捕獲されたヒトスジシマカ 84 個体のうち放逐場所と異なる場所で捕獲されたのはわずかに 2 個体 (2.4%) で、地図上で求めた最長移動距離は 95 m であった。これに対して、オオクロヤブカは再捕獲された個体の 17.8% (13 個体) が放逐場所以外で捕獲され、最長移動距離は 167 m だった。実験期間中の日平均気温は低く 15.3～21.5℃を推移し、期間全体の平均気温は 19.2℃とやや涼しい天候であった。調査期間中の低温によって、蚊の移動分散活動が抑えられ、そのことが高い再捕獲率や分散範囲の縮小の形で現れたと考えられる。

A. 研究目的

ヒトスジシマカは秋田県、岩手県以南に広く分布する蚊で、デング熱の媒介蚊として知られている。本種は藪に潜伏して吸血源の動物が近づくと待ち伏せするという吸血行動を示すため、その行動範囲は藪や茂みなどの空間分布に大きく影響されると考えられている。疾病媒介蚊の行動範囲は感染の拡大範囲を決定する大き

な要因の一つであり、ヒトスジシマカがどの程度の行動範囲を有するかは重要な研究課題である。ヤブカ類の飛翔分散範囲の調査法として、胸部背面に塗料でマークして放逐し、再捕獲を行って移動方向と移動距離を調査する手法 (マーキング法) を検討してきた。過去に行われたヒトスジシマカのマーキング実験はひとつの大きな林などが対象とされており、

大きさの異なる複数の茂みや緑地が点在する住宅街での本種の移動分散を調査した例はほとんどない。

本研究は、複数の緑地と茂みが存在する住宅街を対象として、そこに生息するヤブカ類の飛翔範囲の大きさを調べることを目的として、マーキング法による野外調査を行った。

## B.研究方法

**調地査：**石垣島の住宅街を調査地を選んだ。住宅や商店、公共のビル、博物館、大小3つの緑地がある約300 m×250 mの区画を設定し、その中に5ヶ所の採集場所を選んだ(図1)。採集場所「庭」は、調査のために滞在した民宿の庭先で、ここにはヤブカ類の発生源となる人口容器がある。採集場所「大緑地」は民宿の東にある大きな緑地で、全体が樹冠で覆われ灌木や下草が茂っている。実際の採集場所はこの緑地の奥に位置しており薄暗い。採集場所「小緑地」は大緑地から南東に約92 m離れた小規模な緑地である。ここにも大きな木が茂り、灌木や下草が茂っている。「博物館」は大緑地の採集場所の北西230 mに位置し、周囲を植込みで囲まれた建物である。建物の周囲にある排水溝が幼虫発生源となっていた。「小茂み」は駐車場の境界にある茂みで大きな樹木の木陰に低木が茂り、蚊の潜伏場所となっている。

**マーキング法：**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麻酔した蚊を乗せた。胸部背面が上になるように位置を修正して、背面の1あるいは2ヶ所に塗料でマークをつけた。4色の塗料を用

いて5つの採集場所を区別できるようにマークした。

実験期間の最初の3日間、各採集場所ですぐに飛来するヤブカ類を捕獲した。ヒトスジシマカとオオクロヤブカの2種が飛来したので、これら2種をマーキングの対象とした。捕獲した成虫は生かして持ち帰り5種類の異なるマークをつけて、飼育ケージで砂糖水を与えて飼育した。3日目の夕方、5ヶ所の採集場所のそれぞれからマークを付けたヒトスジシマカ45~77(合計301)個体、オオクロヤブカ56~80(合計336)個体を放逐した。  
**再捕獲：**放逐した蚊の再捕獲は翌日から毎日午前(9:00頃)と午後(14:00頃)の2回行った。4人の採集者がローテーションを組み、各採集場所に採集者一人が8分間とどまって、吸血のために飛来する蚊を吸血管で採集した。採集者は1ヶ所での採集が終了した後、次の採集場所に移動し8分間採集することを繰り返し、5ヶ所の採集場所それぞれで再捕獲を行った。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。成虫はクロロフォルムで殺して、マークを確認し個体数とともに記録した。再捕獲は4日間継続して実施した。

## C.研究結果

実験期間中に雨は降らなかったが、一般的に気温が低く、再捕獲を実施した4日間の日平均気温は15.3~21.5℃であった。マーク虫を放逐した日の平均気温が最も低く、放逐後に再捕獲を行った4日間は徐々に気温が上昇した。

5ヶ所の採集場所から合計301個体のヒトスジシマカを放逐し、その27.9%(84