

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、パベシア症およびウエストナイル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、シャーガス病にリスクがあると考えられた日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率は、3/18,487 (0.016%)であった検査可能であった受血者5名は、*T. cruzi* の感染は認められなかった。

リーシュマニア症については、マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞や肝癌細胞株に鞭毛型リーシュマニアを感染させ無鞭毛型原虫を得た。この培養液を THP-1 細胞や胚細胞癌株に添加し評価したが、コントロールと比較して有意な感染価は得られなかった。パベシア症に関して、イムノクロマト法および迅速な遺伝子増幅法である LAMP 法について検討を行った。その結果、米国の流行地のヒト血清 60 例のうち、33 例が ELISA と ICT で陽性と判定され、両診断法に高い相関が示された。また、米国の流行地で得られたヒト DNA サンプルを用いた LAMP で 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の検査体制について血液事業情報システムの運用も含めたシミュレーションと対応マニュアル案について輸血用血液製剤の安全性を担保するために検査が必要な状況下における検体搬送、プール検体の作製及び検査の実施にかかる WNV 検査マニュアル（案）を策定した。ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルスのマルチプレックス遺伝子検出法に関して評価した。デングウイルス 1～4 型、チクングニアウイルスは検出された。HTLV-1/2 高感度 Multiplex qPCR 法を確立した。献血血液などの抗体スクリーニング検査の確定診断に適している。ウイルス媒介蚊について、アカイエカはすべての温度条件でコガタアカイエカよりも有様に長命であった。ヒトスジシマカの乾燥卵は、4 および 20 では 4 ヶ月は生存し、羽化し得ることが明らかになった。羽化率は 4 > 20 > 25 の順に高かったが、25 では 4 ヶ月後に羽化成虫は全く得られなかった。以上の研究により、献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（埼玉医科大学医学部 准教授）

沢辺京子（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（神奈川県衛生研究所 所長）

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：

石野田正純（日本赤十字社血液事業本部）

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（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所 所長）

佐山勇輔（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）

鈴木理恵子（神奈川県衛生研究所 微生物部）

高倉明子（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）

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）

古居保美（日本赤十字社血液事業本部）

松本千恵子（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）

## 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。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、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．日本の献血者における *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性率の調査

シャーガス病のリスクがあると考えられた献血者（中南米諸国出身者や中南米長期滞在者）を対象に抗体検査を実施した。検体は、2002年4月1日から2012年10月14日までは、日本赤十字社の献血者情報データベースに保管されていた中南米滞在歴を

有する献血者のうち、血小板製剤の製造履歴がある献血者を対象とした。また、2013年1月8日から2016年8月21日までの期間に上記の有リスク献血者によって献血された血液を検体として用いた。リスク因子として、2013年1月8日から2016年8月21日に「中南米諸国で生まれた、又は育った」、「母親が、中南米諸国で生まれた、又は育った」、「中南米諸国に通算4週間以上滞在、または居住したことがある」をシャーガス病のリスク因子とし、問診時に献血者に伺い、該当した献血者のうち、調査への同意が得られた献血者の血液を採取した。抗体検査法は、ELISA(オーソ社)でスクリーニングを行い、陽性検体は同ELISAで二重試験を行った。ELISAで2/3以上陽性を示した検体は、CLIA(アボット社)を用いて確認試験を行った。確認試験で陽性を示した検体を抗体陽性と判定した。

## 2. 血液製剤によるリーシュマニア感染予防のための研究：

*Leishmania donovani*(以下 *L. donovani*) は 10%FCS 添加シヨウジョウバエ細胞培養液で 26、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。また、HepG2(肝癌細胞株)、HuH7(肝癌細胞株)、A549(肺癌細胞株)、NJK(絨毛癌細胞株)、VERO、NEC8(胚細胞株)、N-TERA(胚細胞株)は無刺激で MOI 10 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、3 日、5 日後に培養液を用いて洗い、添加した鞭毛型原虫を

出来るだけ除去した。感染 7 日後に各細胞株を検鏡して細胞中の無鞭毛型原虫の有無を観察した。また、これらの細胞株の培養上清約 10mL を最初に 15  $\mu$ m、次に 5  $\mu$ m のポアサイズのフィルターで濾過し、1300g で 10 分間遠心してペレットを得た。ペレットは 500  $\mu$ L の培養液で溶解した。これを 96 穴マイクロプレートに 1X から 10<sup>5</sup>まで 10 倍ずつ段階希釈し、26 にて 3 週間培養した。また、THP と NEC8 細胞を 1X10<sup>4</sup>/well ずつ 96 穴マイクロプレートに播き、同様に処理して集めた検体を 1X から 10<sup>5</sup>まで 10 倍ずつ段階希釈し、これらの細胞に添加した。37 で 5 日間培養後、26 にて 3 週間培養し、鞭毛型原虫の増殖の有無を解析した。

## 3. 変異型 CJD 発生動向調査：

vCJD の発生状況を英国の National CJD Research & Surveillance Unit と米国 CDC の CJD サーベイランスから経時的に情報を集めた。2016 年のフランスの発生状況は 2015 年度からの増加数で評価した。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。ヒト血清試料は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、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。なお、ヒト血清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。組換え蛋白質を用いた ELISA と ICT の比較として、Bmn1-17 組換え蛋白質の ELISA を 60 検体のヒト血清を 100 倍希釈で検討を行った。また、Bmn1-17 組換え蛋白質で作製した ICT ストリップを 60 検体のヒト血清を 5 倍希釈で検討した。ヒト DNA を用いた LAMP の検討として、*B. microti* の LAMP についてプライマー、増幅条件の改良、ヒトサンプル数の増やして LAMP 法の感度並びに特異性を向上させる事を計画した。

#### 5 . ウエストナイル熱等の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 :

WNV の検査体制について血液事業情報システムの運用も含めたシミュレーションと対応マニュアル案の策定可能な限り GMP に準じた WNV の検査対応が実施できるように、検体搬送容器の選定や血液事業情報システムの関わり方について検討しながら、WNV の検査体制を整理し、対応マニュアルを策定し検証した。

#### 6 . ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス\_マルチ遺伝子高感度検出法の評価 : ジカウイルス、チクングニアウイルス、デングウイルスを同時に検出できる TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) を、評価した。それぞれのウイルスおよびインナー

コントロールは 5 つの蛍光色素で検出される。評価の材料としては、デングウイルス感染細胞上清、デング熱患者急性期血清、ジカウイルス感染細胞上清、チクングニアウイルス感染細胞上清から RNA を抽出し、感度および特異性を検討した。

#### 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 :

HTLV-2 の新規高感度検出系を確立し、検出感度について検討した。HTLV-2 Primer & Probe の大規模スクリーニングについては、Primer Express ver3 ソフトウェア(Life Technologies)を使い Primer 及び Probe を設計した。Primer のスクリーニングには SYBR Green I PCR Master Mix (Takara) の推奨プロトコルに従い、Probe (FAM 標識) のスクリーニングには Taqman Fast Advanced master mix qPCR キット (Applied Biosystems) の推奨プロトコルに従って行った。最も効率良く PCR が実施されるオリゴセットを同定した。

HTLV-2 ゲノム DNA の精製については、HTLV-2 感染細胞株 Ton1 および MoT 細胞から、QIASymphony DSP Blood DNA midi kit を用いて、QIASymphony にプログラムされた抽出プロトコルで抽出した。

#### 8 . ウイルス感染症媒介蚊の生理・生態学的研究

雌蚊の寿命、幼虫の発育日数に注目し、ウイルス非感染のアカイエカおよびヒトスジシマカを用いて調査した。アカイエカ NIID 系統 (2008 年新宿区捕集後、25 長日条件下で維持)、コガタアカイエカ出雲系統 (2008 年出雲市捕集後、上記条件下で維持)

およびヒトスジシマカ海老名系統（2011年海老名市捕集後，上記条件下で維持）を用いた。アカイエカおよびコガタアカイエカの幼虫を高温・長日（25℃，16L:9D）下で維持し、羽化後4つの異なる飼育条件（25℃，16L:9D；20℃，11L:13D；15℃，11L:13D；10℃，10L:14D）下で維持した雌成虫の生存日数を調べた。ヒトスジシマカの乾燥卵を高温・長日（25℃，16L:9D）下に約1カ月維持し、その後4℃、20℃、25℃の処理区で維持し、羽化までの日数（幼虫発育日数）および羽化率を調べた。

（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．日本の献血者における *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性率の調査：

のべ18,487検体を検査し3検体(0.016%)が抗体陽性と判定された。抗体陽性者3名は、全て中南米諸国出身者であった。1名の抗体陽性者は、複数回献血歴があったため遡及調査を行った。検査可能であった5名の受血者は、全て抗体陰性であった。日本での献血血液においては、*T. cruzi*抗体陽性者は中南米諸国出身者に限られたが、一定の感染者が認められた。しかしながら、これまで日本国内では、輸血を介した *T. cruzi* 感染は確認されていない

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

*Leishmania* の無鞭毛型原虫の培養法に関して、感染させた各種細胞株を検鏡すると THP-1 の他に HuH7(肝癌細胞株)、A549(肺癌細胞株)、NJK(絨毛癌細胞株)、NEC 8、N-TERA(胚細胞株)の細胞質に *Leishmania* の無鞭毛型原虫を観察できた。それらの上清からフィルターを使用することで感染細胞を除去し、遠心によって無鞭毛型原虫が存在すると思われる沈殿を得た。3週間、沈殿を溶解した溶液を 25℃ で培養したところ、THP-1、A549、NJK、NEC8 から鞭毛型原虫の増殖が確認できたが、いずれも原液からであり、希釈した検体からは鞭毛型原虫の増殖は認められなかった。また、沈殿から得られた検体を THP-1 や NEC8 に 37℃ で感染させ、その後 25℃ で培養した場合も原液を感染させたウエルに鞭毛型検体が確認できたが、10以上に希釈した検体からは原虫の増殖は確認できなかった。

3．変異型 CJD 発生動向

英国では、2016年に1名の死亡例が報告された。死亡数は2000年をピークに激減していたが、今回の1例の特徴は、codon129がMV型の初めての死亡例であった。なお、これまで英国で報告された177名のvCJD発症者は、全てMM型であった。

4．バベシア感染の検査法に関する研究

1) ヒト感染血清によるbmn1-17組換え抗原を用いたELISAの検討：

米国より得られた60例のヒト血清を用いてELISA(IgG)を行った。その結果、OD値が0.2以上を示した33例を陽性、OD値が0.2以下の27例を陰性と判定した。米国の結果では、49例が陽性とされており、感度の違いが認められた。

2) ヒト感染血清によるbmn1-17組換え抗原を用いたICTの検討:

日本のヒト感染血液を用いた ICT では、輸血によって発症した患者血清および血液を提供した不顕性感染者由来血清でバンドが認められた。米国より得られた 60 例のヒト血清は、5 倍希釈で ICT を行った。その結果、33 例のテストラインにバンドが認められ、陽性と判定された。bmn1-17 組換え抗原を用いた ELISA と ICT の結果は、個々の患者血清ですべて一致した。

3) ヒト DNA を用いた LAMP の検討:

LAMP 法の感度並びに特異性向上のため、プライマーの設計、増幅条件の検討をおこなったが、顕著な改善は認められなかった。

5. ウエストナイル熱等の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:

平成26年に発生したデング熱の国内感染発生時に輸血用血液製剤の安全性を担保するために日赤が実施した献血制限等の対応を振り返り、安全対策の手順をシミュレーションすることで今後発生する可能性のあるウエストナイルウイルスも含む蚊媒介感染症への迅速な対応手順を策定することができた。また、ウエストナイルウイルスの検査体制について血液事業情報システムの運用も含めたシミュレーションと対応マニュアル案について輸血用血液製剤の安全性を担保するために検査が必要な状況下における検体搬送、プール検体の作製及び検査の実施にかかるWNV検査マニュアル(案)を策定したし、検査体制の充実が諮られた。

6. ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス\_マルチ遺伝子高感度検出法の評価

TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)の評価では、デングウイルス1~4型(感染研標準株)は検出された。ジカウイルス(PRVABC59株;アジア型)は検出されたが、アフリカ株(MR766株)は検出できない判定であった。ただしそのリアルタイムPCRの増幅カーブを目視するとなだらかな上昇は存在した。チクングニアウイルスも検出された。また、デング熱臨床検体での評価は、従来法RT-PCRあるいはリアルタイムPCRと比べてその感度は同等以上であった。内在性コントロール(PPIA Cyclophilin 遺伝子)は、検体として血清を用いると内在性コントロールの上昇が低く検出されない場合があった。

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: Multiplex qPCRによるHTLV-1/2核酸検出系の検討

これまでにHTLV-1核酸検査用に同定した高感度Primer & Probeと本研究で同定したHTLV-2核酸高感度Primer & Probeを組み合わせ、Multiplex qPCR系を作製した。

5-plex qPCRについて、それぞれのsingle qPCRと既報のHTLV-2核酸検査法と感度比較した。MoT genomic DNAをPBMC genomic DNAで超低濃度に希釈した検体を使用して、HTLV-2核酸の検出を試みたところ、5-plex法の検出限界の濃度は、それぞれのsingle qPCRの検出限界濃度とほぼ同等であり、また既報の2つの方法(Moens et al. 2009およびQater et al. 2011)と同等以上であることが明らかとなった。特にPrimer & Probe 008は、LTRに設定されており、HTLV-2

genome内に2コピー存在する領域であることから高感度であることが期待できる。以上のことから、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や既報の方法と同等以上の高感度法であり、HTLV-1/2の判別にも簡便で有用な手法であると考えられた。

#### 8. ウイルス感染症媒介蚊の生理・生態学的研究

羽化後の雌成虫を4つの異なる温度・日長条件で維持したところ、アカイエカはすべての条件下でコガタアカイエカに比べ寿命が長く、特に15℃短日条件下では平均155.5日、最長で282日(コガタアカイエカは平均80.9日、最長174日)であった。また、5℃前後の非常に低い温度条件下での平均生存日数はアカイエカは66.6日であったが、コガタアカイエカは22日であり、アカイエカは有意に長命であった。ヒトスジシマカの乾燥卵は、4℃および20℃では4ヵ月生存し、羽化できることが示唆された。羽化率は4℃>20℃>25℃の順に高く、25℃で4ヵ月間維持された卵からは羽化成虫は得られなかった。

#### D. 考察

シャーガス病のリスクがあると考えられた国内の献血者検体を用いて*T. cruzi*抗体検査を行った。その結果、該当した18,487検体中、ELISAのみ陽性は12検体、ELISAおよびCLIA両検査で陽性を示したのは3検体であった。異なるメカニズムの二つの方法を用いることによって高い特異度も実現されていると考えられた。カナダやアメリカなどのシャーガス病スクリーニング検査で

も異なる二種類の方法により*T. cruzi*抗体検査を行い、結果を確定している。今回、シャーガス病に関する安全対策を実施した2012年10月15日以前の献血で、中南米諸国に滞在歴がある献血者から採血され、血小板製剤に使用された血液について抗体検査を行ったが、抗体陽性者は認められなかった。そのため、安全対策以前の輸血を介した*T. cruzi*感染の可能性は非常に低いと考えられた。

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。昨年度までの研究によって感染細胞は、白血球除去フィルターで効率良く除去できることが明らかになった。しかし、感染細胞から放出される無鞭毛型原虫が同様に白血球除去フィルターで除去できるのか明らかにされていない。そこで今年度は、無鞭毛型の培養系を確立し、白血球除去フィルターの除去効率を評価することとした。マクロファージ様細胞に分化させたTHP-1細胞や肝癌細胞株に鞭毛型*Leishmania*を感染させ無鞭毛型原虫を得た。この培養液をTHP-1細胞や胚細胞癌株に添加し、26℃で培養し鞭毛型原虫の有無で感染性を評価したが、コントロールと比較して有意な感染価は得られなかった。

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。Bmn1-17組換え蛋白質を用いたELISAのヒト血清を

用いたELISAでは、米国で陰性と診断された結果と高い相関が認められた。しかしながら、米国で陽性と診断された血清で、抗体検出ができなかった例が認められた。これは、ELISAに用いられた抗原やELISAプレートのへのコーティング量、用いるヒト血清の希釈倍数による試験法の感度の違いによるものと考えられる。また、ICTでもELISAと同様、33例の陽性例が検出可能であった。しかし、アメリカで得られた陽性率よりも低い結果となった。今回血清は量的な制限から、5倍希釈で用いた。5倍希釈では、2希釈に比較して、テストラインの発色が減弱する事をマウスの血清を用いた検討で経験しており、ICTの低い感染率がヒト血清の希釈倍数に起因する可能性が考えられる。また、ICTストリップの抗原の標識粒子の材質や大きな感度に影響することが報告されており、今後これらに関する検討し、検出感度を向上させることが必要である。

ウエストナイル熱については、平成26年に発生したデング熱の国内感染発生時の対応を振り返ることで、今後発生する可能性のある蚊媒介感染症への迅速な輸血用血液製剤の安全対策を講じるための準備が整った。ウエストナイル熱の国内感染が発生し、輸血用血液製剤の安全性を担保するために検査が必要な状況下における検体搬送、プール検体の作製及び検査の実施にかかるWNV検査マニュアル(案)を策定したことで、安定的な検査実施体制が構築された。

本研究で評価したキット TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)は、検査系の反応をモニターするため、内在性コントロールを用いている。このコントロールは、血清のよう

な細胞成分の極めて少ない材料を用いた場合は機能しないので注意が必要である。デングウイルス型別遺伝子検出は、患者本人にとってあるいはサーベイランス上は重要であるが、輸血や血液製剤に関するチェックとしては必ずしも必要ではなく Pan Dengue すなわちデングウイルス共通の検出系で十分である。そうすることで検査の煩雑さを解消できるよいアイデアであると考えられる。プライマー、プローブを含む反応試薬を Lyophilized することで有効期間が長くすることが可能である。

HTLV-2 抗体検査は、近年日本でも HTLV-1 抗体検査に含まれるようになったが、陽性時の確定診断のための核酸検査等の方法の整備が整っていない。現時点では、HTLV-1/2 抗体陽性例に対する確認検査用に日本で使用されている Western Blot 法には HTLV-2 抗体の検出が含まれおれず、HTLV-2 抗体陽性確定例は、直ちに発見されるとは考えにくい。WB 法を改良した高感度な HTLV-1/2 検出法も開発されており、近い将来には高感度な HTLV-2 核酸検査は必須となると考えられる。今回の研究で行った Primer 及び Probe の大規模スクリーニングで同定した SYBR Green I 用 Primer、およびその後の高感度 Taqman qPCR Probe は、極めて優れた Primer および Probe が同定されていると考えられることから、今後の HTLV-1/2 抗体スクリーニング検査陽性例の確定診断法の1つとして応用が期待される。

ウイルス媒介蚊の寿命や、幼虫の発育日数についても研究を行った。2014年のデング熱国内流行の翌春の捕集蚊からはウイルスは検出されなかったが、デングウイルス



の経卵伝搬は議論となる。ヒトスジシマカの乾燥卵は、4 および 20 では4 ヶ月は生存し、羽化成虫も出現することが示唆されたが、25 では4 ヶ月後に羽化成虫は全く得られなかった。乾燥状態にある卵の中でウイルスがどのくらいの期間生存できるのか、ウイルス感染蚊の羽化率は高まるのか等の疑問は、デングウイルスの垂直伝搬の可能性を検討する上で重要な情報となる。

#### E . 結論

シャーガス病にリスクがあると考えられた日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率は、3/18,487 (0.016%)であった。遡及調査により、*T. cruzi* 抗体陽性/DNA 陽性献血者由来の血液を介し、検査可能であった受血者5名は、*T. cruzi* の感染は認められなかった。国内における輸血による *T. cruzi* 感染はこれまでのところ確認されていない。

リーシュマニア症については、マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞や肝癌細胞株に鞭毛型 リーシュマニアを感染させ無鞭毛型原虫を得た。この培養液を THP-1 細胞や胚細胞癌株に添加し、26℃で培養し鞭毛型原虫の有無で感染性を評価したが、コントロールと比較して有意な感染価は得られなかった。

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。その結果、組換え抗原を用いた ICTA はヒト感染血清中の抗体を検出する事が可能であったが、更なる感度の向上が必要である。また、LAMP においても PCR と同様の検出率が認められたが、反応条件や感度に関して更なる改良が必要である。

ウエストナイルウイルスについて、国内感染が発生した場合の、輸血用血液製剤の安全性を担保するために献血受付時、検査及び献血後情報までの一連の対応を準備し、シミュレーションを行うことができた。

ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルスのマルチプレックス遺伝子検出法に関して評価した。デングウイルス1~4型(感染研標準株)は検出された。ジカウイルス (PRVABC59 株; アジア型) は検出されたが、アフリカ株 (MR766 株) は検出されなかった。血液や血液製剤のようなデングウイルスの血清型別が重要ではなくウイルスの有無を判定する場合には、検査は煩雑でなく有用である。

HTLV-1/2高感度Multiplex qPCR法を確立した。献血血液などの抗体スクリーニング検査の確定診断に適していると考えられる。本検査法の開発は、今後の血液製剤の安全性確保に繋がることが期待される。

ウイルス媒介蚊については、アカイエカはすべての温度条件でコガタアカイエカよりも有位に長命であった。ヒトスジシマカの乾燥卵は、4 および 20 では4 ヶ月は生存し、羽化し得ることが明らかになった。羽化率は 4 > 20 > 25 の順に高かったが、25 では4 ヶ月後に羽化成虫は全く得られなかった。

#### 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

Munkhjargal T, Aboge GO, Ueno A, Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. 2016. Identification and characterization of profilin antigen among *Babesia* species as a common vaccine candidate against babesiosis. *Exp Parasitol*. 166:29-36.

Munkhjargal T, Ishizaki T, Guswanto A, Takemae H, Yokoyama N, Igarashi I. 2016. Molecular and biochemical characterization of methionine aminopeptidase of *Babesia bovis* as a potent drug target. *Vet Parasitol*. 221:14-23.

Munkhjargal T, Yokoyama N, Igarashi I. 2016. Recombinant methionine aminopeptidase protein of *Babesia microti*: immunobiochemical characterization as a vaccine candidate against human babesiosis. *Parasitol Res*. 15(9):3669-3676.

Tezuka K, Kuramitsu M, Okuma K, Hamaguchi, I et al. Development of a novel dengue virus serotype-specific multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for blood screening. *Transfusion* 56:3094-100. 2016

2) 和文論文  
なし

2. 学会等発表  
1) 国際学会

なし

2) 国内学会

1) 岡田義昭、小林清子、池淵研二：輸血用血液製剤の保存温度や白血球除去による *Leishmania* 原虫の不活化及び除去効果に関する研究、第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 28 年 4 月、京都

手塚 健太、倉光 球、大隈 和、野島 清子、荒木 久美子、篠原 直也、松本 千恵子、佐竹 正博、浜口 功. Multiplex RT-qPCR によるデングウイルス 4 血清型の高感度同時検出法の開発：第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会、京都、2016 年 4 月 28 日~30 日

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