

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政策研究事業
分担研究報告書

アカイエカの飛翔能力と行動範囲に関する研究

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)

産卵場所を探索する成虫の行動範囲について検討した。周囲を川で囲まれた庭園の一部で、起伏がなく大部分が芝で覆われている 450 m×350 m の範囲を対象として、この範囲内にある雨水マスの分布とこれら雨水マスにおける蚊幼虫の有無を調べ、その分布集中度を分析した。調査地を 25 m 四方の区画に区切って、雨水マスの分布を分析したところ集中度指数は 2.2 となり、集中分布であることが示唆された。同様の分析をアカイエカ幼虫の分布について行ったところ、集中度指数は 1.04 で、ランダムな産卵行動によって期待されるランダム分布に従っていることが分かった。産卵期のアカイエカ成虫は本研究の調査範囲全体を飛翔し、遭遇する雨水マスをランダムに選んで産卵していると推測された。

フライトミル（虫を固定し強制的に飛翔させる装置）を用いてアカイエカおよびコガタアカイエカの未吸血雌成虫を飛翔させ、連続飛翔時間と総飛翔距離を算出した。両種ともに 15℃下の方が 25℃よりも長く飛翔し、コガタアカイエカがゆっくりとしたスピードで最長 25 時間連続して飛翔する個体があったのに対し、アカイエカは 10 時間程度であり、非常にスピードは速く、短時間で頻繁に休止する様子が観察された。アカイエカの飛翔は、気流を利用して長距離を飛翔するコガタアカイエカとは大きく異なるが、15℃では約 4.5 km は飛翔可能であると推測された。

A. 研究目的

アカイエカは、国内にウエストナイル熱が侵入した際に媒介蚊となる可能性が最も高いと考えられる潜在的媒介蚊である。アカイエカの成虫は日没前の薄暮時期から飛翔活動を始め、動物の臭いや二酸化炭素などを頼りに吸血源を探す。主に屋外で活動するヒトスジシマカとは異なり、屋内に好んで侵入し、夜間にヒトを吸血する。その吸血嗜好は柔軟性に富み、生息環境に合わせて吸血源動物を利用することができる。特に、鳥類と哺乳類への吸血嗜好が高いため、ウエストナイル熱のような鳥類由来感染症を鳥類か

ら哺乳類へ伝搬するブリッジベクターとして貢献すると考えられている。その飛翔範囲は一般的には 2~4 km と考えられているが、具体的な調査・実験に基づく検討は限られる。

雌蚊の行動範囲は生理的な状態によって大きく異なるため、以下の 3 つの状態の個体を区別して検討することが必要である。(1) 吸血源動物を探索する未吸血個体、(2) 吸血に成功して未消化の血液を保持する個体、(3) 血液を消化し卵巣も成熟して産卵のための場所を探索する個体。これまでアカイエカの飛翔範囲に関しては、(1)と(2)の個体を対象としてマーキン

グや吸血源動物の同定結果に基づく実験的な研究が進められてきたが、(3)の産卵する個体の行動範囲に関しては適切な調査方法がなく、参考となる知見はほとんどない。本研究では、広い庭園の植生が比較的均一な部分を調査対象に選び、幼虫の空間分布様式を分析することによって、産卵個体の行動様式と行動範囲の推測を行った。

一方、フライトミルという装置を用いて昆虫を強制的に飛翔させ、その潜在的な飛翔能力を推定する方法は、特に長距離移動性の害虫（ウンカやヨトウムシ等）に用いられ、長距離移動や海外飛来の可能性が議論されている、しかし、衛生昆虫類においては、近年、日本脳炎ウイルスの媒介蚊であるコガタアカイエカが海外より飛翔してくる可能性が示唆されているものの、具体的な飛翔実験にもとづく検討は行われていない。そこで本研究では、上述した(1)の未吸血の状態の雌蚊成虫を用いてフライトミルによる飛翔実験を行い、吸血源を探索する飛翔距離を推測した。

B. 研究方法

1) 産卵期のアカイエカ成虫の行動範囲

調査は、周囲を河川で囲まれた広さ 450 m×750 m（面積約 133,000 m²）の庭園で実施した。この庭園の中央部で比較的均一な植生の場所 450 m×350 m を調査地として、この範囲に設置されている雨水マス 195 個の蚊幼虫の発生状況を調べた。調査結果に基づき、アカイエカ幼虫が発生していた雨水マスの位置を地図上に記録して幼虫の空間分布を作成した（図 1）。分布地図を 25 m 四方のグリッドに区分けし、区画ごとに幼虫が発生していた雨水マスの数を集計した。幼虫の分布様式を分析するために、雨水マスが少なくとも 1 つ

ある区画を対象として、区画当たりの平均幼虫発生雨水マス数 (m) とその分散 (s^2) を算出し、分布の集中度指数 (s^2/m) を求めた。

2) アカイエカの飛翔能力の評価

フライトミル（虫を固定し強制的に飛翔させる装置）は、九州沖縄農業研究センター（熊本県合志市）に設置されている装置を使用し、松村正哉、大塚彰両博士の協力を得て実施した。飛翔実験に用いたアカイエカおよびコガタアカイエカ雌成虫は、国立感染症研究所で 25°C 長日条件下に飼育・維持された系統である。両種ともに羽化後約 1 週間の未吸血の雌成虫を 15°C 長日あるいは 25°C 長日の温度条件下で飛翔させた。本実験装置の特徴として、偶然に翅を動かしても装置が回転することがあるため、5 秒間に 3 回以上回転した回数のみを集計し、連続飛翔時間と総飛翔距離を算出した。

C. 研究結果

1) 産卵期のアカイエカ成虫の行動範囲

図 1 に示すように、調査地を 25 m 四方の区画に区切って雨水マスの分布を分析したところ、雨水マスの区画当たり平均個数と分散は 1.02 および 2.24 であった。集中度指数 (s^2/m) を求めたところ 2.2 となり、調査範囲内に集中して分布していることが示された。同様の分析をアカイエカ幼虫が発生していた雨水マスの空間分布（図 1 の黒丸）について行ったところ、区画当たりの幼虫発生雨水マスは平均 0.81 個で分散は 0.84 であった。集中度指数は 1.04 となり、アカイエカ幼虫が発生している雨水マスは調査範囲内にランダムに分布していることが分かった。

2) アカイエカの飛翔能力の評価

アカイエカの総飛翔距離を算出したところ、最長で約 10 時間羽ばたく個体も確認されたが (表 1), その飛翔パターンを観察すると, 5 秒間に 5 回以上 (最高で 20 回回転する個体も確認) の非常に速いスピードで羽ばたくが, 短時間で頻りに休止する様子が確認された (図 2). 一方, コガタアカイエカは 5 秒間で 5 回以下の非常にゆっくりとしたスピードで翅を羽ばたかせ (図 2), 最長 25 時間連続して飛翔する個体も確認された (表 1). また, アカイエカの 25°C での連続飛翔時間は 0.2 時間で約 100 m であったが (コガタアカイエカは 7.5 時間で 8.2 km), 15°C では連続 5 時間で 4.5 km 飛翔すると推測された (コガタアカイエカは約 13 時間で 14 km) (表 1).

D. 考察

雨水マスは庭園内の排水システムの一部であり, その多くは遊歩道に沿って設置されている. そのため園内の雨水マスの分布はランダムではなく, ある場所に集中する傾向が示されていると考えられる. これに対して, アカイエカの幼虫が発生している雨水マスは, 雨水マスがある区画に対して, ランダムに分布していた. この結果は, 雨水マスに幼虫発生源としての質的な違いがなく, アカイエカ幼虫が発生する確率 (=成虫が産卵する確率) はどの雨水マスでも同じであったことを意味している. 雨水マスに産卵する確率が一定となるためには, 産卵雌は本研究で調査対象としたエリア全体を飛び回って雨水マスを探し, その中のひとつをランダムに選んで産卵していると考えられ, アカイエカはこのような行動様式を持っていると思われる. 従って, 産卵期のアカイエカの行動範囲は少なくとも 450 m×350 m ほどの広がりがあると推

測された.

吸血源を探索するための雌蚊の移動距離をフライトミルを用いて推測したところ, アカイエカは 25°C では平均 100 m 程度 (最高でも約 300 m) しか飛翔しなかったが, 15°C では 4.5 km (最高で約 10 km) 飛翔可能と推測された. コガタアカイエカでも同様に, 15°C では 25°C よりも飛翔距離が長い (約 1.7 倍) 結果が得られたが, アカイエカではその差は 50 倍以上もあった. 両種ともに涼しい気温では広範に吸血源探索を行うと推察される. また, その飛翔パターンや先行研究の結果から, コガタアカイエカは気流を利用して長時間・長距離を飛ぶことが可能と考えられるが, アカイエカは吸血源を探して約 4.5 km は飛翔できるものの, 長距離移動性は有していないと推察された. 本研究では, (1) 吸血源動物を探索する未吸血個体の飛翔能力を推定したが, (2) 吸血に成功して未消化の血液を保持する個体, (3) 血液を消化し卵巣も成熟して産卵のための場所を探索する個体については検討していない. ウイルスを保有した雌蚊の移動距離を評価するためには, 温度・日長等の季節的な条件が重要であるが, (2)(3)の生理状態の雌蚊についても検討する必要があると考える.

E. 結論

雨水マスを単位として, アカイエカ幼虫の空間分布を調べその分布様式を調べた. その結果, 幼虫発生雨水マスの集中度指数は 1.04 となり, アカイエカ幼虫が発生している雨水マスは調査範囲内にランダムに分布していることが分かった. この結果から, 産卵期のアカイエカの行動範囲は, 少なくとも 450 m×350 m であると推測された.

アカイエカは 25°C では連続して 0.2 時

間、約 100 m しか飛翔しなかったが、15℃では 5 時間、4.5 km 飛翔可能であることが示唆された。アカイエカは、吸血源を探して約 4.5 km は飛翔できるものの、コガタアカイエカのような長距離移動性は有していないと推察された。

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

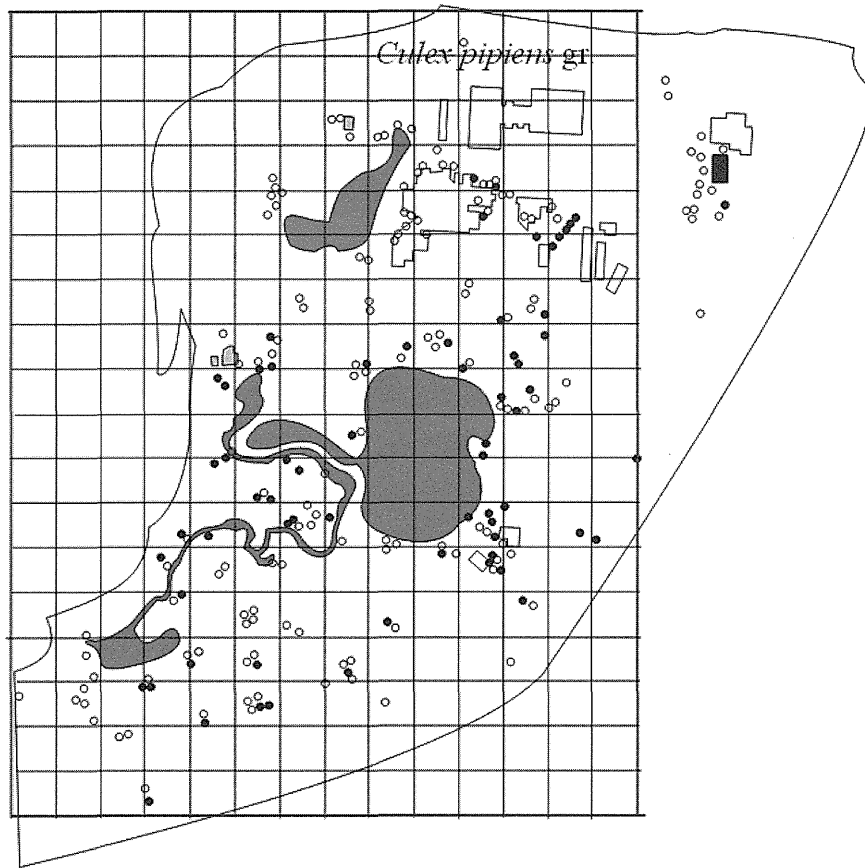


図1 調査地内の雨水マスの分布(○と●)とアカイエカ幼虫が発生していた雨水マス(●)の分布を示す地図(区画の大きさは25m四方)

表1 コガタアカイエカおよびアカイエカの総飛行時間および総飛行距離

	アカイエカ (n=5)		コガタアカイエカ (n=5)	
	15℃	25℃	15℃	25℃
全飛行距離 (km)	4.56 (0.04-10.4)	0.09 (0-0.3)	13.94 (5.7-26.0)	8.20 (6.4-9.0)
全飛行時間 (h)	5.07 (0.1-9.9)	0.20 (0-0.6)	12.79 (6.8-25.0)	7.50 (5.1-9.2)
平均速度 (km/h)	0.90	0.42	1.09	1.10

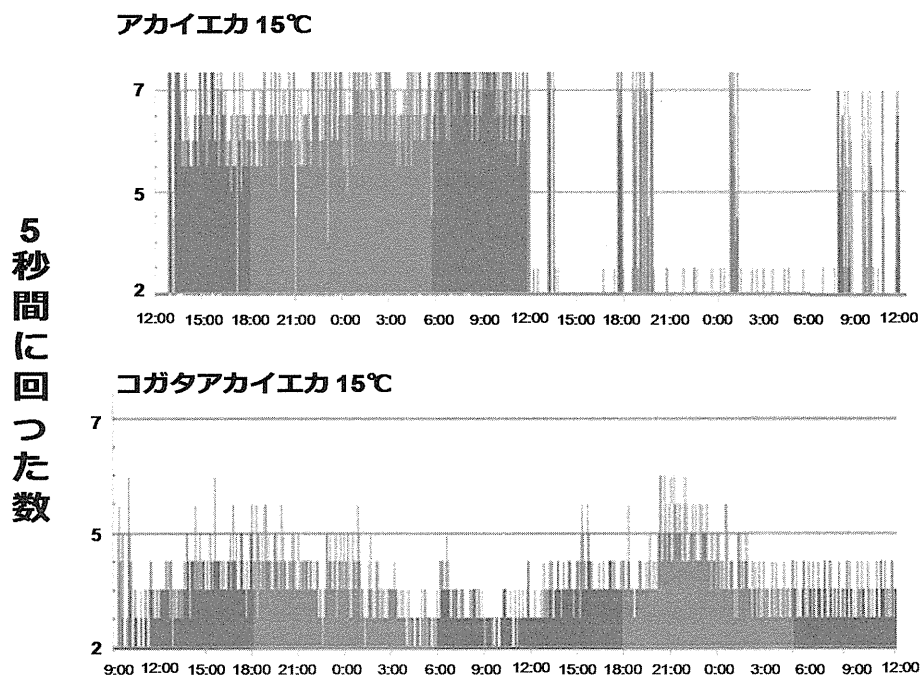


図2 フライトミルによるアカイエカ（上段）およびコガタアカイエカ（下段）の飛行パターンの比較

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政策研究事業
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 平 力造（日本赤十字社 血液事業本部安全管理課長）

研究要旨：日本赤十字社では、ノバルティス社（Grifolis 社）製 PANTHER システムを全国 8 施設に導入した。同システムを使用したウエストナイルウイルス（WNV）検出用の試薬について非感染性の WNV 液を用いて精度試験を行った結果、95%検出限界感度は 23.9copies/mL（95%CI：16.3～44.2）であり、試薬の添付文書を同等な結果が得られた。また、特異性試験においても、ALT 検査不適献血者検体 500 本を NAT を実施したが、全て陰性で、陽性又は偽陽性は確認されなかった。

A. 研究目的

日本赤十字社では、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 システムを全国 8 施設に導入し、個別検体によるスクリーニング NAT（HBV、HCV、HIV）を開始した。同システムは、ウエストナイルウイルス（WNV）も測定可能であり、危機的状況下においてはこれまで以上に迅速かつ広域的な対策も可能となった。

現在、関東甲信越ブロック血液センター（東京都辰巳）に、WNV 国内発生に備えて PANTHER 用試薬（Procleix WNV ABD Assay：Novartis 社製）を 5,000 テスト分備蓄している。

同試薬の感度等については、Health Canada WNV Reference Standard を使用し PANTHER システム（全自動）と以前使用していた e-SAS システム（手動）の 50%LOD

と 95%LOD を試薬感度等について添付文書に基づき評価した結果、同等以上であることを平成 26 年度に報告した。

本年度は、入手可能な非感染性の WNV 液を使用した感度試験等と実検体による特異性試験を実施した。

また、併せて平成 23 年に実施した e-SAS システムを使用した感度試験結果と比較する。

B. 研究方法

（1）感度試験

非感染性として WNV 液（NATtrol™ West Nile Virus（ZeptoMetrix 社製：NY-2001-6263, 10,000cp/mL）を希釈用陰性血漿で希釈し、100、50、25、12、6、3、1copies/mL 濃度のウイルス添加血漿を作製し、PANTHER システムを使用し、24 重測定（8 重測定を 3 日間（回））した。

（2）特異性試験

実検体 (ALT 検査不適検体) 500 本を使用し、PANTHER システムを使用し、測定した。

C. 研究結果

(1) 感度試験

PANTHER システムを使用した 95% 検出限界感度は 23.9 copies/mL (95%CI : 16.3 ~ 44.2)、50% 検出限界感度は 4.9 copies/mL (95%CI : 3.7 ~ 6.4) であった。(Fig-1) 25 copies/mL、50 copies/mL、100 copies/mL の検出率は 100% であった。添付文書 (Table-1 : PANTHER システム: カナダ保険省の WNV 標準品) では、95% 検出限界感度は 11.9 copies/mL (95%CI : 9.6 ~ 15.9)、50% 検出限界感度は 2.0 copies/mL (95%CI : 1.6 ~ 2.4) であり、検出率は 30 copies/mL、100 copies/mL で 100% であった。

(2) 再現性試験

ア. 同時再現性

95% 検出限界感度以上を示した 3 濃度 (100、50、25 copies/mL) については、各 3 回の 8 重測定結果は全て陽性であった。

イ. 日差再現性

95% 検出限界感度以上を示した 3 濃度 (100、50、25 copies/mL) については、各 3 回 (測定日毎) の測定結果は全て陽性であった。

(3) 特異性試験

ALT 検査不適献血者検体 500 本は、NAT を実施したが全て陰性で、陽性又は偽陽性は検出されなかった。

D. 考察

前回の e-SAS による PANTHER 用試薬 (Procleix WNV ABD Assay : Novartis 社製) 検討では、非感染性の WNV 液の劣化等によって期待する検出感度が得られなかったが、今回の結果では、試薬添付文書とほぼ同等の検査結果が得られ、再現性においても充分の性能をしめした。特異性試験においても、陽性コントロールや陽性検体と陰性検体の S/Co が明確に分離されており、比較的非特異反応が起こりにくい試薬検出系となっていることが示唆された。

E. 結論

PANTHER システム (自動化) を使用した検査体制を構築しており、今回、その試薬の感度試験等の結果から、その精度については充分なパフォーマンスがあることが確認された。また来年度は、さらに WNV 熱国内発生時の検査対応におけるシミュレーションと対応マニュアル案の策定を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

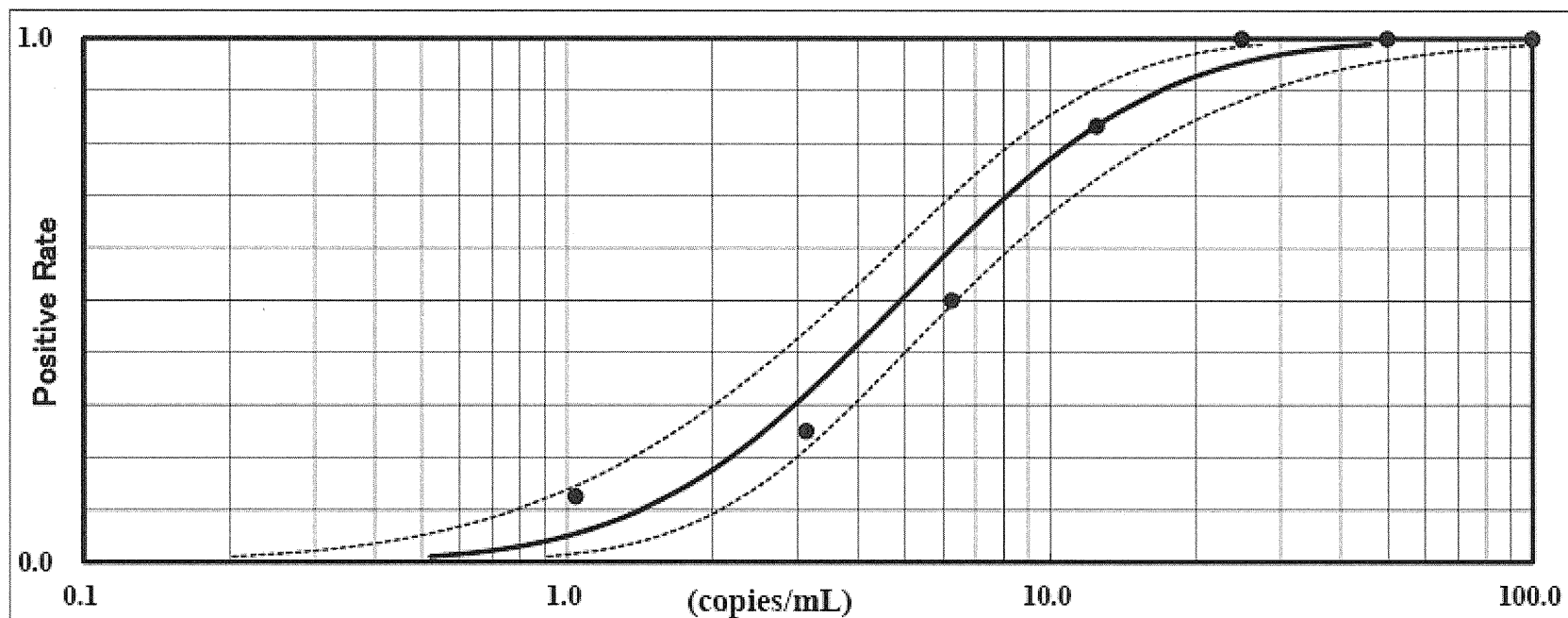
1. 学会発表

なし

2. 論文発表

なし

95%検出限界感度 (PANTHERシステム (Plocleix WNV ABD Assay))



検体	95%検出限界感度			50%検出限界感度			単位
	検出感度	95%信頼区間		検出感度	50%信頼区間		
		下限	上限		下限	上限	
NATtrol™	23.9	16.3	44.2	4.9	3.7	6.4	copies /mL

Fig-1

分析感度

カナダ保健省の WNV 標準品から作製した感度パネルを使用した Procleix Panther System および Procleix TIGRIS System における Procleix WNV ABD の分析感度の測定

カナダ保健省から入手し、段階希釈した WNV からなる分析感度パネルでアッセイの感度を評価した。熱処理して組織培養したウイルスのストック (1,000 コピー /mL) を段階希釈して WNV パネルを作製した。Procleix Panther および Procleix TIGRIS System 双方を使用して同じパネルを分析した。3 機を使用し、試薬 3 ロットで各コピー数につき均等に 48 の繰り返し測定、合計 144 の繰り返し測定を分析した。反応性率の 95% 信頼区間 (CI) はスコア法に基づき計算した。プロビット解析で求めた 50% および 95% 検出率の推定値を記載した。

Procleix WNV ABD による WNV の検出率は、Procleix Panther および Procleix TIGRIS System 双方において 100 コピー /mL および 30 コピー /mL で 100% となった。10 コピー /mL の反応性率は、Procleix Panther System および Procleix TIGRIS System においてそれぞれ 92% および 97% であった。3 コピー /mL の検出率は、Procleix Panther System および Procleix TIGRIS System においてそれぞれ 52% および 65% であった (表 5)。

表 5. カナダ保健省の分析感度パネルにおける WNV の検出率

パネル	Procleix Panther System						Procleix TIGRIS System						
	WNV コピー /mL	反応性あり / 分析数 *	反応性率 (%)	95% CI		平均 S/CO**	%CV	反応性あり / 分析数 *	反応性率 (%)	95% CI		平均 S/CO**	%CV
				下限値	上限値					下限値	上限値		
100	144/144	100	97	100	31.89	7	144/144	100	97	100	31.50	7	
30	144/144	100	97	100	32.01	6	144/144	100	97	100	31.63	7	
10	133/144	92	87	96	31.00	15	139/144	97	92	99	29.37	21	
3	87/144	60	52	68	28.02	33	93/144	65	56	72	25.13	38	
1	49/144	34	27	42	28.51	27	44/144	31	24	39	21.39	48	
0	0/144	0	0	3	0.01	267	0/144	0	0	3	0.05	158	

CI = 信頼区間

S/CO = シグナル / カットオフ比

CV = 変動係数

* 有効な反応性のみを含めた。

** 反応性が認められた繰り返し測定の平均。全分析において反応性なしとなったものを除く (この場合、反応性なしとなった繰り返し測定の分析対象物の S/CO 平均値を示した)。

プロビット解析

分析感度の結果についてプロビット解析を行い、標的それぞれの 50% および 95% 検出率の推定値を求めた。カナダ保健省の感度パネルを用いた Procleix WNV ABD による WNV の 95% 検出率の予測値は、Procleix Panther System が 11.9 コピー /mL、Procleix TIGRIS System が 8.9 コピー /mL であった (表 6)。

表 6. カナダ保健省の標準品から作製した感度パネルにおける WNV の検出率 *

システム	検出率 (コピー /mL)	
	50% (95% FL)	95% (95% FL)
Procleix Panther System	2.0 (1.6 ~ 2.4)	11.9 (9.6 ~ 15.9)
Procleix TIGRIS System	2.0 (1.6 ~ 2.3)	8.9 (7.3 ~ 11.5)

FL = 信頼限界

* プロビット解析の結果はいずれもはゴンベルツモデルを適用している。

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 感染予防のための研究

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。我が国には存在しないが、海外から持ち込まれ輸血用血液製剤に混入した場合のリスクを解析した。マクロファージ様細胞に分化させた TPH 細胞株に鞭毛型 Leishmania を感染させ無鞭毛型原虫を得た。これを血漿に添加し、4℃、室温、- 20℃の各温度で保存し、生存率を解析した。4℃、3 週間保存で約 2Log 感染価が低下した。一方、- 20℃では生存は確認できなかった。また、白血球除去フィルターを用いて除去するとアルブミン液では 5Log、血漿では、4Log の除去が認められた。白血球除去フィルターがヒト血中に存在する Leishmania 原虫を除去するために非常に有効であることが示唆された。

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。不顕性感染の献血者が献血した場合に現行の製法 (白血球除去や保存温度) で製造された血液製剤の感染リスクを明らかにすることを目的とした。Leishmania 原虫は、マクロファージに主に感

染することから白血球除去フィルターが感染防御に有用であるとの報告があるが、詳細に解析した報告はない。

B. 研究方法

(1) Leishmania の無鞭毛型原虫の培養法

Leishmania donovani (以下 L. donovani と略) は 10%FCS 添加 ショウジョウバエ細胞培養液で 25℃、炭酸ガス濃度 5% で培養した。この条件では鞭毛型原虫が増殖する。ヒト単球細胞株である THP-1 にホルボールエステルを最終濃度 100nM になるように添加し、24 時間 37℃ で培養し、マクロファージ様細胞株を誘導した。これに MOI 10 ~ 20 になるように鞭毛型原虫を添加し、37℃ で

培養した。感染1日後と3日後に培養液を交換し、

鞭毛型原虫を取り除いた。感染5日後に THP-1 細胞と cell - free の無鞭毛型原虫を集めた。

(2) 血液製剤中での生存率の解析

感染させた THP-1 細胞と cell-free の無鞭毛型原虫をヒト血漿に添加し、赤血球製剤を想定して 4°C で 4 週間保存、血小板を想定して室温で 1 週間保存、新鮮凍結血漿を想定して -20°C で 2 ヶ月冷凍保存した、その間に経時的に検体採取して *L. donovani* 原虫の生存率を検討した。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、25°C、CO₂5% で 4 週間培養後増殖してくる鞭毛型原虫の有無を顕微鏡下に観察した。各希釈で増殖が観察できたウエ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。

(3) 白血球除去フィルターによる *Leishmania* 原虫の除去効果の解析

L. donovani を THP-1 に感染させ、感染後 5 日目の THP-1 と cell free 無鞭毛型原虫を遠心で集め、ヒト血漿 200mL に添加した。3 mL を白血球除去フィルター濾過前の検体として採取した。白血球除去法は添付文書に記載された手順で実施した。白血球除去フィルター濾過後の検体は、チューブやバッグに残存したが約 185mL 回収できた。濾過検体は、1) そのまま感染価を測定、2) 遠心してペレットの感染価を測定、3) 100mL を遠心し、ペレットを 1mL に溶解して感染価を測定、の 3 つの方法で感染価を評価した。

(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。2014 年のフランスの発生状況は 2013 年度からの増加数で評

価した。

C. 研究結果

(1) 血液製剤中での生存率の解析

4°C 保存では、2 週間で 1 Log、3 週間で 2 Log

以上感染価は減少した。4 週間では感染価は検出感度以下に減少した (図 1)。-20°C 保存では、評価した 1~8 週間の何れでも感染性は確認できなかった (図 1)。室温保存では、感染価の低下は認められなかった。

(2) 白血球除去フィルターによる *Leishmania* 原虫の除去効果の解析

白血球除去フィルター濾過前では、総感染価は 1.7×10^7 であった。濾過したそのままの検体からは感染性は確認できなかったが、100 倍に濃縮した検体から感染性が検出され、濾過後の総感染価は 1.2×10^3 であった (図 2)。白血球除去フィルターによる *L. donovani* の除去効率 は約 10^4 と評価された。

(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。英国では、2012 年と 2014 年は 0 名だが、2013 年に 1 名、フランスでは 2013 年と 2014 年にそれぞれ 1 名感染者の報告があった。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ていない。

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等の献血者が感染している可能性がある。発症している

場合には、皮膚病変や網内系の病変によって献血の間診で献血を阻止できると考えられる。一方、無症候性感染者の場合には献血する可能性がある。地中海沿岸の国々ではこのような感染者からの輸血による感染例が報告されている。そこで現行の我が国で実施されている輸血用血液の製造や保存によって Leishmania 原虫の感染リスクがどの程度減少するのか評価することは、輸血の安全性確保の為に重要である。人体内では Leishmania 原虫は、無鞭毛型として主にマクロファージに感染し、一部は cell free で存在するとされている。今回の検討で凍結によって原虫は短期間で死滅すること、4℃や室温では血液製剤の有効期間内は生存することが明らかになった。また、白血球除去フィルターは、leishmania が感染した細胞や原虫を効率良く除去できることを示すことができた。無症候性の感染者には、最大 400mL の血液中に約 2000 個の感染細胞や無鞭毛型原虫がいると推定されており、白血球除去フィルターは感染防止に非常に有効であることが示された。来年度は、赤血球製剤の白血球除去による有効性を評価する予定である。

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。フランスは英国に 6 年遅れて変異型 CJD の死亡件数がピークとなり、この 2 年間でそれぞれ 1 名の死亡例が報告されている。死亡例は、0 とはならず未発症の感染者が存在していることから疫学調査と長期的に対策を取り続ける必要がある。

E. 結論

輸血による Leishmania 感染症を防止するために保存温度における生存率を検討した。-20℃で

は感染価は検出感度以下にまで低下したが、4℃や室温では感染性が残存していた。一方、白血球除去フィルターによる Leishmania 除去効率は約 4 Log と非常に感染防止に有効であることが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

岩尾 憲明、加藤 栄史、小高 千加子、高本 滋、佐川 公矯、藤井 康彦、米村 雄士、田中 朝志、岡崎 仁、岡田 義昭、他 10名:輸血副作用サーベイランスにおける underreporting、日本輸血細胞治療学会誌、61巻、561-566、2015年

2. 学会発表

1) 山田攻、鈴木雅之、内野富美子、小林清子、池淵研二、岡田義昭:Polyagglutination が一過性に認められた交通外傷の一症例、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成27年4月、東京

2) 池淵研二、武内信一、山田攻、小林清子、岡田義昭:血液保冷库・冷凍庫用温度管理システムの提案、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成27年4月、東京

3) 岡田義昭、小林清子、池淵研二:パルボウイルスB19のin vitro感染系を用いた中和活性の測定と血漿分画製剤の原料血漿規格への応用、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成27年4月、東京

4) 内田理恵子、水沢左衛子、岡田義昭、皆木隆男、高倉明子、他6名:血液製剤のウイルス安全性確保;パルボウイルス B19 DNA 参照パネルの

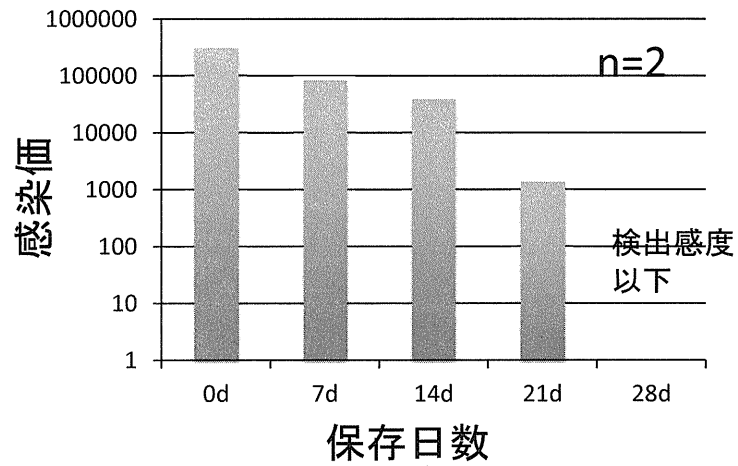
樹立に関する共同研究、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成27年4月、東京

5) 水沢左衛子、落合雅樹、内田茂治、高倉明子、内田理恵子、山口照英、浜口功、岡田義昭: パルボウイルス B19 DNA 国内標準品作製のための共同研究、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成27年4月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

4°C保存における生存数(血漿)



-20°C保存における生存数(血漿)

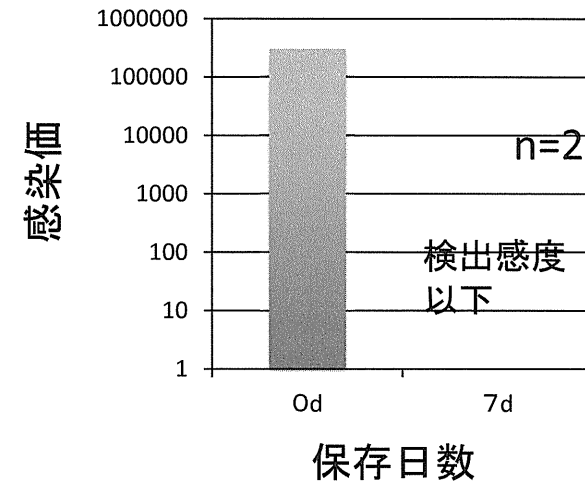
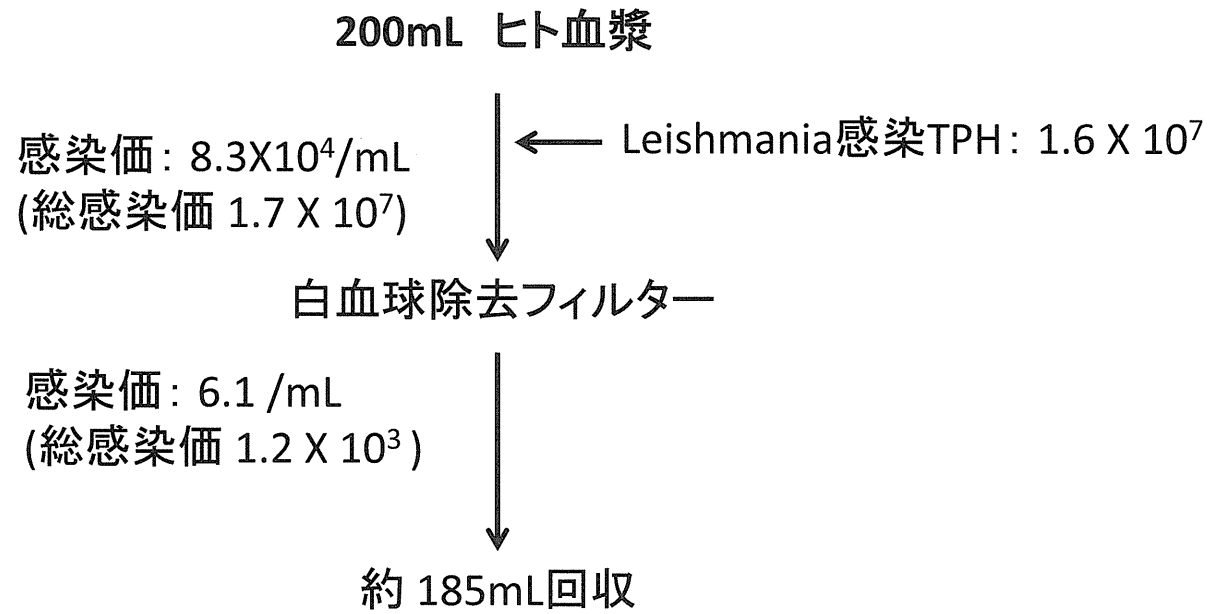


図1 血漿における Leishmania原虫の生存率



$$\begin{aligned}
 \text{除去効率} &= \text{Log } 1.7 \times 10^7 / 1.2 \times 10^3 \\
 &= 10^{4.15} \\
 &= \text{約 } 10^4
 \end{aligned}$$

図2 白血球除去フィルターによるLeishmaniaの除去
(ヒト血漿)

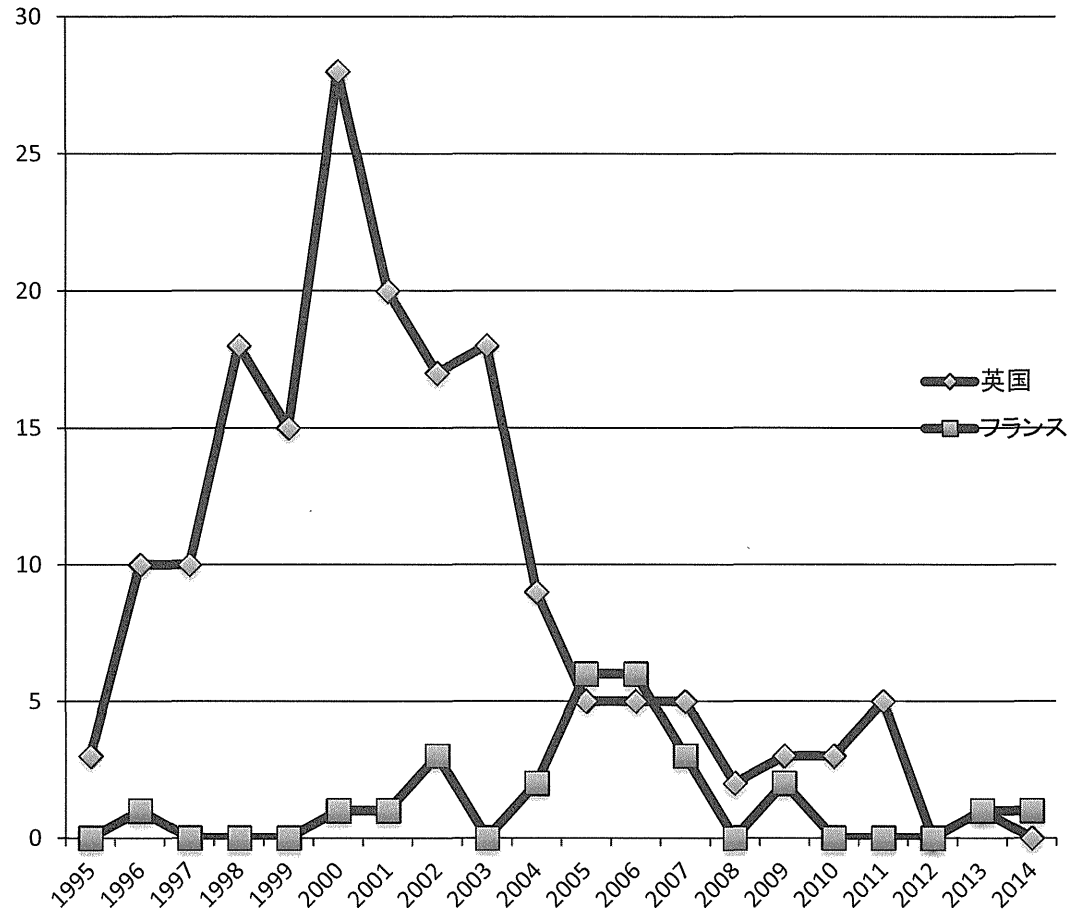


図3 英国とフランスにおけるvCJDの死亡数

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政策研究事業
分担研究報告書

日本脳炎ウイルス・ウエストナイルウイルス共通遺伝子高感度検出法の開発と評価

高崎智彦 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)

田島 茂 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)

研究要旨：2009年に中国で、2010年に韓国で日本脳炎ウイルス遺伝子5型ウイルスが検出された。現在国内では日本脳炎ウイルス血清型群のウイルス遺伝子検査法は、日本脳炎ウイルスⅠ、Ⅲ型およびウエストナイルウイルスに対するリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) が使われており、日本脳炎ウイルスⅤ型には対応していない。そこで、今年度は日本脳炎ウイルス遺伝子Ⅰ～Ⅴ型に対応し、かつウエストナイルウイルスにも対応できる TaqMan 系を開発した。

A. 研究目的

わが国では1990年代前半に、日本脳炎ウイルスの遺伝子型がⅢ型からⅠ型にシフトした歴史がある。ここ数年、韓国では日本脳炎ウイルス遺伝子Ⅴ型ウイルスの蚊からの検出が目立っていることから、わが国でもⅠ型からⅤ型へのシフトに備えておく必要がある。血液製剤及び献血血液の検査ではより広範囲に検出できる系が望まれることから日本脳炎ウイルスおよびウエストナイルウイルスを共通で検出できる系を開発することを目的とした。

B. 研究方法

リアルタイム RT-PCR による JEV ゲノム検出のための鋳型には、Ⅰ型株として Hiroshima/46/1998 株、Mie/41/2002 株、Mie/51/2005 株を、Ⅲ型株として JaTH160 株、JaTAn1/75 株、JaTAn1/90 株を、Ⅴ型株

として Muar 株および E 領域組換え JEV rJEV-E^{XZ0934}-M41 株を使用した。また GenBank から日本脳炎ウイルスⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型遺伝子配列情報を取得し、の塩基配列を収集し、ウエストナイルウイルスも検出できる配列のプライマーおよびプローブを設計した。Primers は JENS5s269 と JENS5r330 で、Probe は JENS5p294 である (表1)。

日本脳炎ウイルスの検出感度の評価は、Ⅰ型3株、Ⅲ型3株、Ⅴ型2株を用いて評価した。ウエストナイルウイルスの検出の評価は、NY99 株 (Lineage 1a)、Eg101 株 (Lineage 1a)、g2266 株 (Lineage 1c)、FCG 株 (Lineage 2) を用いて評価した。

C. 研究結果

日本脳炎ウイルスの検出感度は、目標とした ct 値 20～25 の範囲内に入り、十分な

感度を示した。一方ウエストナイルウイルスに関しては、NY99 株と Eg101 株は、日本脳炎ウイルス群と同等の感度を示したが、Lineage 1c に分類される g2266 株は ct=36.8、Lineage 2 に分類される FCG 株は ct=29.9 と感度はやや低かった。

D. 考察

日本脳炎、ウエストナイル熱/脳炎の患者あるいは不顕性感染者では血液中のウイルスが少なく感染蚊が成立することはない。しかし、輸血や血液製剤においては感染細胞がヒトの体内でしばらく生存することから、感染リスクは高い。今回作製した遺伝子検出系は、日本脳炎の5つの遺伝子型を検出できるだけでなく、現在世界で流行している Lineage 1a に属するウエストナイルウイルス株は、日本脳炎ウイルスと同程度の感度で検出できた。感度がやや劣るが Lineage 2 のウエストナイルウイルスも検出可能である。日本脳炎ウイルス遺伝子 I ~ V 型に対応し、かつウエストナイルウイルスにも対応できるリアルタイム RT-PCR 系を用いることで血液およびその関連製剤

のスクリーニングをより効率化できると考えられる。

E. 結論

新たに設計した TaqMan プライマーを用いることにより、GI、GIII 株に加え、現行の検出系では検出不可能であった GV 株のゲノムも増幅可能となった。また配列の相同性から、今回調べていない GII、GIV 株にも対応可能と考えられる。

一方、今回設計した検出系ではいくつかの lineage のウエストナイルウイルスゲノムも増幅可能なことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 学会発表
関連するものなし
2. 論文発表
関連するものなし

表1 プライマー&プローブセット

リアルタイム逆転写-PCR (TaqMan) 法; 遺伝子 1 型・3 型共通検出用(NS5)

GIGIIIGV common	プライマー	増幅領域 : NS1
	JENS5s269 GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA JENS5r330 TGT TAA CCC AGT CCT CCT GG	
	プローブ	
	JENS5p294 FAM-CTG CCT GCG TCT CA-MGB	

表 2

		Ct value
GI	Hiroshima/46/1998	21.6
	Mie/41/2002	20.5
	Mie/51/2005	23.2
GIII	JaTH160	24.8
	JaTAn1/75	22.7
	JaTAn1/90	21.7
GV (E)	Muar	20.2
	rJEV-EXZ0934-M41	21.3
D1-4, CHIK		ND
WNV(NY99)		23.9
ZKV		ND

ND : 検出されない