

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

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 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、バベシア症およびウエストナイル熱、デング熱等の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、及び媒介蚊に関する研究を行った。

シャーガス病については、全血製剤中のトリパノゾーマクルージは白血球除去フィルターにより約 4 Log の減少が認められた。赤血球製剤中では 4 日目以降から減少が認められ、21 日目には 2~4 Log 程度の減少が確認された。低温環境下(4℃)にて培養したトリパノゾーマクルージは増殖が認められなかった。リーシュマニア症については 4℃、3 週間保存で約 2 Log 感染価が低下した。-20℃では生存は確認できなかった。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 5 Log、血漿では 4 Log の除去が認められた。ヒトバベシア感染の検査法開発のため、イムノクロマト法および簡便で迅速な遺伝子増幅法である LAMP 法について検討を行った。ELISA で高い OD 値を示したヒト陽性血清ではイムノクロマト法で陽性ラインが確認されが、ELISA で低い OD 値を示した陽性血清では陽性ラインが認められなかった。LAMP は PCR とほぼ同様の陽性結果が得られた。

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に関し、精度試験を行った。95%検出限界感度は 23.9copies/mL であった。日本脳炎ウイルス及びウエストナイルウイルス両方を検出する TaqMan PCR 法を開発した。デングウイルスの 4 血清型の高感度同時検出が可能な新規マルチプレックス PCR 法を確立した。本法は、特にこれまで困難であった血液中の微量な DENV の検出に有用である。ウイルス媒介蚊について、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。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おり、また産卵期のアカイエカの行動範囲は少なくとも 450 m × 350m であると推測された。飛翔距離については、アカイエカは 25℃では連続して 0.2 時間、約 100m しか飛翔しなかったが、15℃では 5 時間 4.5km 飛翔可能であることが示唆された。以上の研究により、献血血の安全性確保と安定供給に貢献するための科学的基盤を進展させた。

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）

岡田義昭（埼玉医科大学病院血液・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）

平 力造（日本赤十字社血液事業本部安全管理課長）

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）

佐竹正博（日本赤十字社中央血液研究所 所長）

佐山勇輔（日本赤十字社中央血液研究所）

田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官）

津田良夫（国立感染症研究所昆虫医科学部 研究員）

手塚健太（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員）

浜口 功（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長）

松本千恵子（日本赤十字社中央血液研究所）

#### 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。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．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

輸血用血液製剤へ *T. cruzi* を接種し、白血球除去フィルターの低減化能および通常の保管状態における赤血球製剤の *T. cruzi* の動態を解析した。

##### 1) トリパノゾーマクルージ：

中南米出身キャリアから分離した JRC Tc-1 (DTUs TcV) および JRC Tc-2 (DTUs TcII) を用いた。各 *T. cruzi* は、Schneider's

Drosophila Mediumに最終濃度が30%になるようにFBSを添加し、25℃で培養した。原虫数は、顕微鏡下にて細胞計算盤により計測した。

## 2) 白血球除去フィルターによる低減化能の解析：

白血球除去フィルターは、セパセル・インテグラCA(旭化成メディカル)を用いた。培養した*T. cruzi*( $10^8$  parasites/Bag)を採血翌日の3名の異なる献血者由来の全血製剤に接種し、フィルター前後の検体を一部採取し、qPCRにより*T. cruzi*量を計測した。また、*T. cruzi*混入による白血球除去能への影響をみるため、CD81 DNAをターゲットとしたプライマー・プローブを用い白血球数をqPCRにより計測した。培養は、血液を培養液にて段階希釈後培養を行い、最大50日間観察し、顕微鏡下で*T. cruzi*の活動が確認されたものを陽性とした。

## 3) 赤血球製剤における*T. cruzi*の動態解析：

輸血用血液製剤は異なる3名の献血者由来の赤血球液を用いた。培養した*T. cruzi*を各製剤へ接種後、4℃にて保管をおこなった。接種後0, 4, 7, 14, 21日経過時に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。

## 4) 低温環境下における*T. cruzi*の増殖性および感染性の評価：

培地に*T. cruzi*を接種し、25℃および4℃にて培養をおこなった。接種後定期的にそれぞれ採取し、qPCRによる*T. cruzi*量の測定および感染性を評価した。感染性の評価は、採取した*T. cruzi*を段階希釈後、MRC-5細胞(ヒト線維芽細胞、ATCC)に接種し、37℃にて培養を行った。7日後に細胞を固定後、

間接蛍光抗体法でamastigotesの観察を行った。

## 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。ヒト単球細胞株であるTHP-1にホルオ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。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℃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℃で2ヶ月冷凍保存した、採取した検体は、シ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℃、CO<sub>2</sub>5%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TCID<sub>50</sub>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。3mL

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回収した。濾過検体は、そのまま感染価を測定、遠心してペレットの感染価を測定、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。

### 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。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。

4. バベシア感染の検査法に関する研究：  
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ため、ICT および LAMP 法の確立をおこなった。

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) *B. microti* 遺伝子増幅用の LAMP プライマーの設計：

*B. microti* の 18S ribosomal DNA (rDNA) 遺伝子情報を基に、LAMP 用の プライマー 4 種類 (F1P、B1P、F3、及び B3) を設計した。また、F1P、B1P の配列を基に PCR 用の プライマーも設計した。

3) LAMP の感度の検討：

*B. microti* の グレイ株と ミュンヘン株から DNA を抽出し、3 種類の DNA 量を用いて検出感度について検討を行った。

4) ヒト DNA を用いた PCR と LAMP の検討：

*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。

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：

日本赤十字社では、平成 26 年 8 月 1 日採血分よりノバルティス社 (Grifolix 社) 製 PANTHER システムを全国 8 施設に導入した。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。WNV 国内発生に備えている PANTHER 用試薬 (Procleix WNV ABD Assay : Novartis 社製)

の感度等について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。

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。

## 6. 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

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の開発をめざした。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、日本脳炎ウイルス 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<sup>Z0934</sup>-M41 株を使用した。また GenBank から日本脳炎ウイルス、型遺伝子配列情報を取得した。さらにウエストナイル塩基配列も収集し、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。日本脳炎ウイルスの検出感度の評価は、型 3 株、型 3 株、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。

## 7. 輸血血液におけるデングウイルスおよび HTLV-2 の検出法開発に関する研究

デングウイルス各血清型の RT-PCR 用 Primer 及び Probe を大規模スクリーニング

することにより、新規高感度 Primer 及び Probe を同定し、これらの Primer 及び Probe を用いて検出系を最適化した後、全血清型の高感度同時検出が可能な新規マルチプレックス PCR 法を確立することを目的とした。

### 1) DENV 特異的 Primer 及び Probe の大規模スクリーニング:

Primer Express ver3 ソフトウェア (Life Technologies) を使い Primer 及び Probe を設計した。各血清型で最も効率良く PCR が実施されるオリゴセットを同定した。

### 2) DENV ゲノム RNA の精製:

Vero 細胞で増やした培養上清中の DENV ゲノム RNA は、QIAasympy DSP virus/pathogen kit を用いて、QIAasympy にプログラムされた抽出プロトコルで抽出した。

### 3) 新規マルチプレックス PCR 検出系の構築:

マルチプレックス PCR 法は、同定した Primer 及び Probe を用い、QuantiTect Multiplex RT-PCR kit の推奨プロトコルに従い検討・実施された。各血清型の Probe はそれぞれ異なる蛍光色素で標識した。

## 8. アカイエカの飛翔能力と行動範囲に関する研究

産卵場所を探索する成虫の行動範囲について検討した。また、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、コガタアカイエカと比較した。

### 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 m<sup>2</sup>) の庭園で実施した。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<sup>2</sup>) を算出し、分布の集中度指数 (s<sup>2</sup>/m) を求めた。

## 2) アカイエカの飛翔能力の評価:

フライトミルを用い、羽化後約 1 週間の未吸血の雌成虫を 15 長日あるいは 25 長日の温度条件下で飛翔させた。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。

## (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. 輸血用血液製剤中におけるトリパノゾーマクルーゼの動態

#### 1) 白血球除去フィルターによる *T. cruzi* の除去:

qPCRによる *T. cruzi* 量では、JRC Tc-1および JRC Tc-2は、それぞれ2および3 Log程度の減少が認められた。また、白除フィルター通過後における増殖可能な *T. cruzi* は、両株とも4 Log 以上減少し、検出限界以下であった。 *T. cruzi* 混入により白血球除去能が低下することはなかった)。

#### 2) 赤血球製剤における *T. cruzi* の動態:

赤血球液中での再増殖可能な *T. cruzi* 数は、JRC Tc-2 Bag#3を除き4日目以降から減少が認められ、21日目には2~4 Log程度の減少が確認された。赤血球液の有効期間内

である21日では、いずれの赤血球液においても増殖可能な *T. cruzi* が確認された。

#### 3) 低温環境下での *T. cruzi* の増殖性および感染性:

25 °C で培養を行った *T. cruzi* は、時間の経過と共に増殖が認められたが、4 °C では *T. cruzi* の増殖は認められなかった。25 °C で培養を行った *T. cruzi* では、amastigotes の増殖が認められたが、4 °C での *T. cruzi* は4日目から amastigotes の減少が認められ、14日目以降では検出限界以下であった。

## 2. 血液製剤によるリーシュマニア感染予防のための研究

### 1) 血液製剤中での生存率:

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。-20 °C 保存では、1~8 週間の何れでも感染性は確認できなかった。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  $1.7 \times 10^7$  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  $1.2 \times 10^3$  であった。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

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。

#### 4. バベシア感染の検査法に関する研究

1) ICTの試作と人血清に対する感度の検討:

米国で陰性と判定され、ELISAでも0.2以下の低いOD値を示した血清では、対照ラインに陽性バンドが認められたが、テストラインに陽性バンドは認められなかった。一方、エール大学で陽性と判定され、ELISAでも1.0以上高いOD値を示し、1:1で希釈された血清では、対照ラインおよびテストラインに陽性バンドが認められた。しかし、1:5希釈では、陽性バンドの発色が減弱した。また、米国で陽性と判定されたが、ELISAでも1.0以下のOD値を示した血清では、テストラインに陽性バンドが認められなかった。

2) LAMPの感度の検討:

*B. microti* グレイ株とミュンヘン株から3種類のDNA量(0.1, 1.0, 10 ng)を用いてLAMPを行ったところ、1.0, 10 ngでは両株に増幅が認められたが、0.1 ngではグレイ株に遺伝子増幅が認められたが、ミュンヘン株では認められなかった。

3) ヒトDNAを用いたLAMPの検討:

16例のヒトDNAを用いてLAMPを行ったところ、7例で遺伝子増幅が認められた。また、LAMPに用いられた4種類のプライマーから2種類を用いてPCRを行った結果、6例で濃いバンド、1種類で弱いバンドが認められた。

#### 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システムを使用した95%検出限界感度は23.9copies/mL(95%CI:16.3~44.2)、50%検出限界感度は4.9copies/mL(95%CI:3.7~6.4)であった。25copies/mL、50copies/mL、100copies/mLの検出率は100%であった。(添付文書では、95%検出限界感度は11.9copies/mL(95%CI:9.6~15.9)、50%検出限界感度は2.0copies/mL(95%CI:1.6~2.4)であり、検出率は30copies/mL、100copies/mLで100%である)

2) 再現性試験:

同時再現性:

95%検出限界感度以上を示した3濃度(100、50、25copies/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。

日差再現性:

95%検出限界感度以上を示した3濃度(100、50、25copies/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。

#### 6. 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

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。

## 7. 輸血血液におけるデングウイルスおよび HTLV-2 の検出法開発に関する研究

### 1) DENV 特異的高感度 Primer 及び Probe の同定:

DENV-1, 2, 3, 4 の各血清型について、Forward および Reverse Primer セットをそれぞれ 108, 80, 72, 71 セット (合計約 350 セット) を設計した。SYBR Green を用いた real-time RT-PCR の結果、各血清型についてそれぞれ 17, 14, 18, 18 セットの優良な Primer セットを同定した。同定した Primer セットについて、Taqman MGB Probe を設計した。それぞれの血清型について 11~13 セットの Probe を準備し、同じ分離株を用いて Taqman PCR を行った。その結果、各 3~4 セットのプローブが極めて優れた増幅を示した。さらに、同定した Primer 及び Probe を用いて、さらにこれまでの分離株を検体として、各オリゴセットの検出能を検討した。その結果、最も検出域、感度、特異性に優れると考えられる各オリゴセットの組み合わせを決定した。

### 2) マルチプレックス PT-PCR による 4 血清型の同時検出:

同定した新規オリゴセットを用いて、マルチプレックス PCR 法による新規 DENV 検出系の構築を試みた。QuantiTect Multiplex RT-PCR kit と同定したオリゴセットを用いてマルチプレックス PCR 反応を実施したところ、非特異的な反応が見られず、かつ異なる蛍光色素で標識された各血清型に特異的なシグナルの検出が可能であった。また、DENV 臨床分離株を鋳型として各血清型のシングルプレックス PCR とマルチプレックス

PCR の検出感度を比較したところ、2 つの検出系は各血清型において同等の Ct 値を示した。さらに、DENV 以外の種々の核酸を鋳型として検討したところ、非特異的な反応は見られなかった。構築した新規マルチプレックス PCR 法は、感度・特異性共にシングルプレックス PCR と同等であり、かつ 1 反応当たりのコストが低く、より簡便で有用な手法であると考えられた。

## 8. アカイエカの飛翔能力と行動範囲に関する研究

### 1) 産卵期のアカイエカ成虫の行動範囲:

アカイエカ幼虫が発生していた雨水マスの空間分布について調査を行ったところ、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示された。

### 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、5 秒間に 5 回以上の非常に速いスピードで羽ばたくが、短時間で頻繁に休止することが確認された。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、最長 25 時間連続して飛翔する個体も確認された。アカイエカの 25 での連続飛翔時間は 0.2 時間で約 100 m であったが、15 では連続 5 時間で 4.5 km 飛翔すると推測された。

## D. 考察

トリパノゾーマクルージ (*T. cruzi*) は白血球除去フィルターにより、2~3 Log の減少が認められ、さらに培養による再増殖可



可能な *T. cruzi* は、4 Log 以上の減少が認められた。赤血球液中における *T. cruzi* の動態だけでなく低温環境下(4℃)での *T. cruzi* の増殖性および感染性を評価した。その結果、赤血球液中での *T. cruzi* は、製剤有効期限である 21 日目においても 2~4 Log 程度の減少を示すだけであったが、低温環境下にて *T. cruzi* を培養すると *T. cruzi* の増殖は認められず、さらに感受性細胞への感染性が低下することが示された。これまで非流行地域での血液製剤を介した *T. cruzi* 感染においては、血漿製剤および赤血球製剤による感染は認められていない。昨年度の本研究において血漿製剤中における *T. cruzi* は、一度の凍結融解により 5 Log 以上減少し、検出限界以下となることを報告した。さらに本年度の研究にて、白血球除去フィルターによる *T. cruzi* の減少、そして赤血球製剤の低温保存による増殖可能な *T. cruzi* の減少および感染性の低下が認められたことから、本邦にて製造される全血採血由来輸血用血液製剤を介した *T. cruzi* の感染は非常に低いリスクであると考えられた。

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。また、無症候性感染者の場合には献血する可能性があり、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。従って、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、輸血の安全性確保にとって重要である。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 2,000 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。次年度は、赤血球製剤の白血球除去による有効性を評価する予定している。

バベシア症については、組換え抗原を用いた迅速簡便血清法であるイムノクロマト法に確立について検討を行った。その結果、ELISA で高い OD 値を示した米国の患者血清に陽性反応が確認された。しかし、希釈倍数を高くすると陽性バンドの減弱が認められた。従って、今後使用する血清の希釈倍数について更に検討する必要がある。また、陽性とされた血清でも ELISA の OD 値が 1.0 以下の場合は、陽性バンドが認められなかった。今後金コロイドの大きさや標識粒子の材料に関して更に検討し、検出感度を向上させる。また、人バベシア症の遺伝子診断法についても検討を行った。PCR は最も用いられている遺伝子診断法であるが、高価な機器や増幅法や結果を得るまでに時間を要するなどの難点がある。そこで、PCR と比較して、簡便で迅速に診断可能な LAMP 法について検討した。その結果、アメリカ人の患者 DNA を用いて検討した LAMP は PCR と同様の検出率を示した。今後、プライマー、増幅条件の改良を、より多くのヒトサンプルを用いて行い、さらに LAMP 法の感度並びに特異性を向上させる必要がある。

ウエストナイル熱 (WNV) 国内発生に備え

ている PANTHER 用試薬 (Procleix WNV ABD Assay、Novartis 社製) の感度等について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。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。

日本脳炎、ウエストナイル熱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、感染リスクも存在する。今回作製した遺伝子検出系によって、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を、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 ~ 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。

デング熱は平成 26 年国内感染例が発生し、当該ウイルスに対する血液製剤の安全性確保は喫緊の課題となった。これまで DENV の検査・検出に用いられてきた PCR 法は主にシングルプレックス PCR 法であったが、DENV は 4 つの血清型が存在するために複数の PCR が要求されるなどアッセイ系が

煩雑になっていた。本研究においては、1 反応の PCR で全ての血清型を高感度・特異的に検出するマルチプレックス PCR 法の確立に成功した。この新規手法は、アッセイ当たりの実質コストが半減以下になるだけでなく、簡便で、かつこれまでの手法よりも高感度であると考えられた。今後は、血液製剤や原料血漿などにおいて、微量な DENV の混入をスクリーニングする手法として有用と考えられ、血液製剤の安全性確保に寄与することが期待される。

産卵期のアカイエカ成虫の行動範囲について調査した。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。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た。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。さらに、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。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。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。

## E . 結論

シャーガス病については、病原体であるトリパノゾーマクルーシ (*T. cruzi*) が白血球除去フィルターにより 4 Log 程度の減少が認められた。赤血球製剤中では接種 4 日目から 1~2 Log 程度減少し、21 日目では 2~4 Log の減少が認められた。低温環境下(4 )にて培養した *T. cruzi* は増殖が認められなかった。

リーシュマニア症については 4 、3 週間保存で約 2 Log 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 5 Log、血漿では、4 Log 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リーシュマニア原虫を除去するために有効であることが示唆された。

ヒトバベシア感染の検査法開発のため、イムノクロマト法 (ICT) および簡便で迅速な遺伝子増幅法である LAMP) 法について検討を行った。米国の流行地のヒト血清のうち、ELISA で高い OD 値を示した血清で陽性ラインが確認されが、ELISA で低い OD 値を示した陽性血清では陽性ラインが認められなかった。また、ヒト DNA サンプルを用いた LAMP は PCR とほぼ同様の陽性結果が得られた。

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に関し、精度試験を行った。95%検出限

界感度は 23.9copies/mL (95%CI : 16.3 ~ 44.2) であった。また、特異性試験においても、ALT 検査不適献血者検体全て陰性で、陽性又は偽陽性は確認されなかった。

新たに設計した TaqMan プライマーを用いることにより、日本脳炎ウイルス遺伝子 ~ 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。

デングウイルスの 4 血清型の高感度同時検出が可能な新規マルチプレックス PCR 法を確立した。本検査法は、特にこれまで困難であった血液中の微量な DENV の検出に有用であり、献血血液などのスクリーニングに適している。

ウイルス媒介蚊については、雨水マス単位として、アカイエカ幼虫の分布様式を調べた。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おり、また産卵期のアカイエカの行動範囲は、少なくとも 450m x 350m であると推測された。飛翔距離については、アカイエカは 25 では連続して 0.2 時間、約 100m 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。

## 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

Terkawi MA, Cao S, Herbas MS, Nishimura M, Li Y, Moumouni PF, Pyarokhil AH, Kondoh D, Kitamura N, Nishikawa Y, Kato K, Yokoyama N, Zhou J, Suzuki H, Igarashi

I, Xuan X.: Macrophages are the determinant of resistance to and outcome of nonlethal *Babesia microti* infection in mice. Infect Immun. 83:8-16, 2015

Tuvshintulga B, Sivakumar T, Battsetseg B, Narantsatsaral SO, Enkhtaivan B, Battur B, Hayashida K, Okubo K, Ishizaki T, Inoue N, Igarashi I, Yokoyama N.: The PCR detection and phylogenetic characterization of *Babesia microti* in questing ticks in Mongolia. Parasitol Int. 64:527-532, 2015

## 2) 和文論文

五十嵐郁男、バベシア症、木村哲、木田宏編、人獣共通感染症(改訂3版)、医薬ジャーナル社、大阪、2016年、p430-434.

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. 学会等発表

### 1) 国際学会

なし

### 2) 国内学会

佐山勇輔、松本千恵子、三浦左千夫、淵崎晶宏、内田茂治、佐竹正博、田所憲治. 輸血用血液製剤における *Trypanosoma cruzi* (シャーガス病)の動態. 第63回日本輸血・細胞治療学会総会. 2015年5月28日

-30日、東京

佐山勇輔、山岸尚仁、松本千恵子、内田茂治、永井正、佐竹正博：輸血用血液製剤における製造および保存条件による

*Trypanosoma cruzi* (シャーガス病)の動態。

- 白血球除去フィルターおよび赤血球製剤を中心に-. 第64回日本輸血・細胞治療学会総会. 2016年4月28日-30日、京都市

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特願 2015-215906

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし