

個体)が再捕獲された(表1)。それぞれの採集場所について求めた再捕獲率には違いがあり、民宿の庭が最も低く13.3%、これに対して博物館の再捕獲率は最も高い41.1%(23/56)を示した。オオクロヤブカの再捕獲率にも場所による違いが見られたが統計的には有意ではなく、全体の再捕獲率は18.5%で、ヒトスジシマカよりも低かった。5つの採集場所間の動きをまとめて表2に示した。再捕獲されたヒトスジシマカ84個体のうち97.6%に相当する82個体は放逐された場所と同じ場所で捕獲された。放逐された場所とは異なる場所で再捕獲されたのは2個体で、地図上で求めた移動距離は92mと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82.3%が放逐された場所で捕獲された。放逐場所から別の場所へ移動した13個体の中では、博物館から小茂みに移動した個体の移動距離が最も長く167mだった。

D. 考察

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。これに対して、オオクロヤブカの再捕獲率は、2013年が9.3%、2014年が18.5%となり、本研究で得られた再捕獲率の方が明らかに高かった。また、放逐した場所とは異なる場所で再捕獲された個体の割合を2013年と2014年

で比較したところ、ヒトスジシマカは62.5%(2013年)に対して97.6%(2014年)と大きく異なり、本研究の結果の方が有意に高い値であった。オオクロヤブカの場合は、2013年が80.0%で2014年は82.3%であり、この違いは統計的には有意ではなかった。放逐された個体の再捕獲率は、死亡と調査地からの移出によるマーク虫の減少によって影響され、生存して調査地に留まる個体が多いほど再捕獲率は高くなると考えられる。ヒトスジシマカもオオクロヤブカも本研究で観察された再捕獲率の方が高かったことから、本研究の方が生存し調査地に留まった個体が多かったと思われる。また、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る。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92mと95mを移動したヒトスジシマ

カが確認されており，これ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と思われる．オオクロヤブカでは 167 m を移動した個体が見つかったが，気温が高くヒトスジシマカの活動性が高い時にどの程度の移動分散能力があるかを，今後も実験を繰り返して明らかにする必要があるだろう．

E. 結論

住宅街の中に住宅や商店，公共のビル，博物館，緑地がある約 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．実験期間中の平均気温が 19.2°C とやや低い天候であったが，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．

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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

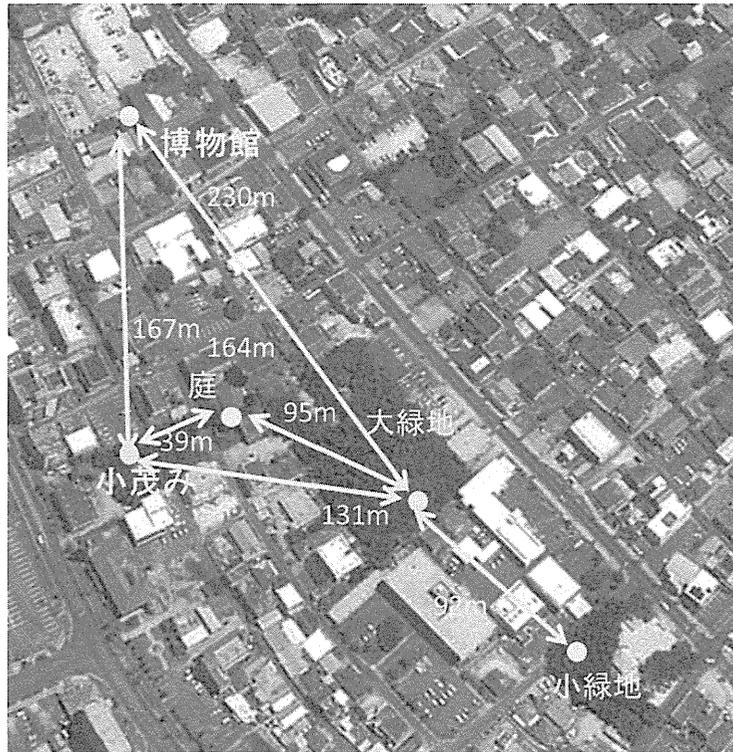


図1 ヤブカ類のマーキング実験を行った石垣島の住宅街と成虫の放逐・再捕獲を行った場所の位置関係

表 1. 5つの採集場所間で観察されたヒトスジシマカとオオクロヤブカの再捕獲結果

採集場所	ヒトスジシマカ				オオクロヤブカ			
	無マーク	放逐数	再捕獲数	再捕率	無マーク	放逐数	再捕獲数	再捕率
大緑地	70	56	12	21.4	107	62	12	19.4
小茂み	56	77	27	35.1	8	80	15	18.8
小緑地	69	67	16	23.9	50	71	17	23.9
博物館	32	56	23	41.1	10	56	5	8.9
庭	32	45	6	13.3	18	67	13	19.4
合計	259	301	84	27.9	193	336	62	18.5

表 2. 5つの採集場所間で観察された蚊の動きの集計表

ヒトスジシマカ

放逐場所	再捕獲場所					合計
	博物館	小茂み	庭	大緑地	小緑地	
博物館	23					23
小茂み		27				27
庭			5	1		6
大緑地				12		12
小緑地				1	15	16
合計	23	27	5	14	15	84

オオクロヤブカ

放逐場所	再捕獲場所					合計
	博物館	小茂み	庭	大緑地	小緑地	
博物館	4	1				5
小茂み		10	2	3		15
庭	1		10	2		13
大緑地				11	1	12
小緑地				3	14	17
合計	5	11	12	19	15	62

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に関する研究

研究分担者 五十嵐 滋 日本赤十字社血液事業本部副本部長兼安全管理課長
研究協力者 日野 学 日本赤十字社血液事業本部製造販売総括管理監
平 力造 日本赤十字社血液事業本部検査管理課長

研究要旨

欧米諸国において、ウエストナイルウイルス（WNV）の輸血感染が大きな問題となっており、わが国においても WNV の国内感染が発生した場合に備え体制を整備しておく必要がある。本研究では、輸血用血液スクリーニング用の核酸増幅検査（NAT）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検討する。

A. 研究目的

日本赤十字社では、平成 20 年に導入した NAT システム（検査機器・試薬）の更新に伴い、輸血用血液製剤等の安全性の向上、検査時間の短縮及び危機管理体制の充実等を目的に平成 26 年 8 月 1 日採血分よりノバルティス社（Grifolis 社）製 PANTHER システムを導入し、個別検体によるスクリーニング NAT（HBV、HCV、HIV）を開始した。

同システムの導入にあたり、日本赤十字社の NAT 実施体制を見直し、全ての血清学的検査実施施設（8 か所）へ同システムを整備して、血清学的検査と並行してスクリーニング NAT を実施することとした。また、同システムは、ウエストナイルウイルス（WNV）、E 型肝炎ウイルス（HEV）等についても測定可能であり、必要に応じて迅速かつ広域的な対策が可能となった。

同実施体制の見直しにより、WNV 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：ノバルティスファーマ株式会社）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。

B. 研究方法

1. WNV

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。

C. 研究結果

1. WNV

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。

Table 1. Detection Probabilities of WNV using a Sensitivity Panel from Health Canada Reference Standard*

System	Detection Probabilities (copies/mL)	
	50% (95% CI)	95% (95% CI)
PANTHER	2.0 (1.6 – 2.4)	11.9 (9.6 – 15.9)
TIGRIS	2.0 (1.6 – 2.3)	8.9 (7.3 – 11.5)
e-SAS	3.4 (1.8 – 7.2)	8.2 (5.5 – 21.5)

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。

Table 2. Detection of WNV Genotypes

WNV Lineage	Origin, strain or year identified, (accession)	Level	Procleix PANTHER System	Procleix TIGRIS System
1	USA, NY 2001-6263, (AF533540)	10 ₃ dilution 10 ₃ dilution	4/4 3/4	4/4 3/4
1	USA, 1986, (DQ164189)	10 ₃ dilution 10 ₃ dilution	4/4 4/4	4/4 4/4
2	Uganda B-956 (NA)	10 ₆ dilution 10 ₇ dilution	4/4 3/4	4/4 1/4
2	South Africa, 1989, (EF429197)	100 copies/mL 30 copies/mL	4/4 4/4	4/4 4/4
2	Greece 2010 (HQ537483)	100 copies/mL 30 copies/mL	4/4 4/4	4/4 3/4
2	Hungary, 2004 (DQ116961)	100 copies/mL 30 copies/mL	4/4 4/4	4/4 3/4

D. 考察

今回導入した PANTHER システムと従来検討してきた e-SAS システムの違いは、半自動(手動)での検査から、検体分注から試薬分注、増幅・検出までを全自動で実施する装置へ変更したことである。試薬については、測定原理は両システムとも TMA 法を採用しており、試薬もほぼ同じ構成であることから、感度試験等のデータも従前の方法と比較して同等もしくは同等以上の結果であった。

全自動の NAT システムを、全国 8 箇所

の学的検査実施施設に配備したことで、WNV 国内感染発生時において柔軟かつ広域的な対応も可能となった。また、全自動のシステムであることから、追加検査を実施する場合の職員の負荷も低減されると思われる。現在、危機管理対策として、PANTHER システム用の WNV 検出試薬 5,000 テスト分を、プール検体作製機も保有する関東甲信越ブロック血液センターに備蓄している。さらに、国内のノバルティスファーマ所有の保管施設に 5,000 テスト分、香港のグリフォルス社の保管施設に 5,000 テスト分を保管しており、WNV の国内感染が発生した場合は、優先購入の契約を締結している。

今後、実機を用いて感度や特異性等を検証するとともに、WNV 国内感染発生時の対応スキームを構築していきたい。

E. 結論

PANTHER システムと同システム用の WNV-NAT 用試薬を用いることで、これまでと同程度以上の感度や特異性で WNV のスクリーニングが可能であることが確認された。

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）

分担研究報告書

血液製剤による Leishmania 感染予防のための開発

研究分担者 岡田義昭（埼玉医科大学病院 血液・細胞移植部 部長）

研究要旨

Leishmania 原虫は、世界に広く分布し、約 15 種がヒトに病原性を有していると言われ不顕性感染も存在する。そのため地中海沿岸諸国では輸血や臓器移植による感染例が報告されている。しかし、我が国では馴染みが薄い感染症であるため、現行の製法で作られた血液製剤がどれくらいリスクがあるのか解析されていない。これを明らかにするために今年度は、1) ユニバーサルに Leishmania を検出できるプライマーの作成を検討し、kinetoplast DNA が原虫当り複数コピー存在することから検出には適していると考えられた。2) 輸血用血液製剤中での Leishmania の鞭毛型原虫の生存率を解析した。全血の 4℃保存では、3 週間で約 2 Log、5 %アルブミン液の室温保存では 7 日間で約 2Log 生存率は減少した。ヒトの体内では無鞭毛型で存在することから鞭毛型と生存率が異なる可能性があり、来年度は無鞭毛型で検討したい。

A. 研究目的

Leishmania は、主にアフリカ北部、地中海沿岸、中東、西アジア、南米に広く分布している原虫である。サシチョウバエ (sandfly) と呼ばれる蚊帳を通り抜けられる程小さい「ハエ」によって媒介される。世界 88 カ国に 1200 万人の感染者がいると推定されている。不顕性感染が存在することは知られており、これまで輸血や臓器移植によって感染した報告がある。日本では、輸入感染症として報告はあるが、ほとんど知られていない。日本において現行の製造法（白血球除去や保存温度）で製造された血液製剤にどの程度のリスクがあるのか明らかにすることを目的とした。今年度は、検出法と血液製剤中での Leishmania 原虫の生存率を検討した。

B. 研究方法

(1) Leishmania 原虫の培養法

長崎大学熱帯医学研究所 NEKKEN NBRP（ナショナルバイオリソースプロジェクト）から L. donovani と L. amasonensis を購入し、シヨ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℃、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) Leishmania 原虫の 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。リボソーマル遺伝子（Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis. Vol. 30. 209-218, 2011）と kinetoplast

DNA (Clin. Infect. Dis. vol. 37. 149-153. 2003) 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、CO₂5% 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 TCID₅₀ を計算し、生存していた原虫数とした。

(4) 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。

C. 研究結果

(1) *Leishmania* 原虫の PCR による検出

文献から 3 組 (2 組はリボゾーマル遺伝子を検出) のプライマーを選択肢、*L. donovani* と *L. amazonensis* 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 匹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

図 3 に年度毎の患者数 (死亡者数) を示した。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。

D. 考察

Leishmania 原虫症は、世界に広く分布するものの日本では馴染みが薄い感染症である。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。しかし、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。献血者に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たり死滅するのかを検討することにした。今回は、鞭毛を有する鞭毛型原虫を用いて生存率を解析したが、実際の人の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。そのため来年度は、無鞭毛型原虫を用いた解析を予定している。そのための鞭毛型から無鞭毛型に分化させる方法の検討、及び無鞭毛型の原虫数の測定法について検討を行なっている。

人体内では単球に存在していることから白血球

除去膜による除去が有効と考えられ、来年度は無鞭毛型原虫を用いて除去効果も検討する予定でいる。

変異型 CJD は牛の管理が適切に実施されたことから 2000 年を境に感染者数は激減した。2 次的なピークが危惧されているが、いまのところその兆候は認められていない。摘出された虫垂検体を用いた疫学調査では未発症の感染者が存在しているとの報告もあり今後も発生数の推移に注意する必要がある。

E. 結論

輸血による Leishmania 感染症を防止するために Leishmania 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。

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) 鈴木雅之、青木麻衣子、加藤光洋、玉栄建次、内野富美子、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭:同種骨移植のための骨保管支援業務の現状、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成26年5月、奈良

2) 岡田義昭、小林清子、池淵研二:リアルタイム RT-PCRを用いた B19-RNA 定量による B19 感染評

価系の開発、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成26年5月、奈良

3) 山田攻、加藤光洋、鈴木雅之、内野富美子、小林清子、池淵研二、岡田義昭

:当院における産婦人科緊急輸血症例の分析とその対策、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成26年5月、奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

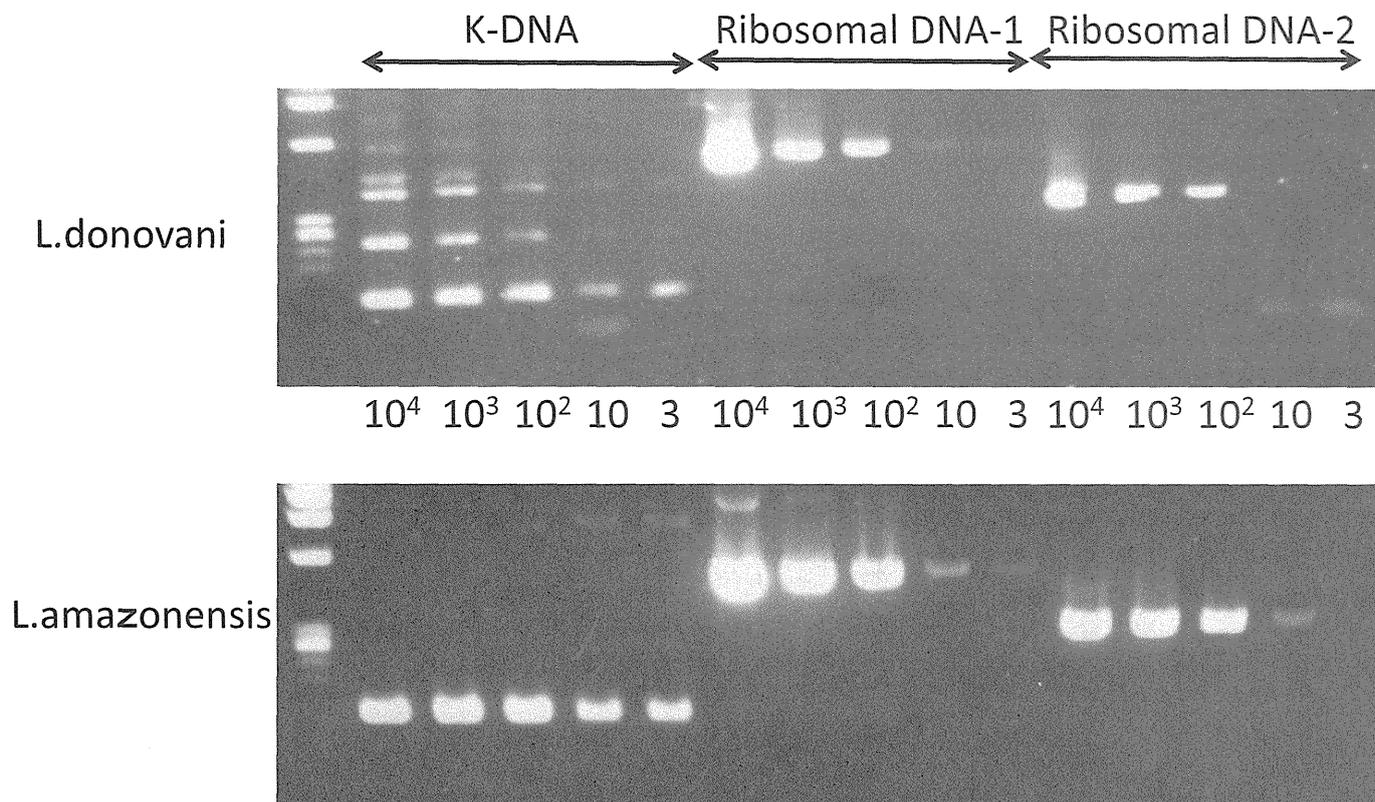
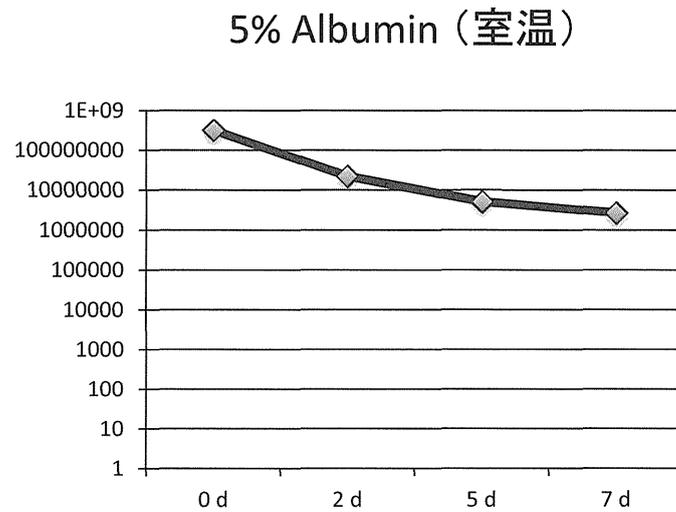
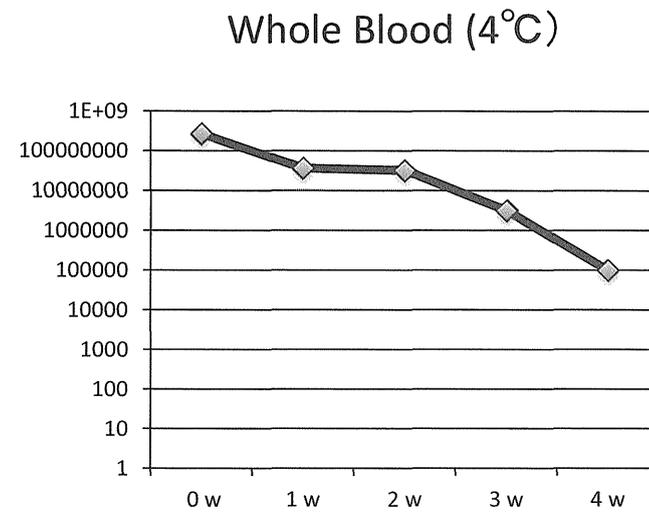


図1. Universal Primerを用いた Leishmania DNAの検出



7日間で約2Log減少



3週間で約2Log減少

図2.血液製剤中での Leishmaniaの生存率

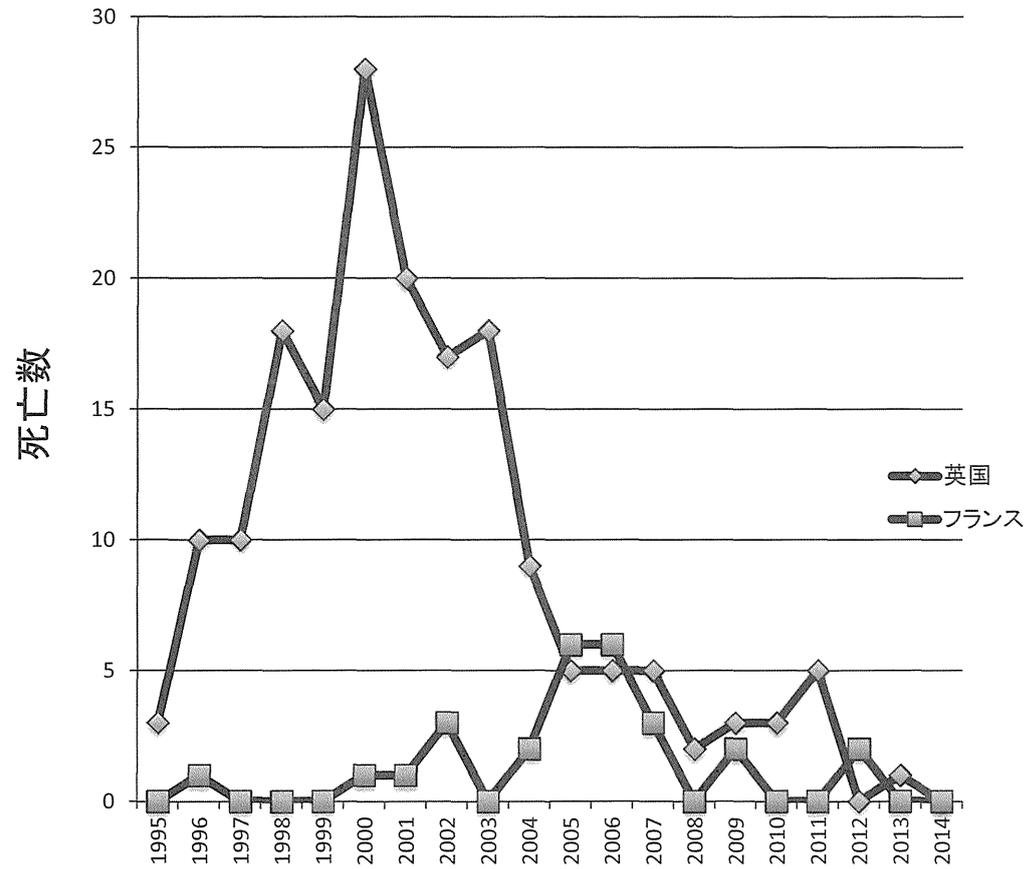


図3.英国とフランスにおけるvCJDによる死者数の推移

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）

分担研究報告書

ジカウイルス遺伝子高感度検出法の開発と評価

研究分担者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究協力者 モイ メンリン（国立感染症研究所ウイルス第一部、長崎大学熱帯医学研究所）

研究要旨：2014年夏に69年ぶりに国内流行したデング熱とよく似た臨床症状を呈するジカ熱（Zika fever）が2013年の11月から太平洋島嶼国において流行が始まった。2013年12月に別々にフランス領ポリネシアのボラボラ島を旅行した熱発患者に関して、デングウイルスおよびジカウイルスに関する実験室診断を実施したところ、尿からのウイルス遺伝子検査、特異的IgM抗体検査によりジカ熱と確定診断した。その後、2014年の6月にタイからのジカ熱輸入症例を確認した。タイは毎年大きなデング熱流行が発生している国である。したがって、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も想定される。そのような状況で血液製剤及び献血血にジカウイルスが混入する可能性を考慮し、高感度遺伝子検出法を開発し評価した。

A. 研究目的

ジカ熱はヤブカによって媒介され、その臨床像はデング熱と類似している。デング熱流行国では、ジカ熱がデング熱と診断されて流行が発生してもデング熱流行に紛れている可能性がある。2014年8月にデング熱国内流行が発生した我が国において、ジカ熱流行の可能性も考慮し、血液製剤及び献血血にジカウイルスが混入する可能性を想定しておく必要がある。ジカウイルス遺伝子検出リアルタイムRT-PCR法は、準備しておくべき検査法である。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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。

D. 考 察

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ヤブカによって媒介されるウイルスである。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、詳細は現在検討中である。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。そのためそのような状況で血液製剤及び献血血にジカウイルスが混入する可能性もあり、血液製剤及び献血血におけるジカウイルス遺伝子検出についても準備を進めるべきである。

E. 結 論

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、血液製剤及び献血血にジカウイルスが混入する可能性を考慮し、高感度遺伝子検出法を確立した。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Suzuki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I. Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. *Journal of General Virology*, 95(Pt 3):591-600, 2014.
2. Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Determination of antibody concentration as main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells. *Archives of Virology*, 159(1):103-16, 2014.
3. Tajima S, Kotaki A, Yagasaki K, Taniwaki T, Moi ML, Nakayama E, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getah virus propagated from a single porcine serum sample: A case of coinfection. *Archives of Virology*. 159(11): 2969-75, 2014.
4. 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 Surveillance*, 19(4). pii: 20683, 2014

5. 枋谷健太郎、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. 学会発表

国際学会

1. Tomohiko Takasaki. Re emerging dengue in Japan 2014. The 8th Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27-29 Jun 2015)
3. Moi ML, Rattanamahaphoom J, Lim CK, Sirivichayakul C, Saijo M, Sabchareon A, Takasaki T, Kurane I. Neutralizing antibody titers as a surrogate for protection against dengue: a revisit of neutralizing antibody titers of dengue virus using FcyR-expressing cells. Joint International Tropical Meeting (JITMM) (Bangkok), December, 2014.
4. Moi ML, Shirai K, Ami Y, Lim CK, Suzaki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Development of a non-human primate model for primary and

secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). The 63rd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (New Orleans, Louisiana, USA) November, 2014

国内学会

1. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデングワクチン. 第25回トラベラーズワクチンフォーラム研修会. 平成26年2月22日 (東京都)
2. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデング熱ワクチン. 第11回渡航医学実用セミナー「海外赴任前健康ガイダンス」平成26年6月30日 (東京)
3. 高崎智彦. デング熱 国内感染の流行をどう受け止めるか. 日本記者クラブ. 平成26年9月12日 (東京都、日本プレスセンタービル)
4. 高崎智彦. 海外で流行する昆虫媒介性ウイルス感染症とデング熱国内流行 (特別講演). 平成26年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会
5. 高崎智彦. デング熱国内発生への対応ーデング熱の基礎と疫学ー. 第46回日本小児感染症学会. 平成26年10月18-19日 (東京)
6. 高崎智彦. 緊急企画: 70年を経ての再来ーデング熱国内流行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)

7. 高崎智彦. 緊急報告「デング熱ー今年の国内流行」. 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)
8. MoiMeng Ling, 白井颯治、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦一孝、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 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)
9. 山中敦史、Moi Meng Ling、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二. デング 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・増強抗体応答に及ぼす影響. 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)
10. 齋藤悠香、Moi Meng Ling、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. Fc γ R 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討. 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)
11. 高崎智彦. 「デング熱から身を守るためにー忍び寄る地球温暖化ー」川崎市地球温暖化防止活動推進センター主催. 平成 26 年 11 月 16 日 (東京都多摩市)
12. 高崎智彦. ー市民公開講座ーデング熱 これからどうなる?. 日本獣医学会 公衆衛生分科会主催. 平成 26 年 12 月 1 日 (東京、日本獣医生命科学大学)
13. 高崎智彦. 「デング熱国内感染と海外の対応」日本旅行医学会 第 8 回看護部会セミナー. 平成 26 年 12 月 13 日 (東京 東医健保会館)
14. 高崎智彦. デング熱国内流行 ~70 年の時を経て~ (特別講演). 第 21 回リケッチャ研究会. 平成 26 年 12 月 20-21 日 (東京 国立感染症研究所)
15. 高崎智彦. デング熱・チクングニア熱など蚊媒介性ウイルス感染症. 平成 26 年度阪神地区感染症懇話会 平成 27 年 1 月 26 日 (大阪市 大阪府病院年金会館)

表 1

プライマー&プローブセット

Name	sequence (5' to 3')	genome position
ZIKV860 Set		
ZIKV 835F	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835-857
ZIKV 860-FAM	FAM-CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG-TAMRA	860-886
ZIKV 911c	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	911-890
ZIKV1107 Set		
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086-1102
ZIKV 1107-FAM	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-TAMRA	1107-1137
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162-1139

分担研究報告書

輸血血液におけるHTLV-2の検出法開発に関する研究

研究分担者 大隈 和 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨：近年我が国ではHTLV-1感染者が感染率の高いとされる九州・沖縄地方から大都市圏に拡散する傾向にあり、全国的な対策が進んでいるが、HTLV-1の近縁株のHTLV-2の国内感染の報告はこれまでほとんどなく、HTLV-2の感染対策は充実していない。しかしながら海外ではHTLV-1だけでなくHTLV-2の感染が問題となっており、供血スクリーニングにHTLV-2検査を実施する国も少なくない。HTLV-2が将来的に日本の国内に侵入し蔓延することが懸念される。そこで本研究では、HTLV-2を検出できるPCR primerセットを新規に複数準備し、PCRを用いたHTLV-2核酸検査法を確立することを目的とした。最も増幅効率の良いprimerセットを選択し、HTLV-2感染細胞株を用いて本検査法の感度を調べた。その結果、10コピー/10⁴細胞程度の感度を確認できた。現在、本検査法の有効性をさらに評価するための、臨床検体の準備を進めている。今後もHTLV-2の国内侵入・感染の発生に備えて、核酸検査法などを整備、充実させていくことが必要と考えられた。

研究協力者

相良康子 日本赤十字社九州ブロック血液センター
課長

倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
研究員

せる必要がある。

本研究では、HTLV-2の国内感染の発生に備えて、感染を確認することができるHTLV-2核酸検査法を確立することを目的とした。

A. 研究目的

ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)は、1986年に献血スクリーニング検査が導入されて以来、日本国内で輸血感染例はなく輸血の安全性が高いレベルで保たれている。またHTLV-1のスクリーニング検査が2010年末に妊婦健診項目に追加され、日本国内の検査体制が充実しつつある。HTLV-1の近縁株であるHTLV-2については、国内感染の報告はこれまでにほとんどなく、献血や妊婦健診においても抗体スクリーニングは実施されていない。

しかしながら世界的にはHTLV-1に加えHTLV-2の感染が問題となっており、海外で使用される主なHTLV抗体検査の体外診断薬では、HTLV-1およびHTLV-2の両方の抗体を検出するシステムが組み立てられている。例えば、米国では供血スクリーニングでHTLV-1/2の抗体検査が実施され、HTLV-2感染者はHTLV-1感染者の約3倍多く、14.7人/100,000人と報告されている。またブラジルにおいてもHTLV-1/2の感染率は0.4~10/1,000人と多く、1993年から献血スクリーニングにHTLV-1/2両方の抗体検査が導入されている。

これまでHTLV-2の主な流行地域は、アフリカや北アメリカ、中央アメリカ、南アメリカと考えられてきたが、人類社会がグローバル化した現代において、日本国内にHTLV-2が侵入しないことは想定しにくく、HTLV-2感染が国内で蔓延する前に検査体制を充実さ

B. 研究方法

・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-Om1)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。

・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)

HTLV-1判定保留臨床検体を用いたHTLV-1核酸検査の実施については、国立感染症研究所の倫理審査で承認されている。

C. 研究結果

・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 (Table 1)。

Table 1 Primerリスト

Forward Primer	HTLV-2 nt NC 001488
Fwd1: GCCCAYTCCAGGWTTYG GACAGAG	7213-7238
Fwd2: GCGAYTGTGTACARGCCGAYTGTTG	7271-7295
Fwd3: ACCTGGGACCCCATCGATGGACG	7372-7394
Fwd4: SCTCTMCAATTCCTATCCCTCG	7408-7430
Fwd5: CTCCGKCCCAAAACRTGTACACC	7621-7644

Reverse Primer	HTLV-2 nt NC 001488
Rev1: CGTCCATCGATGGGGTCCAGGT	7394-7372
Rev2: GGTGTACAYGTTTTGGGGMCGGAG	7644-7621
Rev3: CYTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT	7999-7975
Rev4: GAYTGTAGYACYAAAGATGGCTG	8027-8005

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-Om1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。

・ HTLV-2 primerの感度確認

次に、TL-Om1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-Om1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/10⁴細胞、HTLV-2は10コピー/10⁴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 (Figure 1)。

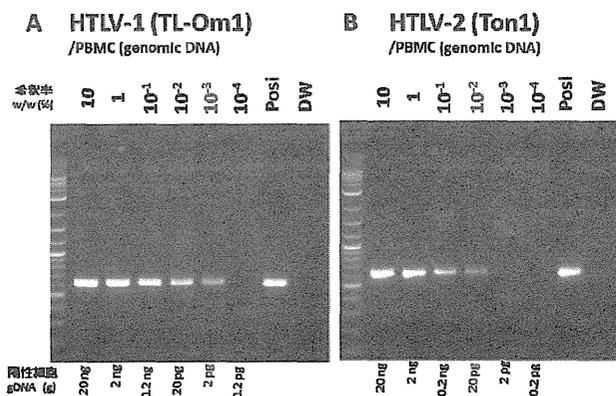


Figure 1 新規HTLV-2検出Primerの感度確認

・ 臨床検体の準備

日本赤十字社から供与された、献血スクリーニングにおけるHTLV-1抗体検査のWB法判定保留検体のうち、HTLV-1核酸検査で検出感度以下となった検体が複数得られた。これらの検体について、Fwd3-Rev3を用いた本核酸検査法により、HTLV-2の検出を試みる。

D. 考察

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 10⁴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。

またHTLV関連・近縁株との相同配列の解析の結果、新規に同定したPrimer Fwd3-Rev3は、HTLV-2のみならず、HTLV-3/4, STLV-1/2とも高い相同性を示すことが明らかになった (Figure 2)。

	Forward primer	Similarity	Reverse primer	Similarity
HTLV-1	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 	23 100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT - - - - - - - - - -	25 100%
	Subjet 7483 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG	7505	Subjet 8110 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT	8086
HTLV-2	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 	23 100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT - - - - - - - - - -	25 92%
	Subjet 7374 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG	7396	Subjet 7999 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT	7975
HTLV-3	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 	23 100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT - - - - - - - - - -	25 96%
	Subjet 7403 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG	7425	Subjet 8036 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT	8056
HTLV-4	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 	23 100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT - - - - - - - - - -	25 92%
	Subjet 7278 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG	7300	Subjet 7908 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT	7881
STLV-1	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 	23 96%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT - - - - - - - - - -	25 92%
	Subjet 7456 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG	7478	Subjet 8059 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT	8035
STLV-2	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 	23 100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT - - - - - - - - - -	25 92%
	Subjet 7826 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG	7848	Subjet 7993 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT	7929

Figure 2 Fwd3およびRev3のHTLV近縁株とのHomology

このことから、HTLV-1抗体検査では判定不能であるもしくは判定が困難な検体などを用いて本PrimerによるPCRで検討することにより、既知・未知のHTLV関連・近縁株を網羅的に検出できる可能性があると考えられた。

E. 結論

本年度の検討により、将来的なHTLV-2国内感染の発生に備えて、HTLV-2核酸検査法の整備・充実に取り掛かることができた。今後は臨床検体を用いて検討を進め、正確にHTLV-2または近縁株を検出できるか評価し、本検出系の有用性について明らかにしていく。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, et al.
Identification of TL-Om1, 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. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし