

**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**

**血液製剤の安全性確保と安定供給のための  
新興・再興感染症の研究**

**(H23 医薬 一般 003)**

**平成 25 年度 総括・分担研究報告書**

**平成 26 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

- 血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究 . . . . . 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. 血液からの異常プリオン除去法の開発 . . . . . 11  
研究分担者：岡田義昭（埼玉医科大学病院・血液・細胞移植部）
2. 国内外でのシャーガス病キャリアーの把握と献血対策に関する研究（慢性期シャーガス病の調査研究） . . . . . 19  
研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・副所長）  
研究協力者：三浦左千夫（日本赤十字社中央血液研究所感染症解析部）
3. ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応及び国内献血におけるシャーガス病の感染リスクの把握 . . . . . 27  
研究分担者：百瀬俊也（日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター製剤一部）
4. ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発 . . . . . 45  
研究分担者：横山直明（帯広畜産大学・原虫病研究センター）
5. 献血制限に関わる昆虫学的研究：個体識別マーキング法を用いたヒトスジシマカの移動分散に関する基礎研究 . . . . . 49  
研究分担者：津田良夫（国立感染症研究所・昆虫医科学部）
6. 高感度ウイルスゲノム検出法の検討およびウエストナイルウイルス NS1 検出系開発のための基盤的研究 . . . . . 55  
研究分担者：田島茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部）
- . 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 67

総括研究報告書

血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究

(H23-医療-一般-003)

研究代表者：倉根一郎(国立感染症研究所 副所長)

研究要旨：

献血の安全性確保と安定供給のため、変異型プリオン病、シャーガス病、バベシア症およびウエストナイルウイルス等のフラビ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。

変異型プリオン病の検出感度を上げるための基盤研究を行った。血清や血漿では添加するエキソソーム精製試薬の量を適正化することによってウイルスを効果的に濃縮することが可能になった。濃縮したウイルスは感染性を有し、検出法としてだけでなく、ウイルスの不活化・除去法の評価用の高力価のウイルス調整法としても有用な方法であった。

シャーガス病については東海四県において同意を得た中南米居住歴を有する献血申込者に対し *T. cruzi* 抗体検査を実施した。シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。対象者 457 人のうち 1 人が *T. cruzi* 抗体陽性であった。

バベシア症については、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法について、ヒト血液試料を用いてその有用性の確認を行った。

ウイルス媒介蚊については、移動分散に関する実験を行った。ヒトスジシマカの再捕獲率はオオクロヤブカよりも有意に高かった。またヒトスジシマカの再捕獲率を放逐場所間で比較したところ有意に異なっていた。大きな緑地の内部はヒトスジシマカ潜伏や吸血動物の探索に好適であり、雌成虫が周囲の生息場所から集まってくることを示唆された。

フラビウイルス遺伝子検出法の感度を増加させる目的でデングウイルスをモデルとして、Flap RT-PCR 法の開発を行った。

研究分担者：

岡田義昭(埼玉医科大学血液・細胞移植部  
部長)

津田良夫(国立感染症研究所昆虫医科学部  
室長)

田島 茂(国立感染症研究所ウイルス第一

部 主任研究官)

百瀬俊也(日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター 部長)

横山直明(帯広畜産大学原虫病研究センター 准教授)

研究協力者:

五十嵐 滋(日本赤十字社血液事業本部 課長)

沖 学 (日本赤十字社血液管理センター 課長)

高松純樹(日本赤十字社東海北陸ブロック血液センター所長)

鬼束惇義(岐阜県赤十字血液センター所長)

南澤孝夫(静岡県赤十字血液センター所長)

濱口元洋(愛知県赤十字血液センター所長)

岡田昌彦(三重県赤十字血液センター所長)

内田茂治(日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所部長)

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)

平 力造(日本赤十字社血液事業本部課長)

古居保美(日本赤十字社血液事業本部安全管理課)

石野田正純(日本赤十字社血液事業本部安全管理課)

高橋 勉(日本赤十字社血液事業本部安全管理課)

古澤秀明(日本赤十字社血液管理センター検査課)

#### A. 研究目的

近年、ヒトや物の国際間の頻繁な移動によって感染症が拡大し、これまで日本には存在しなかった病原体が国内に持ち込まれる可能性がある。国内でウエストナイル熱

やデング熱等が発生した場合、スクリーニング法の導入の他に早期に適切な献血制限地域を設定し、一方で必要な献血量を確保しなければならない。これらの感染症は蚊が媒介するため、蚊の種類や行動範囲、蚊の生態などを基盤に献血制限地域を設定する必要も出てくる。シャーガス病は南米に流行する慢性の感染症である。南米居住歴を有する献血者の抗体保有率等の実態を明らかにすることで輸血の安全性に貢献する。バベシア症については検査法の確立を進める必要が生じている。異常プリオンに関しては、定量性の良い異常プリオンの培養系を確立し、さらに血液からの簡便な除去法の確立と評価系を作る必要がある。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. エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発:

10%牛胎児血清入りの DMEM と 5% アルブミン製剤 10mL に牛下痢症ウイルス(BVDV)、仮性狂犬病ウイルス(PRV)、シンドビスウイルスを添加し、よく混ぜた後に濃縮前検体として 10~100  $\mu$ L を採取した。採取後の約 10m のウイルス溶液に市販されているエキソソーム精製試薬 ExoQuick-TC (System Biosciences 社)を 2mL 添加し、4  $^{\circ}$ C にて 14 時間以上静置した。反応後、1500g で 30 分遠心して得られた沈殿を 500  $\mu$ L の PBS で溶解しウイルス濃縮液とした。牛胎児血清とヒト血漿では、それぞれ 10mL に添加するエキソソーム精製試薬の量を 0-2mL に変化

させ、それぞれから得られた沈殿を PBS に溶解後、含まれるウイルス量を測定した。

## 2 . 国内外でのシャーガス病キャリアーの把握と献血対策に関する研究 :

中南米地域からの定住者が多い東海四県 (愛知県、静岡県、岐阜県、三重県) における献血申込者のうち中南米滞在歴を有する献血希望者に対し、予め献血会場に用意された本調査研究の説明書及び同意書を渡し、その内容を理解し同意書に署名した者を対象とした。併せて出身地、シャーガス病に関する認知度等に関し回答を得た。別に検体を採血し、愛知県赤十字血液センターにてイムノクロマト法 (STAT-PAK®) 迅速検査を実施した。ELISA 法 (ORTHO® *T. cruzi* ELISA TEST System) 及びイムノクロマト法 (*Trypanosoma Detect*®) 迅速検査による *T. cruzi* 抗体検査を実施した。

また、在日ラテンアメリカ人集住地域において NPO、ブラジル領事館などの協力の基で調査研究参画への同意書が得られた人たちを対象に抗体検査を行った。ラテンアメリカ人集住地域医療機関から検査依頼を受けた血清を用いて病原体 *T. cruzi* に対する IgG 抗体の有無をクロマト法、IFA、ELISA 法 PCR 法及び LAMP 法で調べた。さらに、既存の抗体検出キット (試験研究用) を用いて、それぞれの利便性、信頼性について検討した。

## 3 . パベシア症に関する研究 :

23 年度および 24 年度にマウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) について、人血液試料を

用いてその有用性を確認することした。神戸医療大学薬学部斎藤あつ子教授より 111 検体のヒト血液の提供を受けた。これらの試料は、インフォームドコンセントを実行して得られて採血されている。111 検体中、IFA により 61 検体が抗体陽性、50 例が抗体陰性であることが確認されている。これらの血液を用いて市販の DNA 抽出キットにより DNA を精製した。また、エール大学より、60 検体の人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。帯広畜産大学、神戸医療大学、エール大学の倫理委員会の承認を得て実施した。

## 4 . フラビウイルス媒介蚊に関する研究 :

ヒトスジシマカの胸部背面の 5ヶ所に塗料を塗って個体を識別するマーキング法を考案し 2013 年 3 月 18 日から 27 日の期間、石垣島の住宅街でヒトスジシマカとオオクロヤブカの移動分散に関する実験を行った。蚊の採集は毎日 8:00 と 14:00 の 2 回行った。各採集場所に採集者一人が 10 分間とどまり、吸血のために飛来する蚊を吸虫管で採集した。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。カップから蚊を 1 個体ずつ吸虫管で取り出し、マークの有無をチェックした。マーク虫はマークを確認、採集された場所を記録して紙コップに戻し、その日のうちに採集された場所から放した。無マーク虫には識別マークをつけて、その日のうちに採集された場所から放逐した。マーキングは初めの 7 日間継続して行い、その後の 3 日間は捕獲だけを行った。

## 5. フラビウイルス感染検査診断に関する研究：

ウエストナイルウイルス (WNV) に関する研究においては、非感染性とした WNV 液を希釈用血漿で希釈し、300、100、30、10、0 cps /mL 濃度のウイルス添加血漿を作製し、TaqScreen®WNV Assay 試薬及び Procleix® WNV Assay 試薬を用いて NAT を各々27重測定した。また、実検体による試験として献血血液の NAT 用検体を用いて作製した20本プール NAT 検体で、HBV、HCV 及び HIV のスクリーニング NAT 陰性の240検体を2つの WNV 試薬を用いて3回に分けて測定した。

フラビウイルス遺伝子検出法の感度を増加させる目的でデングウイルスをモデルとして、Flap RT-PCR 法の開発を行った。

### (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。動物を用いる実験においては、各研究機関の動物実験委員会において審査し承認を得た上で行なった。

## C. 研究結果

### 1. 血液からの異常プリオン除去法の開発：エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発

5%アルブミン製剤や10%FCS入りの細胞培養液では添付資料に記載されている2mLを添加して遠心することによって感染性を有した状態でウイルスを濃縮することができた。濃縮前の10µLの溶液に含まれるウイルス量と同じ溶液10mLから濃縮した沈

殿のウイルス量を検討したところ、牛下痢症ウイルスでは、約3Log濃縮されていた。また、10%FCS入りの培養液を用いても同様な結果であった。さらに仮性狂犬病ウイルスやシンドビスウイルスも同様に効率良く感染性を有した状態で濃縮することができた。

### 2. 国内外でのシャーガス病キャリアーの把握と献血対策に関する研究：

中南米地域からの定住者が多い東海4県(愛知県、静岡県、岐阜県、三重県)の「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者に対して、同意を得た上で、*Trypanosoma cruzi*抗体検査とシャーガス病に関するアンケート調査を行うパイロットスタディを実施した。平成25年1月8日～11月30日で、対象者は457人で、男性335人(73%)、女性122人(27%)、平均年齢35.1歳、67%が40歳未満の若い世代であり、献血回数については、初回献血者が42%であった。対象者の88%がブラジル出身、日本滞在年数は平均15.3年であった。また、幼少時の家の構造が土壁と回答した件数が3%、家族にシャーガス病と診断された者が1.5%と、シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。対象者457人のうち1人が*T. cruzi*抗体陽性であった。*T. cruzi*抗体陽性リスクを推計すると、全国で1年間に*T. cruzi*抗体陽性となる献血者は5人以下と考えられた。

献血の機会のないラテンアメリカ人についてブラジル移動領事館及びラテンアメリカ人コミュニティーで開催される健康相談会に支援協力し、健康相談に合わせて*T. cru*

zi抗体の検査を実施した。研究調査により判明した*T. cruzi*抗体陽性者に対してどのように医療体制を整えるかを検討した。

### 3. ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発：

マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法のLAMPおよび簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法( ICT )について、人血液試料を用いてその有用性を確認することを目的とした。LAMPについては神戸医療大学から提供を受けた111検体の人血液よりDNAを抽出して検討を行った。その結果、抗体陽性を示した61検体中、LAMPで陽性を示した検体は5検体のみで、非常に検出率が低かった。また、IFATで陰性を示した50検体中、LAMPで陽性を示した検体が1例認められた。ICTについては、エール大学より60検体の人血清を入手し、これらの血清を用いて、検討中を開始した。

### 4. フラビウイルス媒介蚊に関する研究：

調査地の広さは230m×250mで、調査地内には緑地、人家、商店、ビルが存在し、ヒトスジシマカの生息場所が点在していた。個体識別マーキングは初めの7日間行い、合計232頭のヒトスジシマカと216頭のオオクロヤブカをマークして、4ヶ所から放逐した。ヒトスジシマカの再捕獲率は0.21(48/232)で、オオクロヤブカの0.09(20/216)よりも有意に高かった。またヒトスジシマカの再捕獲率を放逐場所間で比較したところ有意に異なっていた。放逐された蚊の動きを分析した結果、大きな緑地の内部はヒトスジシマカとオオクロヤブカの潜伏や吸血動物の探索に好適であり、雌

成虫が周囲の生息場所から集まってくることが示唆された。

### 5. フラビウイルス感染検査診断に関する研究：

ウエストナイルウイルス(WNV)の国内発生に備えて現在備蓄しているTMA法のWNV-NAT試薬(Procleix® WNV Assay)と日本赤十字社4ヶ所のNAT施設が保有しているcobas®s401システムを用いたTaqMan PCR法のWNV-NAT試薬(TaqScreen® WNV assay)について、感度の比較検討を行った。TMA法のWNV-NAT試薬の方が、TaqMan PCR法の同試薬と比べ高く安定した結果が得られたが、両者とも製造各社が示している感度とほぼ同等であり、十分な結果が得られた。また、WNV国内感染発生時にWNV-NATを組み入れた場合、現行のNATスクリーニングの検査所要時間、完了時刻にどの程度影響するかについて、実検体を用いてシミュレートした。WNV対象NAT検体が先行して検査できる場合は、通常検査の平均所要時間9時間20分に比べ40分程度の延長で対応できることが確認できた。

フラビウイルス遺伝子検出法の感度を増加させる目的でデングウイルスをモデルとして、Flap RT-PCR法の開発を行った。PCRプライマーの5'末端に12塩基からなるFlap配列を付加することにより増幅感度あるいは増幅量が改善されとの報告がある。昨年度我々はデングウイルス検出用プライマーにFlapを連結したが改善効果は見られなかった。そこで今回Flapを2種類のフラビウイルス共通プライマーセットと1種類のアルファウイルス共通プライマーに付加し、その効果を検討した。NS3領域に対



応するフラビウイルス共通プライマーの場合、使用した3種類のウイルス（デング1型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ヨコセウイルス）のすべてで増幅感度および増幅量が向上した。一方NS5領域に対応するプライマーではウイルス種によって結果が分かれた。4種のアルファウイルス（チクングニヤウイルス、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、ゲタウイルス）について、Flapを付加したアルファウイルス共通プライマーを試したところ、いずれのウイルスに対してもFlapは効果的であったが、チクングニヤウイルスでの効果は弱かった。またFlap付加アルファウイルス共通プライマーを使用して、ゲタウイルスゲノムを増幅した。

#### D. 考察

エキソソーム精製試薬を用いて細胞培養上清中の異常プリオンを濃縮できることをこれまでに報告したが、同じ試薬を用いることによってウイルスも濃縮できることを昨年度報告した。今年度は、10%牛胎児血清入りの細胞培養上清や血清、さらに血漿からのウイルス濃縮が可能なのか検討した。血清や血漿では添加するエキソソーム精製試薬の量を適正化することによって10mLという大容量からウイルスを効果的に濃縮することが可能になった。濃縮したウイルスは感染性を有し、検出法としてだけではなく、ウイルスの不活化・除去法の評価用の高力価のウイルス調整法としても有用な方法であることが明らかになった。さらに濃縮効果は非常に微量なウイルスも同様に濃縮することができることも明らかにすることができた。

シャーガス病に関する、東海4県のパイロットスタディのアンケート調査により、「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者の背景は、男性が73%、女性が27%と男性が多く、平均年齢35.1歳、67%が40歳未満の若い世代であり、献血回数は42%が初回献血であった。大多数の88%がブラジル出身であり、日本滞在年数は平均15年であることが明らかとなった。また、幼少時の家の構造が土壁と回答した件数が3%、家族にシャーガス病と診断された者が1.5%と、シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。

東海4県の中南米出身献血者（カテゴリ-1）の対象457名中*T. cruzi*抗体陽性者は1名のみであったこと、全国で中南米出身献血者（カテゴリ-1）は2,149人/年であったこと、東海4県の他のカテゴリ-（2・3）での疫学調査から陽性者は認められていないことから、全国で1年間に*T. cruzi*抗体陽性となる献血者は5人以下と推計された。一方、中南米滞在歴等を有する献血者の約3/4を占め、ほとんど日本人と考えられるカテゴリ-3「中南米諸国に通算4週間以上滞在した」の滞在期間等の基準については、今後の調査、検討により見直しが必要であると考えられ

輸血用血液の*B. microti*感染の有無を評価する検査法に関して、人検体を用いて、real-time LAMP法およびICTを実施した。その結果、LAMP法により*B. microti*に特異的なバンドパターンが得られた。また、ICTにより、*B. microti*重症感染発症患者および不顕性の血液ドナーの血清中から抗体が検出された。更に、100例以上のヒ

ト DNA サンプルを用いて、LAMP 法を実施した。しかしながら、61 例の抗体陽性者の DNA サンプルを用いた LAMP 法で、5 例より陽性反応が認められなかった。しかし、3 株の *B. microti* から抽出された DNA を陽性対照として用いたところ、3 種の株で遺伝子増幅が認められた。これら神戸株、ミュンヘン株、グレイ株はそれぞれ日本、ドイツ、アメリカから分離されたものであり、地理的に非常に隔だっているにも関わらず遺伝子増幅が認められたことは、本 LAMP 法が世界的な *B. microti* の検出に使用可能であると示唆される。また、アメリカの流行地で採取された人血清を用いて、ICT の有用性の検討は今回期限内に実施できなかった。しかしながら、ICT の作製に使用された BMN17 遺伝子情報はミュンヘン株から得られており、世界的に非常に良く保存されている。このミュンヘン株の遺伝子情報に基づいて作製され組換え蛋白質を用いた ICT により、地理的および遺伝的に遠い神戸の患者血清で抗体を検出できたことから、本 ICT の実用化の可能性は高いと考えられる。今後、更により多くの人血清数を用いて、これらの遺伝子ならびに血清診断法のその有用性について検討する必要がある。

個体識別マーキング法を用いたヒトスジシマカの移動分散に関する研究においては、採集場所 C から放逐された個体がそのままとどまる可能性が高く、また、周辺の場所から C へ移入してくる個体も多いことがわかった。特にヒトスジシマカの場合、採集場所 B から C へは方向性を持って移動している個体が多いことが示唆される。これらの結果は、採集場所 C の周辺がヒトスジシマカやオオクロヤブカの潜伏や吸血飛来に

適した場所であることを意味している。多くの住宅街には大小の茂みや緑地が存在することから、採集場所 C のように潜伏や吸血飛来に適した場所がどのように分布しており、それがヒトスジシマカの移動にどのように影響しているかを今後の研究で明らかにする必要がある。

## E . 結論

プリオン研究について、変異型プリオン病の検出感度を上げるための基盤研究を行った。血清や血漿では添加するエキソソーム精製試薬の量を適正化することによってウイルスを効果的に濃縮することが可能になった。濃縮したウイルスは感染性を有し、検出法としてだけでなく、ウイルスの不活化・除去法の評価用の高力価のウイルス調整法としても有用な方法であった。シャーガス病については東海四県において同意を得た中南米居住歴を有する献血申込者に対し *T. cruzi* 抗体検査を実施した。対象者は 457 人であり 1 人が *T. cruzi* 抗体陽性であった。バベシア症については、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) について、人血液試料を用いてその有用性を確認することを行った。ウイルス媒介蚊について、ヒトスジシマカの移動分散に関する実験を行った。ヒトスジシマカの再捕獲率はオオクロヤブカよりも有意に高かった。またヒトスジシマカの再捕獲率を放逐場所間で比較したところ有意に異なっていた。フラビウイルス遺伝子検出法の感度を増加させる目的で Dengue ウイルスをモデルとして、Flap RT-PCR 法の開発を行った。

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

Krayukhina E,Uchiyama S,Nojima K,Okada Y,Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. J.Biosci Bioeng.2013.115(19): 104-10.

Baylis SA,Blumel J,Mizusawa S,Matsubayashi K,Sakata H,Okada Y,Nubling CM, Hanschmann KM, HEV collaborative Study Group.: World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. Emerg. Infect. Dis. 2013.19(5):729-735.

Imai, K., Maeda, T., Sayama, Y., Mikita, K., Fujikura, Y., Misawa, K., Nagumo, M., Iwata, O., Ono, T., Kurane, I., Miyahira, Y., Kawana, A. and Miura, S.: Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. Emerging Infectious Diseases. 20(1):146-148. 2014

2 ) 和文論文

1)岡田義昭、輸血用血液における病原体不

活化技術の現状と新規技術の開発。検査と技術 42: 4-7, 2014

2 . 学会等発表

1 ) 国際学会

S. Momose, Y. Furui, M. Ishinoda, T. Takahashi, S. Igarashi, Y. Sayama, S. Miura, C. Matsumoto, S. Uchida, S. Hino, A. Onitsuka, T. Minamizawa, M. Hamaguchi, M. Okada, J. Takamatsu, M. Satake, M. Minami, K. Tadokoro : Anti-tripanozoma cruzii test and questionnaire survey in Japan for blood donors native of latin America. 24<sup>th</sup> Regional Congress of the ISBT, Kuala Lumpur, Malaysia 2013

2 ) 国内学会

岡田義昭、水沢左衛子、浜口功：血漿分画製剤からの簡便なウイルスの濃縮法：第 6 1 回日本輸血・細胞治療学会、横浜、2013 年

岡田義昭：血漿及び血漿分画製剤からの簡便なウイルス濃縮法とその応用、第 6 1 回日本ウイルス学会、神戸、2013 年

古澤秀明、森安浩之、後藤康仁、増田久美子、馬場明美、学、山中烈次、平力造、百瀬俊也、河敬世：我が国におけるウエストナイルウイルス(WNV)感染発生時の献血血液の検査、第 37 回日本血液事業学会総会、札幌、2013 年

津田良夫．ヤブカの個体識別マーキング法の検討：石垣島におけるヒトスジシマカとオオクロヤブカを用いた実験．第 65 回日本

衛生動物学会東日本支部大会、2013 年 10  
月 25 日、川口市

田島茂、小滝徹、谷ヶ崎和美、小林大介、  
谷脇妙、沢辺京子、高崎智彦 . Flap 配列を  
付加したフラビウイルス共通プライマーお  
よびアルファウイルス共通プライマーの評  
価とゲタウイルス検出の実例について . 第  
20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、  
神戸、2013 年 11 月

#### 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

## 分担研究報告書

### 血液からの異常プリオン除去法の開発

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

エキソソーム精製試薬を用いて細胞培養上清中の異常プリオンを濃縮できることをこれまで報告したが、同じ試薬を用いることによってウイルスも濃縮できることを昨年度報告した。今年度は、10%牛胎児血清入りの細胞培養上清や血清、さらに血漿からのウイルス濃縮が可能なのか検討した。血清や血漿では添加するエキソソーム精製試薬の量を適正化することによって10mLという大容量からウイルスを効果的に濃縮することが可能になった。濃縮したウイルスは感染性を有し、検出法としてだけでなく、ウイルスの不活化・除去法の評価用の高力価のウイルス調整法としても有用な方法であることが明らかになった。さらに濃縮効果は非常に微量なウイルスも同様に濃縮することができることも明らかにすることができた。

#### A. 研究目的

ウシ海綿状脳症の対策が功を奏し、狂牛病を発症したウシの数は激減した。それに伴い変異型CJD (vCJD) の報告は、2000年をピークとして減少し、2013年の英国の死亡例は0となった。我が国では、英国等の滞在歴を有する献血者からの採血を制限していることや白血球除去フィルターの導入によって血液製剤を介した変異型CJDの感染する可能性は非常に少ないものとなっている。また、異常プリオンを核酸増幅検査のように増幅させるPMCA(Protein Misfolding Cyclic Amplification)法の増幅効率が向上し、CJDと診断された患者の髄液からも異常プリオンが検出できるようになった。このような状況の中で、必要が生じたときに血液中からも異常プリオンを検出できる方法を開発しておくことが必要であ

り、エキソソーム精製試薬を用いることによって感染細胞の培養液から異常プリオンを濃縮・検出できることを報告してきた。さらに昨年度、ウイルスの粒子とエキソソームが細胞質から小胞に放出する場所が同じであることから両者の性状が類似していると推定し、エキソソーム精製試薬を用いてウイルスの濃縮を試みた。5%アルブミン製剤や免疫グロブリン製剤では10mLから効率良くウイルスを濃縮できることを明らかにしたが、血清や血漿では困難であった。今年度は、至適条件を検討し、血清や血漿からウイルスを効率良く濃縮できる方法を検索した。

#### B. 研究方法

##### (1) エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発

10%牛胎児血清入りのDMEMと5%アルブミン

製剤 10mL に牛下痢症ウイルス (BVDV)、仮性狂犬病ウイルス (PRV)、シンドビスウイルスを添加し、よく混ぜた後に濃縮前検体として 10~100  $\mu$ L を採取した。採取後の約 10m のウイルス溶液に市販されているエキソソーム精製試薬 ExoQuick-TC (System Biosciences 社) を 2mL 添加し、4℃ にて 14 時間以上静置した。反応後、1500g で 30 分遠心して得られた沈殿を 500  $\mu$ L の PBS で溶解しウイルス濃縮液とした (図 1)。

牛胎児血清とヒト血漿では、それぞれ 10mL に添加するエキソソーム精製試薬の量を 0~2 mL に変化させ、それぞれから得られた沈殿を PBS に溶解後、含まれるウイルス量を測定した。

また、極微量のウイルスに対する回収率を評価するために仮性狂犬病ウイルスを牛胎児血清 1 mL 当たり約 10 感染価に調節した牛胎児血清にエキソソーム精製試薬を添加し、上記と同様の処理を行い、回収効率を検討した。

## (2) ウイルスの感染価測定

牛下痢症ウイルスの感染価は、MDBK 細胞を用いた。感染 1 日前に 96 穴プレートに  $5 \times 10^4$ /well を蒔き、PBS で 500  $\mu$ L にした濃縮前後のウシ下痢症ウイルス (BVDV) を 10 倍ずつの段階希釈を行ない、10 の各々独立した希釈系列を作製し、100  $\mu$ L ずつ細胞に感染させた。感染 7~10 日後に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って各検体の TCID<sub>50</sub> を求めた。

仮性狂犬病ウイルス (PRV) の感染価は、CRFK 細胞を用いた。感染 1 日前に 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$ /well を蒔き、PBS で 500  $\mu$ L にした濃縮前後の仮性狂犬病ウイルスを 10 倍ずつの段階希釈を行ない、10 の各々独立した希釈系列を作製し、100  $\mu$ L ずつ細胞に感染させた。感染 3~5 日後に CPE

の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って各検体の TCID<sub>50</sub> を求めた。

シンドビスウイルスの感染価は、Vero 細胞を用いた。感染 1 日前に 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$ /well を蒔き、PBS で 500  $\mu$ L にした濃縮前後のシンドビスウイルスを 10 倍ずつの段階希釈を行ない、10 の各々独立した希釈系列を作製し、100  $\mu$ L ずつ細胞に感染させた。感染 3~5 日後に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って各検体の TCID<sub>50</sub> を求めた。

## (3) 微量ウイルスの回収効率の評価

牛胎児血清 11mL に 10 ビリオン/mL となるように仮性狂犬病ウイルスを添加し、濃縮前の検体 1 mL を採取した。残りの 10mL の検体に 0.3 mL のエキソソーム精製試薬を添加し濃縮した。濃縮前の検体に培養液 4.5mL を加え、前日に蒔いておいた CRFK 細胞に 100  $\mu$ L ずつ 48 穴に感染させた。濃縮したウイルスは、PBS 500  $\mu$ L で溶解後培養液を 10mL 添加し、前日に蒔いておいた CRFK 細胞に 100  $\mu$ L ずつ 96 穴に感染させた。感染 3~4 日後に CPE を生じたウエル数を数えた。実験は独立に 4 回行った。

## C. 研究結果

### (1) エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発

5% アルブミン製剤や 10% FCS 入りの細胞培養液では添付資料に記載されている 2 mL を添加して遠心することによって感染性を有した状態でウイルスを濃縮することができた。濃縮前の 10  $\mu$ L の溶液に含まれるウイルス量と同じ溶液 10mL から濃縮した沈殿のウイルス量を検討したところ、牛下痢症ウイルスでは、約 3Log 濃縮されていた。

また、10%FCS 入りの培養液を用いても同様な結果であった。さらに仮性狂犬病ウイルスやシンドビスウイルスも同様に効率良く感染性を有した状態で濃縮することができた(図2)。次に血清と血漿を検討したが、大量の沈殿が生じ溶解することは困難であった。これまで市販のエキソソーム精製試薬のプロトコールに従って添加する試薬の量は 10mL 当り 2 mL と決めていたが、ウイルスが沈殿する至適添加量を解析したところ、2 mL よりも少ない量で充分であることが判明した(図3)。そこで血漿でエキソソーム精製試薬の量を検討したところ、10mL 当り 0.3~0.5 mL 添加すれば、ウイルスは沈殿してくるが血漿タンパクの沈殿が少ないことが明らかになった(図4)。

#### (2)微量ウイルスの回収効率の評価

濃縮前の検体から 4 回平均で 4.5 個の感染性ウイルスが回収できた。一方、濃縮後の検体からは平均 37.5 個のウイルスが検出され、約 83% のウイルスが濃縮できたことになる。血清から非常に濃度の低いウイルスが効率良く、しかも感染性を保持しながら濃縮できることが明らかになった。

#### D. 考察

エキソソーム精製試薬によって異常プリオンが濃縮されたことから昨年度は、ウイルスも同じ試薬によって濃縮できる可能性を検討し、10mL の 5% アルブミン製剤からほぼ全量のウイルスを沈殿中に濃縮できる事を明らかにできた。しかし、血清や血漿では溶解が不可能な程の大量の沈殿が生じてしまい濃縮できなかった。今年度は、血清や血漿などタンパク質濃度の高い溶液でも濃縮可能な方法を検討した。用いた精

製試薬では検討した 3 つのウイルスが感染性を保持した状態で濃縮できることが明らかになったので容易にウイルスの感染価を指標に濃縮効率を評価することができた。そこで添加する試薬の量を変えてそれぞれの濃縮効率を解析した結果、10%FCS 入りの細胞培養液において 2 mL よりも少ない精製試薬によっても濃縮できることが明らかになった。この結果を基に牛血清とヒト血漿も同様に検討した結果、10mL 当り 0.3~0.5 mL の精製試薬を添加すれば、共沈してくる血漿タンパクを減少させウイルスが濃縮できることが判明した。培養液と同様に感染性も保持していた。また、検討したウイルス溶液はウイルス量が多いことから極めて少ない場合の濃縮効率も確認した。1 mL 当り数個のウイルスが混入した血清 10mL を濃縮したところ約 83% のウイルスを回収することができ、微量なウイルスにおいても充分濃縮できることを明らかにすることができた。10mL から濃縮できる本方法は、血漿分画製剤や原料血漿等に混入する極めて少量のウイルスを簡便に濃縮できることから血液製剤の安全性向上に有効だと考えられた。

#### E. 結論

エキソソーム精製試薬を用いる事によって異常プリオンだけでなくウイルスも血清や血漿から通常の実験室にあるような遠心機と冷蔵庫があれば、簡便に濃縮できることを明らかにした。極微量なウイルスも濃縮することで検出可能になることが期待でき、血液製剤の安全性向上に貢献すると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity.

J. Biosci Bioeng. 2013. 115(19): 104-10.

2) Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nubling CM, Hanschmann KM, HEV collaborative Study Group.: World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA.

Emerg. Infect. Dis. 2013. 19(5): 729-735.

3) 岡田 義昭、輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発。

検査と技術、42巻、4～7ページ、2014年。

### 2. 学会発表

1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、浜口 功：血漿分画製剤からの簡便なウイルスの濃縮法：第61回日本輸血・細胞治療学会、横浜、2013年

2) 岡田 義昭：血漿及び血漿分画製剤からの簡便なウイルス濃縮法とその応用、第61回日本ウイルス学会、神戸、2013年

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



分担研究報告書

国内外でのシャーガス病キャリアーの把握と献血対策に関する研究  
(慢性期シャーガス病の調査研究)

研究代表者: 倉根一郎(国立感染症研究所 副所長)

研究協力者: 日本赤十字社中央血液研究所感染症解析部・三浦左千夫

研究要旨:

在日ラテンアメリカ人の定住化が進み、企業献血を含め地域に密着した献血に協力する者も増加傾向にある。また、定住化に伴ないわが国での出産、育児、教育など日本人として成長をする第二、第三世代がすでに献血年齢に達し、先天性シャーガス病キャリアーが献血をする危険性も出てきた。シャーガス病慢性感染者が潜んでいる可能性が極めて高いことはすでに明らかであり、本疾患を媒介する昆虫が生息しない我が国では輸血感染、臓器移植感染、母子感染以外に感染経路はない。二次感染防止対策上ラテンアメリカ人集住地域での献血血については日赤中央血液研究所で極力実施した。一方献血の機会のないラテンアメリカ人についてはブラジル移動領事館及びラテンアメリカ人コミュニティで開催される健康相談会に支援協力し、健康相談に合わせて *T. cruzi* 抗体の Rapid 法による検査を実施した。本年度は研究調査により判明した *T. cruzi* 抗体陽性者に対してどのように医療体制を整えるかを検討、先天性感染例を含めて3例について、南米で本疾患治療に推奨されている LAFEPE-Benzimidazol を用いて治療を行った。わが国での *T. cruzi* 抗体陽性者及び有症者に対する医療関係機関での対応について具体的に経験し Chagas 病に対する我が国での治療指針作りのデータの集積が出来た。

A. 研究目的

在日ラテンアメリカ人集住地域での *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) 抗体保有者の検索。

献血者の *T. cruzi* キャリアーに対するケアの在り方の検討。

在日ラテンアメリカ人先天性感染 Chagas 病の有病率について検討する。

*T. cruzi* 抗体陽性者に対する対処マニュアル作成

B. 研究方法

1) 在日ラテンアメリカ人集住地域において NPO、ブラジル領事館などの協力の基で

調査研究参画への同意書が得られた人たちを対象に抗体検査を行う。

2) ラテンアメリカ人集住地域医療機関から検査依頼を受けた血清を用いて病

原性 *T. cruzi* に対する IgG 抗体の有無をクロ

マト法、IFA、ELISA 法 PCR 法で検討する。

以上の血清検査診断は、各地の医療機関から依頼される血清検体と同様にブラジル領

事館倫理委員会・日本赤十字社血液事業研究倫理審査委員会、治療行為に関しては防

衛医科大大学校付属病院倫理委員会、那須日赤病院倫理委員会の承認の下に行った。

また、抗体陽性者の健康上の精査に関しては紹介先医療機関の指針に従った。

### C. 結果：

1 & 2) 愛知県、静岡県、神奈川県、群馬県、三重県下のラテンアメリカ人定住者コミュニティのある地域で *T. cruzi* 抗体の有無について Chagas-Stat-Pack (Chembio) および、Trypanosoma-Detect (In-Bios) キットを用いて検討した。

今年度12月末日現在272名の抗体検査を実施した。今年度は男女1名ずつの抗体陽性者を検出、即ち本年度の健常者検診者の内0.72%に抗体陽性者を検出した。検査を受けた男女比は男性105名、女性が167名であった。又、平均年齢分布は男性48才、女性45歳であった。今年度の抗体陽性者はいずれも50代の日系ブラジル人で、ブラジルの疫学的流行地Jales-SP, Assai-PRの出身であった。また在日歴は両者とも20年以上を経過している。男性は自覚症状もなくPCRでも陰性で虫血症は認めなかった。一方女性は既に循環器合併障害を訴え、循環器科を受診中であった。彼らは日赤で実施している疫学調査対象地域外に居住していた。また日赤の疫学対象地域外でのラテンアメリカ人コミュニティで33/272名(12.13%)名が日本での献血を経験していた。本年度の*T. cruzi* 抗体陽性者の男性は定住地域の基幹病院での経過観察を行っている。一方、女性陽性者については本人の希望でBenznidazoleによる治療を実施し、現在通院経過観察中である。彼女には3名の息子が居るが全員抗体は陰性で母子感染は否定された。

### 本年度4月から12月までのラテンアメリカ人コミュニティでの*T. cruzi* 抗体検査

・ 抗体検査法(迅速診断STAT-Pack、Chagas-detect) いずれの方法

**結果**  
検査総数 **272名**  
男女比: 男性 105名(1)、女性 167(1)  
抗体陽性率 **0.74%**  
平均年齢: 男性 47才 女性 44才  
日本での献血 **33名(12.1%)**

献血者の多かった地域は静岡、長野が複数人それ以外の地域では岐阜、埼玉、群馬、神奈川、栃木が各一名ずつであった。同一地域での複数献血は企業献血の可能性はある。

昨年度からの東海4県のバイロット地域以外の地域からの献血者が多かった。

今回献血者から *T. cruzi* キャリアーが出たが、今回の血液センターでの献血以外の分は勤務先での企業献血であった事が判明。

今回のラテンアメリカ人の平均滞日年数は15.5年であり、治療対象となった先天性感染児もすでに初回検査時には12歳であった。感染に気付くことなく数年後には献血年齢に達し善意の献血にボランティアとして参加することが可能となる。本人周囲もChagas病を認知することなく病原体を広めてしまう危険があることを熟知させ、二次感染予防に努めるべく医療機関へ紹介経過観察を推奨した。特に12013年度に行ったラテンアメリカ人コミュニティでの*T. cruzi* 抗体検査では2名、更に献血者より2名(4/272 = 1.47%)と前年調査研究期間を下回るものであった。

### 2011~13年度*T. cruzi*抗体陽性者数

年度	検査数	<i>T. cruzi</i> 抗体陽性者数
2011	55	2
2012	195	5
2013	272	4
合計	522	11(2.1%)

前回調査期間中の抗体陽性者 20/1,108(1.8%)

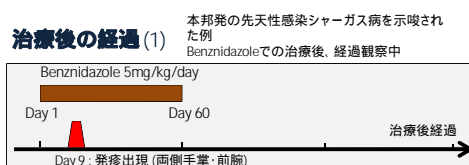
更に在日ブラジル人およびボリビア人の献血人数と現在までの在日ラテンアメリカ人の*T. cruzi* 抗体陽性率(1.9%)から潜在

する抗体陽性者数は数十名と推定される。シャーガス病に関する世界的な見直しにより情報は国内外伴に関心が高まりつつあり在日ラテンアメリカ人の検診相談が増加した。母国での啓蒙教育のため病名だけ知っている程度であったが在日ラテンアメリカ人の集住地域東海4県以外でもシャーガス病に関する啓発活動は自治体の多文化共生課など行政(各県国際交流課など)がNPO、NGOと共同で実施するようになった。各地のコミュニティーで行われる*T. cruzi*抗体診断キット(試験研究用)は現在CHAGAS-STAT-PACK(CHEMBIO) Detect-

*Trypanosoma cruzi*(In-Bios)の両者が特異性が高く中南米の流行地でスクリーニングにも採用をされている。しかし、実情は各地方自治体やラテンアメリカ人集住地域の基幹病院検査科などでは検査用キットを常備出来ない。同時に一般医家も含めてChagas病に関する情報をもっと知りたいとの要望もあった。世界的にChagas病のグローバル化が進み、我が国でも慢性Chagas病に対する具体的な治療対策が期待され更には慢性キャリアーの対策は先天性感染児に対する早期治療に繋がる。

スクリーニング検査法等に関して現在日赤中央血液研究所において検査用キットの国産化なども視野に検討中であり、当面は既存の研究用キットを併用し検討を行うが、今回分離出来た*T. cruzi*を有効利用しIFA検査キットの標準化、LAMP法、PCR法にて潜在感染者の抗原キャリアー検出を行っている。今年は抗体陽性者即ちChagas病感染者に対する特異的治療を行った。予後の経過観察に関しては、日赤中央血液研究所感染症解析部で行っている。

本研究期間内のラテンアメリカ人コミュニティーでの検診で抗体陽性者に対しては、病院受診を奨め、治療に至った2例について以下に示す。



項目	単位	Day 0	Day 5	Day 12	Day 19	Day 40	Day 76	Day 185
WBC	/ $\mu$ L	6,000	5,600	5,600	6,000	7,800	6,600	6,600
RBC	$10^9$ / $\mu$ L	5.11	5.18	5.25	5.22	5.10	5.18	5.40
Plat	/ $\mu$ L	27.0	23.4	23.3	26.1	29.5	25.1	24.8
AST	IU/L	19	20	21	21	21	24	19
ALT	IU/L	13	15	22	20	13	18	14
T-Bil	mg/dL	0.5	0.7	0.5	0.5	0.6	0.5	0.7
Cr	mg/dL	0.61	0.70	0.75	0.68	0.70	0.73	0.71

1) 先天性感染例(自覚症状なし) Benznidazole 国内未承認薬による治療ではあるが、流行国での15歳未満の*T. cruzi*感染者に対しての治療指針・病院倫理委員会の承認の基で入院治療を実施した。

治療開始後に見られた皮疹(手掌)



NDMC

投薬開始後9日目より掻痒感を伴う小紅斑が出現したが3日目には自然消滅した。現在も*T. cruzi*抗体は陽性であるが、虫血症は(PCR,全血培養)消滅した。今後更に経過観察を日赤中央血液研究所感染症解析部にて継続検討を行う。症例2)は循環器の異常を訴え、地元循環器センターで心臓のケアを受けつつ、ブラジル領事館で行っている健康相談*T. cruzi*抗体検

査にてChagas病末期合併症の診断の下、Chagas病慢性期に対するBenznidazole治療の困難さは否定できないが、本人の希望で(1)同様に防衛医科大学病院にて入院治療を実施した。



この例は今後我が国で最も多く遭遇する症例と思われる。日系2世ブラジルパラナ州出身55歳女性(子供3名は抗体陰性)治療経過中に肝障害、末梢神経障害などの副作用を発現したがその後対症療法にて軽減し、現在は通常の通院観察を継続している。PCR, 全血培養では虫血症は認められないが抗体価の改善は未だ認めない。

日赤血液センターでの献血者に2名の抗体陽性者が出たが、そのうちの1名は日系ブラジル人2世(自覚症状なし)については日赤安全管理課より基幹病院を紹介、紹介先病院からの連絡の基に日赤中央血液研究所感染症解析部の協力を得、那須日赤病院にてBenznidazoleを用いての治療を行っている。軽度の循環器異常を理学所見として認めるものの、自覚症状は全くないために、合併症の抑制を目的とした、治療を行った。予後検査等に関しては日赤中央血液研究所にて行う。

D: 考察

全国に散在するラテンアメリカ人集住地

域でのTrypanosoma cruziに対する抗体検査は、2013年は在日ラテンアメリカ系メディア・インターナショナルプレス(IPC)の新聞、TV放送を通じて在日ラテンアメリカ人の多くにChagas病について啓蒙的な呼びかけを行い、日系ブラジル人の患者の一人(症例2)は自らTV出演をして、日本でもChagas病に関しての相談、ケアが出来ることを呼びかけた。また、在日ブラジル領事館(東京・名古屋)の協力で地域国際交流課などとの共同作業で広い地域での抗体検査を呼びかけた結果272名の検査が実施出来、官民一体となった作業が重要である事が認識された。今年の抗体陽性者4名の内1名はChagas病慢性期合併症発症を診る以外は2名は自覚症状なし、1名は医療機関への受診が無く不明である。いずれも感染慢性期であり2名についてはPCRでT.cruzi-DNAが検出され病原体キャリアーであることが示唆され治療を推奨した。今後Brazil, Boliviaからの在日日系定住者のシャーガス病の慢性期合併症発症例が増加する事に対しての、日本の医療機関での対応マニュアルの作成が待たれる。同様に在日ラテンアメリカ人の献血者で抗体陽性を認めた場合の輸血制限に関しては日本赤十字社の輸血制限基準を順守すると同時に、当該者に対する的確な医療機関への紹介及びそのケアが懸案事項となる。特に一般のコミュニティでの検査対象者の平均年齢がブラジル人集団53歳、ボリビア人集団52歳と、明らかに献血対象者の平均年齢37歳と隔たりが認められ、今回の献血者からの陽性者も自覚症状は認めない慢性期合併症発現初期の治療対象になり得るケースであった

事は、今後の慢性感染者対策に有意な多くのデータが得られるであろうことを期待する。

今回日赤血液センターを通じての献血対象者の中から *T.cruzi* 抗体陽性者は2名であり、一名については既に本人希望により治療が行われ、通院観察中であるのに対して、先にも記述のように日赤を通じての医療機関への紹介にも関わらず、6ヵ月を過ぎた現在も医療機関への受診が確認をされていない。ラテンアメリカ人献血平均年齢が30代と若年であるため、慢性期の合併症発現を見ない者が多いと思われるため、その抑制のためには早めの医療機関への受診相談が待たれる。今日でもなお南米に於いて最もシャーガス病感染リスクの高いボリビアからの在日定住者は6000名前後であるが、ボリビア人集団を組織的に健診が出来ないのは、彼らのコミュニティーを把握するリーダーが居ないことにある。今年NPO-日本ボリビア中央協会の協力で *Bolivia* 日系家族に対する *T.cruzi* 抗体スクリーニングおよび、検査啓発を三重県津市で行い国内での健康相談、抗体検査が可能とをアピールした。そうした中で日系ボリビア人の抗体陽性者が献血者から判明したのはChagas病検査目的で有ったとも推測される。

*T. cruzi* 抗体陽性者に対する今後の対策については、既に滋賀県守山成人病センター、滋賀県公立甲賀病院・愛知県岡崎市市立病院・三重医大付属病院・那須日赤病院・東海大学大磯病院・防衛医科大学病院など複数の医療機関が慢性期合併症に関して対処している。中でも防衛医科大学病院、那須日赤病院では我が国未承

認薬 Benznidazole を用いてのChagas病治に関して倫理委員会の承認を経て本疾患の治療を実施出来た事は今後の我が国での本疾患に対する治療指針作りに貢献するとその結果、及び予後経過観察について期待する。既にこうした治療結果の評価を待つ抗体陽性者も少なくないはずである。

なお、今回の治療例3例とも本研究班を通じて、ブラジル連邦共和国保健局シャーガス病対策部門へ患者情報を提供、政府管理下にある治療薬(LAFEPE-Benznidazole)の提供を各治療担当医療機関に行った。南米、中南米ではChagas病対策プロジェクトが国レベルで対応しており、年少者15歳未満の*T. cruzi* 抗体陽性者には積極的治療を行っている、然しながら慢性期の治療に関しては合併症との関連で、必ずしも実施されるものではない。然し其の検査から治療に至るまで全て対象者は国の支援で医療補助が受けられる。今後我が国においても慢性Chagas病・先天性Chagas病についても検査～治療全ての医療行為に対して保険対象になるようにChagas病の認知が必要となる。これらの未承認薬剤に関して熱帯病治療薬研究班の協力を得て、治療の必要がある場合には速やかに提供可能にすべく協力要請を行う。研究用検査試薬に関してもラテンアメリカ人集住地域の基幹病院には研究班を通じて提供するべく方策を検討する事がのぞましい。既に平均在日歴が15年以上となる今日、日本生まれの3世、4世の時代となり、先天性感染Chagas病児が更に見出されることは十分に予想され、日本生まれの潜在Chagas病感染者が新たな*T. cruzi*キャリアーとなりうる。

二次感染予防のためにも献血者以外のラテンアメリカ人に対しての疫学的抗体検査は可能な限り継続すべきである。また、今回献血者からの抗体陽性者が既に数年にわたり我が国で献血を行い、汚染血を材料とした輸血加工製剤が用いられていた事が判明し、日赤による遡及調査の結果受血者からは幸い感染者は検出されていないが、そのほかに同様のケースは十分に予想される。現に当該献血者は今回以前の献血行為は全て企業献血でリスクチェックをされないままに献血を経験してきている。また今回のコミュニティー検診時に33名の国内献血経験者があり、彼らの多くも企業献血であった事を報告している。中には日赤献血センターでの献血も数例あるが全て抗体陰性であった。

*T. cruzi* 抗体検査キットの評価対象として用いた Chagas - Stat-Pack (Chembio - USA) は特異性が高く Recombinant antigen を用いて、中南米で広く用いられているスクリーニングキットである。抗体をチェックするキットは多いが、一方で献血現場、医療現場で問題となる抗原のチェックシステム開発を急ぐことが急務である。そこで LAMP 法による検討を今後さらに推進することがのぞましい。Lamp 法に用いての *T. cruzi* 抗体検査キットに関して NPO-FIND (スイス) と栄研化学が提携をし、開発検討が始まった。今後在日ラテンアメリカ人を対象とした疫学調査の実施では地域特性を把握し成人を対象に検査を行うことが望ましいが、先天性感染シャーガス病検討のためには母親が抗体陽性の場合はその限りではない。中南米の治療指針では抗体

陽性者が15歳未満であれば、必然的に治療対処となる今後我が国でも増加は十分に予想される。こうしたことから特異的な治療薬に関して備蓄が望まれる、現在 Chagas 病治療については Lampit (nifurtimox) がバイエル社から流行国の多くに、及び我が国の熱帯病治療薬研究班にも提供をされている。然し Chagas 病慢性期合併症抑制にも期待される Benznidazole に関しては備蓄が無い。ラテンアメリカ人集団を中心に調査を更に継続すれば潜在感染者が検出されるはずであり、早期発見につながり彼らにとっても、自身の健康管理に有益である。また在日平均年から考え、すでに献血年齢に達する、わが国での出生、成人が増加することは十分に考えられる、彼らは日本人として献血する可能性が高い。また今回の先天性感染児のように、本人家族はまったく Chagas 病感染に気付いていないことがほとんどである。Chagas 病慢性感染母からの出産に関係した医療機関従事者の抗体検査も行い、2次感染の有無についても抗体検査が必要である。ラテンアメリカ人の出産に関わった医療関係者はすでにかかりの数になるはずである。

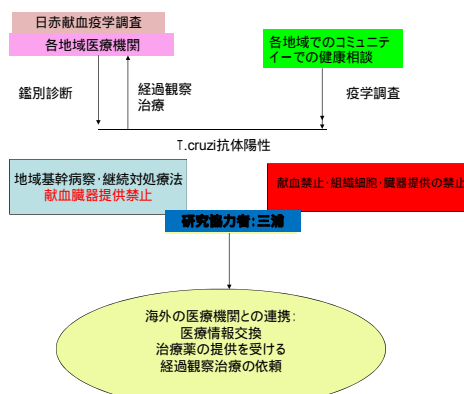
Bolivia では慢性シャーガス病妊婦の約5%に先天性感染児の出産が報告されている。今年度も多くの検診調査ができたのも各地の NPO、NGO、及びブラジル領事館の協力が得られた結果である。地域社会医療の面からも意義があったと思われ、今後のラテンアメリカ人集住地域での活動の推進につながりかつ、安全な献血協力への呼びかけにもなる。

今後も益々臨床的にケアすべき症例も増加傾向になり下記のごとく内外ともに協

力体制を整え、国内においても検査、治療がスムーズに実施される様に行政的にも法改正提案等を検討する。

### E . 結論

抗体陽性者、有症者に対するケアの流れを示す。



今後もラテンアメリカ人のシャーガス病慢性感染者を見出すために、南米からの定住者に対するブラジル領事部移動領事館業務、NPO,NGO、コミュニティーのイベント会場での健康相談会を利用することで、より多くの検討が出来る。

ブラジル人を対象にしたイベントでも、ペルー人、ボリビア人コロンビア人、アルゼンチン人などのラテンアメリカ諸国の参加もあった。ラテンアメリカ人支援NPO,NGO が実施するネットワークを通じシャーガス病検診のみならず、ラテン諸国の知られざる感染症に対する啓蒙講演は彼らを受け入れる地域社会の医療機関関係者への呼びかけにもなりうる。日本全国に散在するラテンアメリカ人集住地域での献血現場で実施する問診票の改訂も行い、感染のリスクのある者からの献血検体については日赤中央研究所に於いて、ELISA法を用いてのスクリーニングを行い陽性者に関しては血漿分画成分に限る製造制限を設け、病

原体による汚染を予防すべく措置を徹底した。

### F ) 健康危険情報

現在各地で内外問わずChagas病啓蒙活動に大変役に立っている医療コミック『ネメシスの杖』のダイジェスト版をポルトガル語版にして作成、掲示、検査の呼びかけを行っている。

総括報告参照

### G ) 2013年度業績

論分：邦文雑誌

1) シャーガス病における遺伝子学的診断法の開発と検討. 今井一男、前田卓哉、三木田馨、吉川幸尾、佐山勇輔、小野岳史、岩田理、武田晋作、宮平靖、川名明彦、三浦左千夫. 臨床寄生虫学会雑誌. 23号 p41-45,2013

2) Volume 20, Number 1—January 2014  
Dispatch

Mother-to-Child Transmission of Congenital Chagas Disease, Japan

Kazuo Imai, Takuya Maeda, Yusuke Sayama, Kei Mikita, Yuji Fujikura, Kazuhisa Misawa, Morichika Nagumo, Osamu Iwata, Takeshi Ono, Ichiro Kurane, Yasushi Miyahira, Akihiko Kawana, and Sachio Miura

[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/1/13-1071\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/1/13-1071_article.htm)

3) ベンズニダゾールにより治療を行ったシャーガス病の2症例：

前田卓哉、南雲盛親、佐山祐輔、三沢和央、今井一男、藤倉雄二、河野修一、原悠、叶宗一郎、三木田馨、小野岳史、宮平靖、川名明彦、三浦左千夫

日本臨床寄生虫学会誌 Vol -24-1-33

2013

講演：

1)「在日日系ブラジル人家族の健康管理と輸入感染症（シャーガス病）の現況について」。

サンパウロ人文科学研究所：研究例会

三浦左千夫

<http://www.nikkeishimbun.com.br/2013/13110-6-74colonia.html>

TV放映：

1) 奇跡体験・アンビリバーボー 緊急報告！恐怖の輸血感染 知られざる衝撃の真実

[http://www.fujitv.co.jp/unb/contents/131226\\_3.html](http://www.fujitv.co.jp/unb/contents/131226_3.html)

H) 該当なし



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及び  
国内献血におけるシャーガス病の感染リスクの把握

研究分担者 百瀬俊也（日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター製剤一部長）  
研究協力者 五十嵐滋（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課長）  
沖 学（日本赤十字社血液管理センター 検査課長）  
高松純樹（日本赤十字社東海北陸ブロック血液センター所長）  
鬼束惇義（岐阜県赤十字血液センター所長）  
南澤孝夫（静岡県赤十字血液センター所長）  
濱口元洋（愛知県赤十字血液センター所長）  
岡田昌彦（三重県赤十字血液センター所長）  
内田茂治（日本赤十字社血液事業本部  
中央血液研究所 感染症解析部長）  
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）  
平 力造（日本赤十字社血液事業本部 検査管理課長）  
古居保美（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）  
石野田正純（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）  
高橋 勉（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）  
古澤秀明（日本赤十字社血液管理センター 検査課）

研究要旨：

ウエストナイルウイルス（以下、WNV という）の国内発生に備えて現在備蓄している TMA 法の WNV-NAT 試薬（Procleix® WNV Assay）と日本赤十字社 4 カ所の NAT 施設が保有している cobas®s401 システムを用いた TaqMan PCR 法の WNV-NAT 試薬（TaqScreen® WNV assay）について、感度の比較検討を行った。TMA 法の WNV-NAT 試薬の方が、TaqMan PCR 法と同試薬と比べ高く安定した結果が得られたが、両者とも製造各社が示している感度とほぼ同等であり、十分な結果が得られた。また、WNV 国内感染発生時に WNV-NAT を組み入れた場合、現行の NAT スクリーニングの検査所要時間、完了時刻にどの程度影響するかについて、実検体を用いてシミュレートした。WNV 対象 NAT 検体が先行して検査できる場合は、通常検査の平均所要時間 9 時間 20 分に比べ 40 分程度の延長で対応できることが確認できた。

日本赤十字社では、平成 24 年 10 月 15 日から献血時のシャーガス病の安全対策として、本人又は母親が中南米出身である、あるいは通算 4 週間以上の中南米滞在歴のある献血者の血液は、輸血用血液として用いず、血漿分画製剤の原料として用いることとした。これら中南米滞在歴等を有する献血者数は、全国で 1 年間 9,392 人であった。そのうち「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」者は 2,149 人（23%）であった。

中南米地域からの定住者が多い東海 4 県（愛知県、静岡県、岐阜県、三重県）の「本人

が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者に対して、同意を得た上で、*Trypanosoma cruzi* 抗体検査とシャーガス病に関するアンケート調査を行うパイロットスタディを実施した。平成 25 年 1 月 8 日～11 月 30 日で、対象者は 457 人で、男性 335 人（73%）、女性 122 人（27%）、平均年齢 35.1 歳、67%が 40 歳未満の若い世代であり、献血回数については、初回献血者が 42%であった。対象者の 88%がブラジル出身、日本滞在年数は平均 15.3 年であった。また、幼少時の家の構造が土壁と回答した件数が 3%、家族にシャーガス病と診断された者が 1.5%と、シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。対象者 457 人のうち 1 人が *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性であった。*Trypanosoma cruzi* 抗体陽性リスクを推計すると、全国で 1 年間に *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性となる献血者は 5 人以下と考えられた。献血時のシャーガス病の安全対策を講じている日本では、輸血を介したシャーガス病の感染リスクはきわめて低いと考えられる。

## A．研究目的

現在、WNV 国内発生に備えて TMA 法の WNV-NAT 試薬（Procleix® WNV Assay：ノバルティス社）を 5000 テスト分血液管理センターに備蓄している。本試薬は TMA 法の試薬であり、測定機器 eSAS を保有しているのは京都府福知山市の血液管理センター及び東京都江東区の関東甲信越ブロック血液センターである。

日本赤十字社では、HBV、HCV、HIV の 3 ウイルスの NAT スクリーニングのために、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社（以下、ロシュ社）製 cobas®s401 システムを全国 4 カ所の NAT 施設に導入している。この cobas®s401 システムを用いた TaqMan PCR 法の同社製 WNV-NAT 試薬（TaqScreen® WNV assay）の感度及び特異性について、WNV 国際標準品の候補となる非感染性の WNV 液 2 種の提供を受け、TMA 法の WNV-NAT 試薬と比較検討した。

両社の WNV-NAT を日常検査に組み入れた場合、現行の NAT スクリーニングの検査結果のタイムスケジュールにどの程度影響するかをシミュレートした。

また、国内献血におけるシャーガス病の感染リスクを把握することは、日本において、献血血液の重要な安全対策上の課題と言える。日本赤十字社では、平成 24 年 10 月 15 日から献血

時のシャーガス病の安全対策として、本人又は母親が中南米出身である、あるいは通算 4 週間以上の中南米滞在歴（以下、中南米滞在歴等）のある献血者の血液は、輸血用血液として用いず、血漿分画製剤の原料として用いることとした。（図 1）これら中南米滞在歴等を有する献血者数を都道府県別カテゴリー別に明らかにし、リスク評価のための基礎資料にすることとした。

ブラジルからの定住者が数多く居住する愛知県、静岡県、岐阜県、三重県の東海 4 県において、「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」（カテゴリー 1）献血者に対して、同意を得た上で、*Trypanosoma cruzi*（以下、*T. cruzi*）抗体検査とシャーガス病に関するアンケート調査を行うパイロットスタディを実施し、抗体陽性者への健康管理に繋げていくようにした。

## B．研究方法

### 1．WNV-NAT

#### 1) 感度試験

日本赤十字社の製品検査で合格した献血血漿について、国立感染症研究所作成の「ウエストナイルウイルス病原体マニュアル(第 4 版)」に規定されている RT-PCR 法で WNV が陰性であることを確認し、陰性対象及びウイルス液希釈用血漿とした。

非感染性とした WNV 国際標準品の候補である WNV 液 2 種 (FDA WN02 lineage 1、以下 WNV-USA) と (the Roche secondary WNV standard, lot 72805: high titer sample、以下 WNV-ITA) を希釈用血漿で希釈し、100、50、10、5、1、0.5copies (以下 cps) /mL 濃度のウイルス添加血漿を各々 6 本作製し、同一検体で TaqScreen®WNV assay 試薬及び Procleix® WNV Assay 試薬を用いて NAT を各々 4 回実施した。各々の濃度における 24 重測定の結果から試薬感度を評価した。

## 2) 特異性試験 (実検体による試験)

献血血液の NAT 用検体を用いて作製した 20 本プール NAT 検体で、HBV、HCV 及び HIV のスクリーニング NAT (以下、MPX 検査) 陰性の 80 検体について、TaqScreen®WNV assay 試薬を用いて NAT を 2 回実施した。

## 3) 実検体を用いた検査シミュレーション

1 日の献血件数が約 800 件である地域で WNV 国内感染が発生したと想定して、前日到着済み検体の 800 本を WNV - NAT 対象検体と仮定しプール検体を作製する。現行の MPX 検査に加え WNV-NAT を同じ検体で実施した。それ以外は通常通りプール検体を作製し、順次 MPX 検査を行った。

WNV-NAT 対象検体は前日に血液管理センターに到着済で選別済であり、WNV-NAT と MPX 検査が実施できる状況を想定し、プール検体の作製から WNV-NAT 及び MPX 検査の両方の検査結果の確定に要する時間を通常時と比較検討した。

## 2. シャーガス病の感染リスク

献血受付時に、図 1 のカテゴリー 1~3 の中南米滞在歴等に該当し、血液事業統一コンピュータシステムに当該情報が入力された受付者数・献血者数を、都道府県別カテゴリー別に抽出・集計した。

中南米地域からの定住者が多い東海 4 県 (愛知県、静岡県、岐阜県、三重県) の中南米滞在歴等のある献血者のうち、カテゴリー 1 に該当す

る献血者に対し、本調査研究のインフォームドコンセントが得られ同意書に署名した者を対象とし、献血時の検査用検体を 1 本追加して初流血から採取した。併せて出身地、シャーガス病に関する認知度等の質問票に回答いただいた。検体は中央血液研究所に送付され、ELISA 法 (ORTHO® *T. cruzi* ELISA TEST System) 及びイムノクロマト法 (InBios 社 Trypanosoma Detect® and/or Chembio 社 CHAGAS STAT-PAK®) による *T. cruzi* 抗体検査を実施した。

## (倫理面への配慮)

中南米滞在歴カテゴリー 1 の献血者に対するシャーガス病の感染リスク調査については、本調査研究の説明書及び同意書を渡し、インフォームドコンセントが得られ同意書に署名した成人を対象とした。*T. cruzi* 抗体検査結果を通知し、抗体陽性者に相談医療機関を紹介するなど健康管理に活かすこととしたので、調査対象者に不利益はない。本調査に関して、別途個人情報管理者を指名し個人情報を適切に管理することとした。本調査研究は、日本赤十字社血液事業研究倫理審査委員会において承認された。(研究倫理審査番号 2010-006)

## C. 研究結果

### 1. WNV-NAT

#### 1) 感度試験

TaqMan PCR 法 (表 1)

各測定濃度で 24 重測定を実施した結果、95% 検出感度 (PROBIT 分析) は WNV-USA で 11.0cps/mL、WNV-ITA で 33.4cps/mL であった。

また、検出感度のばらつきは、WNV-USA では低濃度域でばらつきがみられたが、WNV-ITA の方は濃度による差はみられなかった。(図 2)

TMA 法 (表 2)

と同様に、各測定濃度で 24 重測定を実施した結果、95% 検出感度 (PROBIT 分析) は WNV-USA で 1.2cps/mL、WNV-ITA で 13.3cps/mL であった。また、検出感度のばらつ

きは、WNV-USA、WNV-ITA 共に 1cps/mL 以下の濃度でばらつきがみられた。(図3)

WNV-USA に関しては 0.5cps/mL でも陽性率が 62.5%となったため、追加で両法の低濃度域の検討を行った。TaqMan PCR 法は 0.5cps/mL 以下の濃度では陽性率が極端に下がるのに対し、TMA 法は 0.05cps/mL の濃度まで陽性率が 25%を上回り、95%検出感度で 10 倍の差が出た。(表3)

なお、両者の感度は、各社の参考資料によると TMA 法 8.2copies /mL (95%検出感度)、TaqMan PCR 法で 23.0copies /mL(95%検出感度)である。

## 2) 特異性試験 (実検体による試験)

TaqMan PCR 法で、80 検体を用い 2 回 WNV-NAT を実施した結果、8 本が Invalid となったが、他の 152 本は全て陰性で、陽性及び偽陽性は検出されなかった。

Invalid となった 8 本のうち 4 本は機器エラーによるもので、残りの 4 本はそのエラーに付随して発生した消耗品のハンドリングエラーであり、検体由来のものではなかった。

20 プールした献血者検体それぞれ 240 本について、NAT を実施したが、TaqMan PCR 法及び TMA 法共に全て陰性で、陽性又は偽陽性は検出されなかった。

## 3) 実検体を用いた検査シミュレーション

(図4)

両法の検査結果確定までの時間を、現行の MPX 検査における検査対象検体数 5300 本 ~ 5600 本の平均所要時間 9 時間 20 分と比較した。

### TaqMan PCR 法

WNV 対象検体のプール検体作製後 TaqMan PCR 法で MPX 検査を行い、検体のサンプリングが終了後 TaqMan PCR 法で WNV-NAT を実施した。WNV-NAT 対象以外の NAT 対象検体は WNV-NAT 対象検体のプール作業終了後、順次プール検体を作製し、MPX 検査を行った。

WNV 対象検体のプール検体作製からすべての検査結果確定までの所要時間は 9 時間 32 分

あり、通常の MPX 検査と比べ若干の遅延であった。

### TMA 法

WNV-NAT 対象検体のプール検体作製後 eSAS による TMA 法で WNV 検査をし、検体のサンプリングが終了後 TaqMan PCR 法で MPX 検査を実施、WNV 検査対象以外の NAT 対象検体は WNV 対象検体のプール作業終了後、順次プール検体を作製し、MPX 検査を実施した。

WNV 対象検体のプール検体作製からすべての検査結果確定までの所要時間は 10 時間 3 分となり、通常の MPX 検査より 40 分程度の遅延となった。

## 2. シャーガス病の感染リスク

1) 中南米滞在歴等を有する受付者数及び献血者数 (図5)

平成 24 年 10 月 15 日 ~ 平成 25 年 10 月 14 日の 1 年間の中南米滞在歴等を有する受付者数は全国で 10,973 人、献血者数は 9,392 人であった。中南米滞在歴等を有する献血者数のカテゴリー別の内訳は、「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」カテゴリー1 は 2,149 人 (23%)、「母親が中南米諸国で生まれた、又は育った」カテゴリー2 が 301 人 (3%)、「カテゴリー1 以外で、通算 4 週間以上中南米諸国に滞在した」カテゴリー3 が 6,935 人 (74%)、分類不明 7 人であった。

都道府県別の献血者数では、東京都の 1,925 人が最も多く、次いで神奈川県 1,021 人、愛知県 584 人と続いた。カテゴリー1 の献血者数では、愛知県の 345 人が最も多く、東京都 280 人、静岡県 208 人、神奈川県 151 人、埼玉県 132 人の順であった。中南米滞在歴等を有する献血者数の全体の献血者数に対する割合は、沖縄県が 0.38% と最も高く、東京都、神奈川県、静岡県及び三重県が 0.36%、滋賀県が 0.34% と続いた。全国平均 0.19% であった。東海 4 県の中南米滞在歴等を有する献血者数のうちカテゴリー1 の構成比は、岐阜県 37%、静岡県 47%、愛知県 59%、三重県 35% であり、全国平均の 23% に

比べ高かった。

## 2) 東海4県におけるパイロットスタディ

平成25年1月8日から東海4県における同意を得たカテゴリー1の中南米出身の献血者に対し、*T. cruzi*抗体検査とシャーガス病に関するアンケート調査を実施した。

平成25年1月8日～11月30日で、対象者は457人、男性335人(73%)、女性122人(27%)であり、年齢別では、10代29人、20代121人、30代154人、40代104人、50代42人、60代7人で、平均35.1歳であった。(図6)

国籍別では、ブラジル380人と最も多く、ペルー27人、アルゼンチン、ボリビア、コロンビアが各4人、チリ2人、エクアドル、パラグアイ、ホンジュラス、メキシコが各1人、日本20人、不明12人であった。出身国別では、ブラジルが401人、88%を占め、次いでペルーが32人(7%)であった。(図6)ブラジル国籍380人の出身州は、サンパウロ州251人(66%)、パラナ州54人(14%)と多く、その外12州に及んだ。(図7)対象者の日本滞在年数は平均15.3年(5ヶ月～43年)であった。献血回数は、初回献血者が42%、2回目が18%であった。(図6)

シャーガス病に関する7項目のアンケート調査(図8)については、1.幼少時の家の構造は、合計509件(複数回答あり)のうちコンクリートが56%と最も多く、次いでレンガが28%、木造9%で、サシガメが息息する可能性があると考えられる土壁は13件3%であった。2.サシガメを知っていると答えた者は56%、3.刺された経験のある者は1人(*T. cruzi*抗体陰性)。4.シャーガス病を知っていると答えた者は65%、5.シャーガス病の検査経験がある者は59人(13%)で、その検査結果が陽性であった者はいなかった。6.家族にシャーガス病と診断された人がいる者は、7人(1.5%)で全員ブラジル人であった。その家族内訳は、母2、兄弟姉妹2、祖父、いとこ、その他であった。7.心疾患、消化器疾患を指摘されたことがある者は5人であったが、シャーガス病との関連性は認められな

かった。

パイロットスタディ対象の457検体のうち、1検体が*T. cruzi*抗体陽性であった。また、1検体はイムノクロマト法STAT-PAK®の偽陽性で、残る455本は全て陰性であった。この*T. cruzi*抗体陽性の献血者は40代男性、日本滞在13年のボリビア人で、今回が初回の献血であった。アンケート調査への回答は、サシガメやシャーガス病は知っているとの回答だったが、その外シャーガス病のリスクを想起させる回答はなかった。

なお、パイロットスタディとは別に、並行して実施している東海4県におけるカテゴリー2・3の疫学調査(同一期間335件)から陽性者は認められていない。

## D. 考察

### 1. WNV-NAT

今回実施した2種のWNV国際標準品の候補WNV液を用いたTaqMan PCR法及びTMA法の感度は、TMA法の方が高く安定した結果が得られたが、両法とも、ロシュ社、ノバルティス社両社が示している感度とほぼ同等であり、TaqMan PCR法も十分な結果が得られたと考える。

国内感染発生時のWNV-NATを加えたNATスクリーニングの検査所要時間は、WNV対象NAT検体が先行して検査できる場合は、通常検査に比べ40分程度の延長で対応できる事が確認できた。しかし、WNV-NATの先行検査ができない場合は、別途対応する必要がある。また、eSASによるTMA法は実施施設が現在2施設に限定されており、用手法であるため手技の熟練を要することから、完全自動化による検査体制を構築する必要があると考える。

### 2. シャーガス病の感染リスク

平成24年10月15日からのシャーガス病の安全対策により、献血受付時に中南米滞在歴等の確認を行い、確認票により該当者情報を血液事業統一コンピュータシステムに入力すること

になったことから、中南米滞在歴等を有する受付者数・献血者数が正確に把握できるようになった。1年間の集計値は、受付者数は約11,000人、献血者数は約9,400人である。このうち、約3/4は「中南米諸国に通算4週間以上滞在した」人でほとんどが日本人と考えられる。「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」人は約1/4、3-4%の人は「母親が、中南米諸国で生まれた、又は育った」人であった。「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者は約2,100人であり、都道府県別の分布では関東地方、東海地方に多く、地域的な偏在が認められた。東海4県では、中南米出身者である献血者の割合が高かった。

東海4県のパイロットスタディのアンケート調査により、「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者の背景は、男性が73%、女性が27%と男性が多く、平均年齢35.1歳、67%が40歳未満の若い世代であり、献血回数は42%が初回献血であった。大多数の88%がブラジル出身であり、日本滞在年数は平均15年であることが明らかとなった。

また、幼少時の家の構造が土壁と回答した件数が3%、家族にシャーガス病と診断された者が1.5%と、シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。

東海4県の中南米出身献血者(カテゴリー1)の対象457名中 *T. cruzi* 抗体陽性者は1名のみであったこと、全国で中南米出身献血者(カテゴリー1)は2,149人/年であったこと、東海4県の他のカテゴリー(2・3)での疫学調査から陽性者は認められていないことから、全国で1年間に *T. cruzi* 抗体陽性となる献血者は5人以下と推計された。

一方、中南米滞在歴等を有する献血者の約3/4を占め、ほとんど日本人と考えられるカテゴリー3「中南米諸国に通算4週間以上滞在した」の滞在期間等の基準については、今後の調査、検討により見直しが必要であると考えられる。

## E．結論

## 1．WNV-NAT

TMA法のWNV-NAT試薬(Procleix® WNV Assay)とTaqMan PCR法のWNV-NAT試薬(TaqScreen® WNV assay)の感度試験を実施し、TMA法試薬の方が、TaqMan PCR法試薬と比べ高く安定した結果が得られたが、両者とも各社が示している感度とほぼ同等であり、十分な結果が得られた。国内感染発生時のWNV-NATを加えたNATスクリーニングの検査所要時間をシミュレートしたところ、WNV対象NAT検体が先行して検査できる場合は、通常検査に比べ40分程度の延長で対応できる事が確認できた。

## 2．シャーガス病の感染リスク

本研究の対象である東海4県の中南米出身献血者の中から1名の *T. cruzi* 抗体陽性者が認められた。中南米滞在歴等を有する献血者数から推計すると、全国で *T. cruzi* 抗体陽性となる献血者は5人以下/年と考えられた。

献血時のシャーガス病の安全対策を講じている日本では、輸血を介したシャーガス病の感染リスクはきわめて低いと考えられる。

## <謝辞>

今回のWNV-NATの研究にWNV液を分与いただいたイタリア National Center for Immunobiologicals Research and Evaluation (CRIVIB) の Dr. Giulio Pisani と米国 CBER/FDA の Dr. Maria Rios に深謝いたします。

## 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) 古澤秀明、森安浩之、後藤康仁、増田久美

子、馬場明美、沖 学、山中烈次、平力造、  
百瀬俊也、河敬世：我が国におけるウエスト  
ナイルウイルス（WNV）感染発生時の  
献血血液の検査、第 37 回日本血液事業学  
会総会、札幌、2013 年

- 2 ) S. Momose, Y. Furui, M. Ishinoda,  
T. Takahashi, S. Igarashi, Y. Sayama,  
S. Miura, C. Matsumoto, S. Uchida,  
S. Hino, A. Onitsuka, T. Minamizawa,  
M. Hamaguchi, M. Okada,  
J. Takamatsu, M. Satake, M. Minami,  
K. Tadokoro : ANTI-*TRYPANOSOMA*  
*CRUZI* TEST AND QUESTIONNAIRE  
SURVEY IN JAPAN FOR BLOOD  
DONORS NATIVE OF LATIN  
AMERICA、24<sup>th</sup> Regional Congress of  
the ISBT、Kuala Lumpur、2013

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発

研究者分担 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：**赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* によるバベシア症は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立している一方、人獣共通感染症としても重要であり、アメリカ北東部では地方病として知られている。近年、本症の世界的な感染拡大が報告されており、日本でも、1999年に神戸で輸血により本邦初の人感染例が発生した。そこで、本研究では“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的とした。平成25年度は、23年度および24年度にマウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法（ICT）について、人血液試料を用いてその有用性を確認することを目的とした。LAMP については神戸医療大学から提供を受けた111検体の人血液より DNA を抽出して検討を行った。その結果、抗体陽性を示した61検体中、LAMP で陽性を示した検体は5検体のみで、非常に検出率が低かった。また、IFAT で陰性を示した50検体中、LAMP で陽性を示した検体が1例認められた。ICT については、アメリカエール大学より人血清の提供を受けて実施予定であった。しかしながら、ヒト試料の使用について、エール大学並びに帯広畜産大学の倫理委員会の承認を得るのに時間を要し、最近エール大学より60検体の人血清を入手したところである。現在、これらの血清を用いて、検討中である。

### 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が、感染ダニによる刺咬やキャリアーからの輸血により人にも感染し、人獣共通感染症として重要視されている。ヒトバベシア症は、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。最近、米国での感染拡大に加えて、中国、メキシコ、台湾、エジプト、南アフリカなど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、血液製剤の安全性確保や更なる人への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、“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的としている。25年度は、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法である ICT について、人血液試料を用いてその有用性を確認することを目的とした。

### B. 研究方法

#### （1）ヒト血液試料

神戸医療大学薬学部斎藤あつ子教授より111検体のヒト血液の提供を受けた。これらの試料は、インフォームドコンセントを実行して得られて採血されている。111検体中、IFA により61検体が抗体陽性、50例が抗体陰性であることが確認されている。これらの血液 25 $\mu$ m を用いて市販の DNA 抽出キットにより DNA を精製した。

また、エール大学より、60検体の人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いる。

#### （2）LAMP の実施

*B. microti* の18s ribosomal DNA (rDNA) 遺伝子情報を基に設計したLAMP用のプライマー4種類（F1P、B1P、F3、及びB3）を用いて、63度で90分の反応条件で増幅を行った。本LAMP法は、マウス感染モデル系で特異性及び感度が高いことが確認されている。さらに、日本で最初に輸血により感染が認められた患者並びに献血者のDNAを用いた実験で遺伝



子の増幅が確認されている。

### (3) イムノクロマトストリップの作製

組換え BMN1-17 蛋白質の濃度が 200mg/ml、pH 5.0 の条件で金コロイド標識を標識し、ICT ストリップを作製した。ハムスターを用いた感染実験により、特異性ならびに IFAT と同等の感度を有していることが確認されている。また、輸血による *B. microti* 感染が日本で初めて確認されたヒト患者および献血者で、抗体が確認されている。

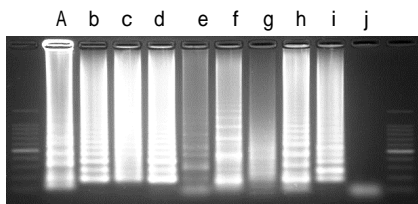
### (倫理面への配慮)

人の血液材料用いた実験については、帯広畜産大学、神戸医療大学、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) ヒト DNA を用いた LAMP の検討

111 検体の人血液より得られた DNA を用いて LAMP を実施した。その結果、IFA で抗体陽性を示した 61 検体中、LAMP で陽性を示した検体は 5 検体のみであった。また、抗体陰性が確認されている 50 検体中 1 例で LAMP 陽性反応が確認された。また、*B. microti* の神戸株、ミュンヘン株、グレイ株の DNA でも遺伝子の増幅が認められた(下図)。



a: 神戸株、b: ミュンヘン株、c: グレイ株、  
d: IFA 陽性、e: IFA 陽性、f: IFA 陽性、  
g: IFA 陽性、h: IFA 陽性、i: IFA 陰性、j: 蒸留水

### (2) ヒト DNA を用いた ICT の検討

24 年度に、ハムスター感染モデルで ICT による抗体検出の有用性が確認された。そこで、本年度は流行地でのヒト血清を用いて検討すべく、エール大学公衆衛生学部の P. Krause 博士にヒト血清の提供依頼を行ったところ、快く承諾を戴くことができた。しかしながら、帯広畜産大学ならびにエール大学

の倫理委員会の承認を得るのに、予想よりも長い時間を要した。その後 MTA を締結し、1 月下旬に 60 検体を入手したところである。今後、提供された 60 検体を用いて、早急に行う予定である。

## D. 考察

*B. microti* 18s rDNA 遺伝子を標的とした LAMP 法は、マウス感染モデルにおいて、高い特異性と感度と示した。また、ヒト感染血液および献血者においても、LAMP 法により標的遺伝子が増幅されている。そこで、今回 100 例以上のヒト DNA サンプルを用いて、LAMP 法を実施した。しかしながら、61 例の抗体陽性者の DNA サンプルを用いた LAMP 法で、5 例より陽性反応が認められなかった。これは、採血された人はほとんど無症状であり、血液中の原虫数が極めて少ないと考えられる。そのため、少数の原虫により抗体産生系は刺激され、血清中に全血清中に抗体は認められるが、DNA 調整に使用された 25 $\mu$ m 中に原虫が含まれていなかったと推察される。

今回、3 株の *B. microti* から抽出された DNA を陽性対照として用いたところ、すべての DNA で遺伝子増幅が認められた。神戸株、ミュンヘン株、グレイ株はそれぞれ日本、ドイツ、アメリカと地理的に非常に隔だっているにも関わらず遺伝子増幅が認められたことは、本プライマーセットを用いた LAMP 法が世界的に使用可能であることを示唆している。

また、アメリカの流行地で採取された人血清を用いて、ICT の有用性の検討は残念ながら今回期限内に実施できなかった。しかしながら、ICT の作製に使用された BMN17 は、世界的に非常に良く保存されている原虫蛋白質である。組換え蛋白質をコードしている BMN17 の遺伝子情報は、ミュンヘン株から得られたものである。この遺伝子情報に基づいて作製され組換え蛋白質を用いた ICT により、地理的および遺伝的に遠い神戸の人血清で抗体を検出できたことから、本 ICT の汎用性は高いと考えられる。

## E. 結論

本研究では、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法である ICT について、人血液試

料を用いてその有用性を確認することを目的とした。残念ながら、人試料を用いた検討では、マウスモデルで得られた高い感度が認められなかった。しかし、本研究で開発された、LAMP と ICT は国際的に使用可能な可能性を有しており、今後その実用化に向けて、更に検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Iseki H., Alhassan A., Kim C., Saito-Ito A., Inokuma H., Kawazu S., Masuzawa T., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Babesia microti* Infection. (準備中)
2. Iseki H., Kim C., Saito-Ito A., Minoda Y., Inokuma H., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of an immunochromatographic test for convenient serodiagnosis of human babesiosis. (準備中).

##### 2) 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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)  
分担研究報告書

献血制限に関わる昆虫学的研究：個体識別マーキング法を用いた  
ヒトスジシマカの移動分散に関する基礎研究

研究分担者 津田良夫 国立感染症研究所(昆虫医科学部 室長)

蚊の胸部背面の 5ヶ所に塗料を塗って個体を識別するマーキング法を考案し、2013年3月18日から27日の期間、石垣島の住宅街でヒトスジシマカとオオクロヤブカの移動分散に関する実験を行った。調査地の広さは230m×250mで、調査地内には緑地、人家、商店、ビルが存在し、ヒトスジシマカの生息場所が点在していた。個体識別マーキングは初めの7日間行い、合計232頭のヒトスジシマカと216頭のオオクロヤブカをマークして、4ヶ所から放逐した。ヒトスジシマカの再捕獲率は0.21(48/232)で、オオクロヤブカの0.09(20/216)よりも有意に高かった。またヒトスジシマカの再捕獲率を放逐場所間で比較したところ有意に異なっていた。放逐された蚊の動きを分析した結果、大きな緑地の内部はヒトスジシマカとオオクロヤブカの潜伏や吸血動物の探索に好適であり、雌成虫が周囲の生息場所から集まってくることを示唆された。

#### A.研究目的

ヒトスジシマカが一生の間に動き回る範囲は、この蚊によって媒介される病気が流行した際にその拡大速度や拡大範囲を知る上で最も基本的かつ重要な情報である。疾病媒介蚊の分散範囲を推定するためには、マークを付けた蚊を放逐してその後の分散過程を追跡するマーキング法が一般的に用いられてきた。ヒトスジシマカ成虫の分布に関してこれまで行われた研究では、成虫の分散行動が住宅街周辺の並木や住宅の庭木、公園や緑地などの植生と密接に関係していることが示されている。そのため、成虫の移動分散は一方向的に起こるのではなく、潜伏に適した茂みの間を転々と行き来するような短距離の動きを繰り返して起こ

っていると考えられる。このような動きの研究には、個体識別マーキングによって、同一個体の動きを追跡する手法が最も有効であるとされている。しかしながら、個体識別のためのマーキングを蚊に対して適用することは技術的に難しく、研究例は非常に少ない。

そこで、本研究ではヒトスジシマカの個体識別マーキング法を考案し、石垣島の住宅街で実際に生息しているヒトスジシマカにマークを施し、その動きについて分析を行った。

#### B.研究方法

個体識別マーキング法：成虫をクロロフォルムで軽く麻酔した。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，5ヶ所に塗料でマークを付けた（図1）．マークのために用いたペンは有頭の昆虫針で，竹串の柄をつけてごく少量の塗料を点刻するようにマークした．塗料には，修正液として市販されている水溶性ミスノンを適当な濃度に希釈して用いた．また，3種類の食品用色素（赤，青，黄色）を少量混ぜて，3種類の異なる塗料を作った．合計4色の塗料と5ヶ所のマーク箇所の組み合わせによって， $5^5 - 1 = 3124$  個体を区別できる．

野外調査：調査期間は2013年3月17日から3月27日の期間で，調査地としては石垣島の住宅街を選んだ．住宅や商店，公共のビル，2つの緑地がある約230m×250mの区画を設定し，その中に4ヶ所の採集場所を選んだ（図2）．採集場所Aは，調査のために滞在した民宿の庭先である．採集場所BとCは民宿の東にある大きな緑地で，Bは緑地の入り口付近，Cは緑地の奥に位置している．採集場所Dは大きな緑地から南東に約92m離れた小規模の緑地の入口である．

蚊の採集は毎日8:00と14:00の2回行った．各採集場所に採集者一人が10分間とどまり，吸血のために飛来する蚊を吸虫管で採集した．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．カップから蚊を1個体ずつ吸虫管で取り出し，マークの有無をチェックした．マーク虫はマークを確認，採集された場所を記録して紙コップに戻し，その日のうちに採集された場所から放した．無マーク虫には識別マークをつけて，その日のうちに採集された場所から放逐した．マーキングは初めの7日間継続

して行い，その後の3日間は捕獲だけを行った．

### C. 研究結果

調査期間中にヒトスジシマカ309個体とオオクロヤブカ300個体が採集された（表1）．オオクロヤブカの密度が予想外に高く，また，この種類に関するマーキング実験はこれまでに報告がないため，オオクロヤブカにもマークを行うことにした．個体識別マークを行って放逐した個体数は，ヒトスジシマカが232個体，オオクロヤブカは216個体であった．このうち再捕獲されたのはヒトスジシマカが48個体で，再捕獲率は0.21（48/232）であった．これに対して，オオクロヤブカの再捕獲率は0.09（20/216）で，ヒトスジシマカよりも有意に低い値だった．

採集場所ごとに再捕獲率を求めて表2に示した．ヒトスジシマカの場合，採集場所Bの再捕獲率は0.4で，ほかの採集場所の再捕獲率よりも有意に高かった．オオクロヤブカの場合は，採集場所による再捕獲率の違いは有意ではなかった．

4ヶ所の採集場所間のヒトスジシマカの動きを表3aにまとめて示した．同一行に示された値は，例えば採集場所Aの場合，採集場所Aから放逐された個体のうち32,3,0個体が採集場所A,B,C,Dで再捕獲されたことを示している．つまり，採集場所Aで放逐された8個体のうち同じ場所Aで再捕獲された個体は3個体（37%）である．採集場所BとDの場合も採集場所Aと同様に，放逐された場所に留まりそこで再捕獲された個体の割合は低く，それぞれ30,25%であった．これに対して採集場所Cでは，放逐された26個体のうち放逐場所に留

まりその場所で再捕獲された個体の割合は88%と非常に高かった。

表3aの同一欄に示された値は、採集場所Aを例にすれば、採集場所Aで再捕獲された3,0,1,1個体がそれぞれ、採集場所A,B,C,Dから放逐された個体であったことを示している。この結果は、採集場所C,Dから採集場所Aへ移動してきた個体がいたことを示しているが、その頻度は低かったことを意味している。採集場所BとDへ移動してきた個体の数は表の第2,4欄に示されているように少なく1あるいは2個体に過ぎなかった。これに対して、採集場所Cは本研究で再捕獲された48個体のうち35個体が再捕獲された場所であり、このうち34%に相当する12個体は他の場所からCへ移動してきたことがわかった。特に、表2で放逐された個体の再捕獲率が最も高かった採集場所Bの場合、この場所から放逐された10個体のうち7個体は採集場所Cで再捕獲されていたことがわかった。

4ヶ所の採集場所間のオオクロヤブカの動きを表3bにまとめて示した。放逐されたオオクロヤブカが再捕獲された場所は1ヶ所に集中しており、再捕獲された20個体のうち90%に相当する18個体が、採集場所Cで捕獲されていた。

#### D.考察

本研究の採集場所の中では、採集場所Cから放逐された個体がそのままとどまる可能性が高く、また、周辺の場所からCへ移入してくる個体も多いことがわかった。特にヒトスジシマカの場合、採集場所BからCへは方向性を持って移動している個体が

多いことが示唆される。これらの結果は、採集場所Cの周辺がヒトスジシマカやオオクロヤブカの潜伏や吸血飛来に適した場所であることを意味している。多くの住宅街には大小の茂みや緑地が存在することから、採集場所Cのように潜伏や吸血飛来に適した場所がどのように分布しており、それがヒトスジシマカの移動にどのように影響しているかを今後の研究で明らかにする必要がある。

#### E.結論

本研究で検討した個体識別マーキングの手法は、住宅街におけるヒトスジシマカやオオクロヤブカの動きに関する分析的研究に有用であることがわかった。

#### F.健康危険情報

なし

#### G.研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

津田良夫 .ヤブカの個体識別マーキング法の検討:石垣島におけるヒトスジシマカとオオクロヤブカを用いた実験.第65回日本衛生動物学会東日本支部大会、2013年10月25日、川口市。

#### H.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

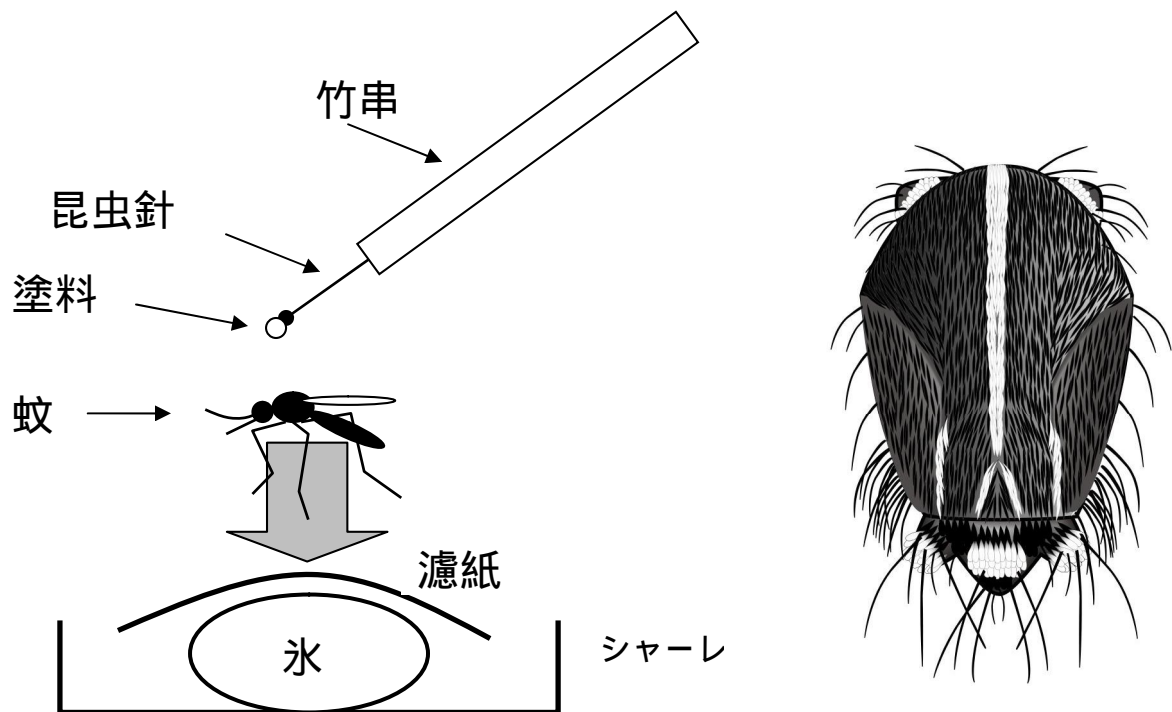


図 1 . 個体識別マークの方法 . 氷の塊によって冷やし湿らせた濾紙の上に麻醉した成虫を乗せる (左図) . 昆虫針を使ってヒトスジシマカの胸部 5 ヶ所に塗料を付ける (右図) .

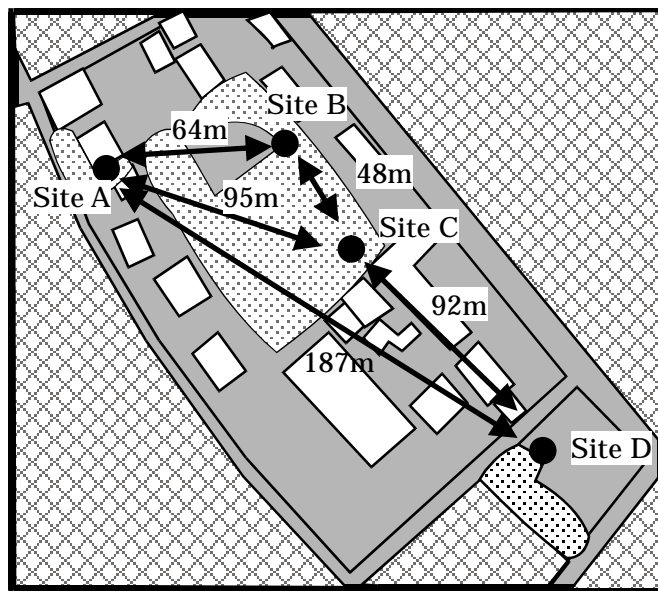


図 2 . 石垣島の住宅街に設定した調査地の略図 . 4 つの採集場所 (A ~ D) の位置と互いの直線距離を示す .

表 1 . 2013 年 3 月 17 日から 27 日に石垣島の調査地で採集された個体数、マーク放逐数，再捕獲数の記録 .

日 付	ヒトスジシマカ			オオクロヤブカ		
	採集数	放逐数	再捕獲数	採集数	放逐数	再捕獲数
18 Mar 2013	17	17		19	19	
19 Mar	43	43	1	32	32	0
20 Mar	68	68	9	34	34	3
21 Mar	22	22	6	27	27	2
22 Mar	39	39	8	56	56	5
23 Mar	23	23	8	23	23	2
24 Mar	20	20	9	25	25	3
25 Mar	6	0	1	2	0	0
26 Mar	32	0	2	45	0	3
27 Mar	39	0	4	37	0	2
Total	309	232	48	300	216	20

表 2 .マーク放逐されたヒトスジシマカとオオクロヤブカの放逐場所による再捕獲率の違い

採集場所	ヒトスジシマカ			オオクロヤブカ		
	再捕獲数	放逐数	再捕獲率	再捕獲数	放逐数	再捕獲率
Site A	8	54	0.15	0	15	0
Site B	10	25	0.40	2	33	0.06
Site C	26	125	0.21	16	129	0.12
Site D	4	28	0.14	2	40	0.05
Total	48	232	0.21	20	216	0.09

表 3 . 4 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動き

(a) ヒトスジシマカ

放逐場所	再捕獲場所				合 計
	Site A	Site B	Site C	Site D	
Site A	3	2	3	0	8
Site B	0	3	7	0	10
Site C	1	1	23	1	26
Site D	1	0	2	1	4
合 計	5	6	35	2	48

(b) オオクロヤブカ

放逐場所	再捕獲場所				合 計
	Site A	Site B	Site C	Site D	
Site A	0	0	0	0	0
Site B	0	1	1	0	2
Site C	0	1	15	0	16
Site D	0	0	2	0	2
合 計	0	2	18	0	20



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)  
分担研究報告書

高感度ウイルスゲノム検出法の検討  
およびウエストナイルウイルス NS1 検出系開発のための基盤的研究

研究分担者 田島茂(国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官)

これまでに、PCR プライマーの 5'末端に 12 塩基からなる Flap 配列を付加することにより増幅感度あるいは増幅量が改善されるとの報告がある。昨年度我々はデングウイルス検出用プライマーに Flap を連結したが改善効果は見られなかった。そこで今回 Flap を 2 種類のフラビウイルス共通プライマーセットと 1 種類のアルファウイルス共通プライマーに付加し、その効果を検討した。NS3 領域に対応するフラビウイルス共通プライマーの場合、使用した 3 種類のウイルス(デング 1 型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ヨコセウイルス)のすべてで増幅感度および増幅量が向上した。一方 NS5 領域に対応するプライマーではウイルス種によって結果が分かれた。4 種のアルファウイルス(チクングニヤウイルス、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、ゲタウイルス)について、Flap を付加したアルファウイルス共通プライマーを試したところ、いずれのウイルスに対しても Flap は効果的であったが、チクングニヤウイルスでの効果は弱かった。また Flap 付加アルファウイルス共通プライマーを使用して、本来日本脳炎ウイルスとして分離・増幅されたウイルス溶液からゲタウイルスゲノムを増幅した。国内で分離されたゲタウイルスに関する情報は非常に少ないことから、我々の解析結果は非常に貴重な情報を提供するものと思われる(論文投稿中)。

デングウイルス NS1 は患者血清中に大量に分泌されることから、本蛋白質を検出するキットが販売され、診断現場で活躍している。我々はウエストナイルウイルス NS1 検出系開発をめざし、抗 NS1 モノクローナル抗体を作製するための抗原の調製を行った。

#### A. 研究目的

(1) 節足動物媒介性ウイルスによる感染症は熱帯地方に限らず、世界中の様々な国・地域で毎年多数の患者を発生させている。またこれらの中には、突然流行が発生するものも少なくなく、我々が標的にしているフラビウイルス、アルファウイルスについ

ても同様である。これらの中には患者の症状は類似しているものの原因ウイルスが異なるため、ウイルス特異的な検出方法では見落としてしまう危険性がある。そのような危険性を回避するためには、フラビウイルスゲノムあるいはアルファウイルスゲノムを、ウイルス種を問わずに増幅可能なプ

ライマーが有効である。一方、PCR プライマーの 5'末端側に 12 塩基から成る AT リッチな配列(Flap)を付加することにより、PCR の増幅感度および増幅量が向上するとの報告が 2007 年になされた (Afonina, I. et al., *Biotechniques* 43: 770-774, 2007)。この情報を基に昨年度我々は本配列をデングウイルス検出用プライマーに付加し、その有効性を調べたが、付加することによる改善効果は見られなかった。そこで本年度はすでに報告されている 2 組 (NS1 領域および NS5 領域) のフラビウイルス共通プライマーと 1 組 (nsP1 領域) のアルファウイルス共通プライマーの 5'末端に Flap を付加し、複数のウイルス種のゲノム増幅における本配列の効果を複数のウイルスを用いて調べた。

(2) 以前より我々はブタ血清からの日本脳炎ウイルスの分離を行っている。そのうち、2005 年にブタ血清から分離され Vero 細胞で継代を続けた 1 株が、日本脳炎ウイルスとは明らかに異なる、むしろアルファウイルスに類似したプラークを形成した。そこで前述した Flap 付加アルファウイルス共通プライマーを使用し、アルファウイルスゲノムの存否を調べた。さらに得られた増幅産物の遺伝子解析を行った。

(3) デングウイルス感染症では、ウイルス側の非構造蛋白質の一つである NS1 が急性期の患者血中に大量に存在することから、NS1 を検出する診断キットが複数のメーカーから販売され、今では非常に有効な診断ツールとしてその有用性が確立している。一般にフラビウイルスは哺乳動物細胞に感染すると感染細胞から NS1 を分泌することが知られているが、診断ツールとしては、ウイルス血症レベルが高い症状でないと血

中 NS1 の検出は困難と思われる。一方、ウエストナイル熱ではウイルス血症が観察されるため、NS1 の検出は可能と推測される。実際 2008 年にそのことを示す報告もある (Chung and Diamond, 2008)。そこで今回我々は、ウエストナイルウイルス NS1 検出系の開発を目指し、ウエストナイルウイルス NS1 を認識するモノクローナル抗体を得るための NS1 抗原の大量調製を行った。

## B. 研究方法

(1) Flap RT-PCR 法は Afonina らの報告を参考にした。具体的にはフラビウイルス共通 NS3 領域プライマー (Briese et al. 1999) および NS5 プライマー (Kuno et al. 1998)、およびアルファウイルス共通プライマー (Pfeffer et al. 1997) の 5'末端側に非ウイルス由来ヌクレオチドを 12 塩基 (5'-AATAAATCATAA-3') 付加した。鋳型にはフラビウイルス代表としてデング 1 型ウイルス(NIID02-20 株)、日本脳炎ウイルス (Mie/41/2002 株) およびヨコセウイルス (Oita-36 株) を、アルファウイルス代表としてチクングニヤウイルス(NRTQ11-01 株)、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、およびゲタウイルス (GETV/Kochi/01/2005 株) を使用した。ウイルスゲノム RNA は Vero 細胞に各ウイルスを感染させた後の培養上清より調製した。また RT-PCR は SYBR Green I を用いた方法によりおこなった。

(2) 結果的にゲタウイルスが検出された Kochi/01/2005 株はもともと分離された日本脳炎ウイルスが増幅されているものとして得られたものである。決定されたゲタウイルス配列は分子系統学的解析に使用した。

比較解析に用いた他のゲタウイルス配列は GenBank データベースよりピックアップしてきた。また一部の配列は論文より直接引用した (Wekesa et al. 2001)。

(3) ウエストナイルウイルス NS1 遺伝子は NY99 株のものを使用した。RT-PCR で NS1 領域を増幅後、タンパク質精製時のタグとなる Flag ペプチドコード配列を連結して哺乳動物細胞発現ベクターである pCAGCS に導入した。こうして得られた NS1 発現プラスミドを 293T 細胞に導入し、72 時間後培養上清を回収した。培養上清を 3xFlag アフィニティーカラムに供し、Flag が結合している NS1 蛋白を精製した。

### C. 研究結果

(1) はじめに、AT リッチな 12 塩基からなる Flap 配列をフラビウイルス共通 NS3 領域プライマーの両方に付加し、デング 1 型ウイルス、日本脳炎ウイルスおよびヨコセウイルスゲノム RNA を鋳型として RT-PCR 反応を行った。3 種類すべてのウイルスにおいて、通常のプライマーを用いた場合に比べ Flap 付加プライマーでの増幅量が上昇した。その傾向はヨコセウイルスで顕著であり、増幅量のみならず検出感度においても大幅な改善がみられた。

次に Flap 配列をフラビウイルス共通 NS5 領域プライマーの両方に付加し同様に検討した。結果はウイルスごとに異なっていた。デング 1 型ウイルスでは Flap により増幅量が増加したものの、日本脳炎ウイルスやヨコセウイルスでは変化なしかむしろ減少傾向であった。次にアルファウイルス共通 nsP1 プライマーに付加したときの効果を 4 種のウイルスを使用して調べた。またこの

際、フォワードプライマーは 2 種類使用した。ゲタウイルス、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルスを用いた場合、長断片増幅用のフォワードプライマーに付加すると増幅量および検出感度が顕著に改善された。一方短断片用では長断片に比べ効果が弱いもしくはほとんど効果はみられなかった。チクングニヤウイルスの場合も長断片用プライマーでのみ効果がみられたが、他の 3 種のアルファウイルスに比べ改善効果が低かった。

(2) 2005 年に高知県のブタ血清から分離された日本脳炎ウイルス遺伝子型 1 型株である Kochi/01/2005 株を Vero 細胞を用いて 4 ~ 5 継代したところ、他の日本脳炎ウイルス 1 型株とは明らかに形態の異なるプラークを形成した。また日本脳炎ウイルス特異的プライマーを用いてウイルスゲノムを増幅したが、プラーク数から算出した感染力価とは異常にかけ離れたコピー数であった。プラークの形態がアルファウイルスのものに類似していたことから、上記のアルファウイルス共通 Flap 付加プライマー等で増幅をこころみたところ、はっきりとした増幅断片が得られた。この断片の塩基配列を決定したところ、ゲタウイルスの Jin-Ju 株と最も高い相同性を示した。これにより本ウイルス溶液にはゲタウイルスが混入していることが明らかとなった (GETV/Kochi/01/2005)。次にゲノム全長の塩基配列を決定し、他のゲタウイルスと比較した。すでに完全長の明らかになっているゲタウイルス 8 株の中では、モンゴルで分離された LEIV17741 株と最も高い相同性を示した。日本で分離されたゲタウイルスの 1 種であるサギヤマウイルスとは異なって

いた。また部分的 nsP1 領域や E2 領域で比べた際にも類似した結果が得られた。GenBank には登録されていないものの、部分的に塩基配列が決定されている株が 7 株（1960 年代 1 株、1970 年代 3 株、1980 年代 3 株）見つかった（Wekesa et al. 2001）。これらの配列も含めて部分的 nsP1 配列の分子系統樹解析を行ったところ、70～80 年代の株と今回の株が比較的近縁であることがわかった。継代過程で、Kochi/01/2005 液に含まれるゲタウイルスと日本脳炎ウイルスがどのように変化してきたかを調べるため、2 継代目から 5 継代目までのウイルス液についてリアルタイム RT-PCR 法でウイルスゲノム数を、プラーク形成法により感染力価を調べた。継代が進むにつれて日本脳炎ウイルスゲノム数が顕著に減少するのに対し、ゲタウイルスゲノム数は増加傾向にあった。また感染力価はゲタウイルスではやはり増加傾向が見られたが、日本脳炎ウイルスは 3 継代目までは測定できたが、それ以降ではプラークが検出されなかった。以上より、Kochi/01/2005 には日本脳炎ウイルスとゲタウイルスの両方が混ざっており、継代により日本脳炎ウイルスが排除される傾向にあることがわかった。また両ウイルスがブタに接種される生ワクチン株とは異なることも確認した。

(3) ウエストナイルウイルス NS1 cDNA と Flag 配列を組み込んだ pCAGCS を 293T 細胞にトランスフェクトし、72 時間後の上清を回収した。上清より 3xFlag アフィニティーカラムにより NS1 を精製した。精製後に抗 Flag 抗体により発現を確認した。現在精製産物を蓄積させており、近いうちにマウスへの免疫ができるよう予定を立てている。

#### D. 考察

(1) 迅速かつ高感度な病原体検出法は、血液製剤の安全性確保と安定供給のために非常に有用である。本年度は昨年に続き、現行の RT-PCR 法をさらに高感度にする可能性のある Flap RT-PCR 法を試みた。昨年はデングウイルス特異的プライマーに適用したが効果が認められなかった。そこで今回は幅広いウイルスを検知可能である共通プライマーに焦点を絞り、Flap 配列の有効性を検討した。フラビウイルス、アルファウイルス合わせて 3 種類のプライマーセットに適用したが、すべてにおいて改善効果が確認された。しかし改善効果は同じ属のウイルスであっても異なる場合もあった。フラビウイルス共通プライマーについては、NS3 領域を標的にしたものでは今回使用した 3 種のフラビウイルスのいずれにおいても改善効果がみられたが、NS5 領域のものでは、1 種では効果的であったが他の 2 種では変化なしかむしろ悪化した。アルファウイルス共通プライマーについてもウイルス種によって効果があるもの、ほとんどないものと分かれた。このように Flap 配列の効果は同じプライマーでも標的のウイルス種によって結果が異なることが明らかとなった。今後今回の共通プライマーを用いる際には、「Flap あり」と「Flap なし」の両方を用いるのが良いかと思う。

(2) 今回の実験で、これまで日本脳炎ウイルス液と認識していた Kochi/01/2005 が、すでに日本脳炎ウイルスはマイノリティーであり、ゲタウイルスがマジョリティーであることが明らかとなった。両ウイルスの遺伝子配列から、これらのウイルスは生ワクチン

に由来するものでなく、各々これまでに報告のない株であることが確認された。よって、ブタ血清より日本脳炎ウイルスを分離する際、そのブタが日本脳炎ウイルスとゲタウイルスに共感染していた可能性が高い。ゲタウイルスは日本脳炎ウイルスと非常に似た感染サイクルを有し、また過去にブタ血清から分離された事例もある。ブタ血清から日本脳炎ウイルスを分離する際、細胞変性効果と遺伝子検出だけで日本脳炎ウイルスと判断するのは危険であることがわかった。今後はプラーク形態や、アルファウイルス共通プライマーによるアルファウイルス存否の確認が必要であろう。

(3) これまでに哺乳動物培養細胞からのウエストナイルウイルス NS1 の発現と分泌を確認し、その培養上清から NS1 を分離精製することが可能であることを示してきた。今後精製した NS1 を用いてモノクローナル抗体の作製、さらには検出系の開発と進めていきたいと考えている。

#### E . 結論

(1) Flap 配列をフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーに連結することにより検出感度および増幅量が改善される例が多く見出された。

(2) 2005 年に高知県のブタ血清から分離された日本脳炎ウイルス溶液にゲタウイルスも存在することが確認された。このウイルスの完全長ゲノムの塩基配列を決定し、分子系統学的解析を行った（論文投稿中）。

(3) ウエストナイルウイルス感染症の診断ツール開発のため、同ウイルスの NS1 の大量調製を行った。

#### F . 健康危険情報

特になし

#### G . 研究発表

##### 論文発表（英文）

1. Tajima, S., Kotaki, A., Yagasaki, K., Taniwaki, T., Moi, M.L., Nakayama, E., Saijo, M., Kurane, I., and Takasaki, T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getahvirs propagated from a single porcine serum sample: a case of coinfection (submitted).

##### 日本語総説

1. 白鳥（田島）茂、高崎智彦。「わが国と世界の日本脳炎の現状と問題点」小児内科予防接種 Q&A 改訂第 3 版 第 45 巻増刊号 432 - 437、2013 .

##### 学会発表

##### 国内学会

1. 田島茂、小滝徹、谷ヶ崎和美、小林大介、谷脇妙、沢辺京子、高崎智彦．Flap 配列を付加したフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーの評価とゲタウイルス検出の実例について．第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、神戸、2013 年 11 月

2. 田島茂、小滝徹、谷ヶ崎和美、林昌宏、西條政幸、高崎智彦．製造株と異なる遺伝子型のウイルスに対する日本脳炎ワクチンの中和能の解析．第 61 回日本ウイルス学会 学術集会、神戸、2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.



Summary  
(Flavivirus-consensus primer sets)

	NS3	Flap-NS3	NS5	Flap-NS5
Dengue type 1 virus	++	+++	++	+++
Japanese encephalitis virus	++	+++	++	+
Yokose virus	±	++	++	++ or +

図3 (表) Flap 配列付加フラビウイルス共通プライマーの検討結果

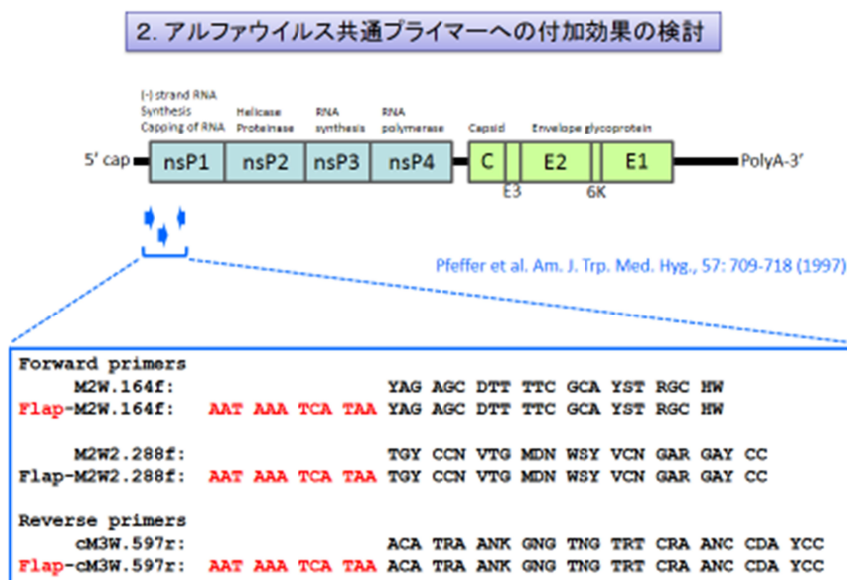


図4 アルファウイルス共通プライマーへの Flap 配列付加



Summary  
(Alphavirus-consensus nsP1 primer set)

	L	Flap-L	C	S	Flap-S
GETV	+	+++	+++	++	++
SINV	+	+++	+++	+	++
VEEV	+	+++	+++	+	++
CHIKV	+	++	++	++	++

Effect of the flap sequence on RT-PCR may depend on the nucleotide sequence of the template RNA

図5 (表) Flap 配列付加アルファウイルス共通プライマーの検討結果

Phylogenetic analysis of getah viruses (1)

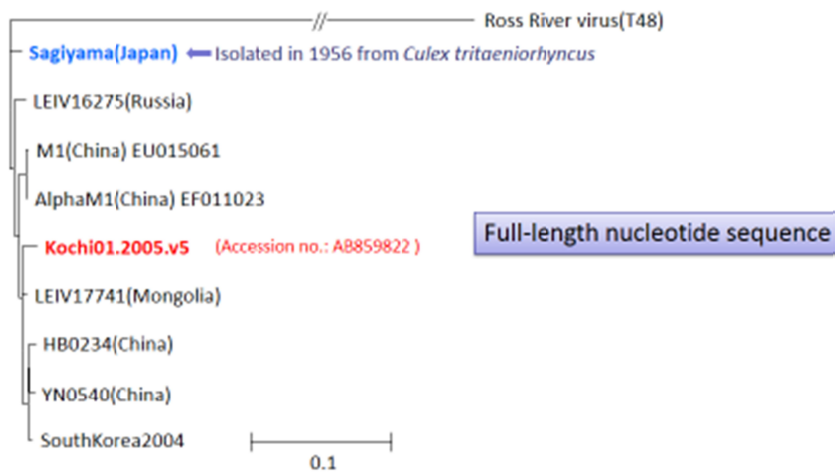
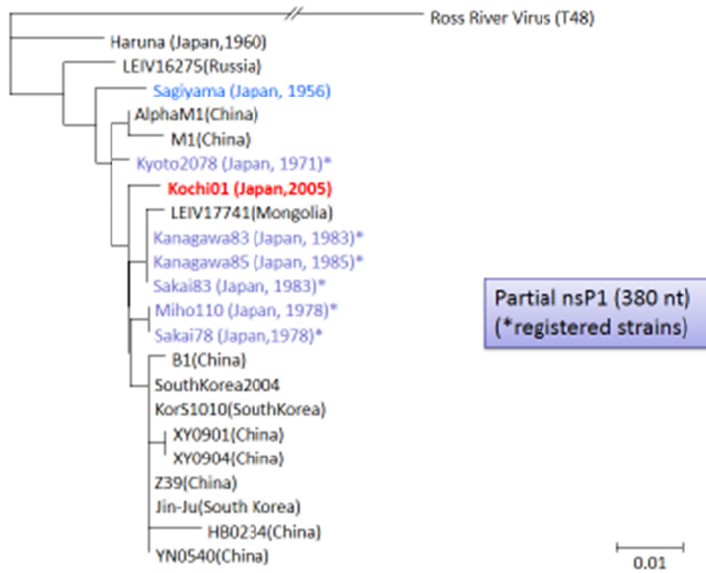


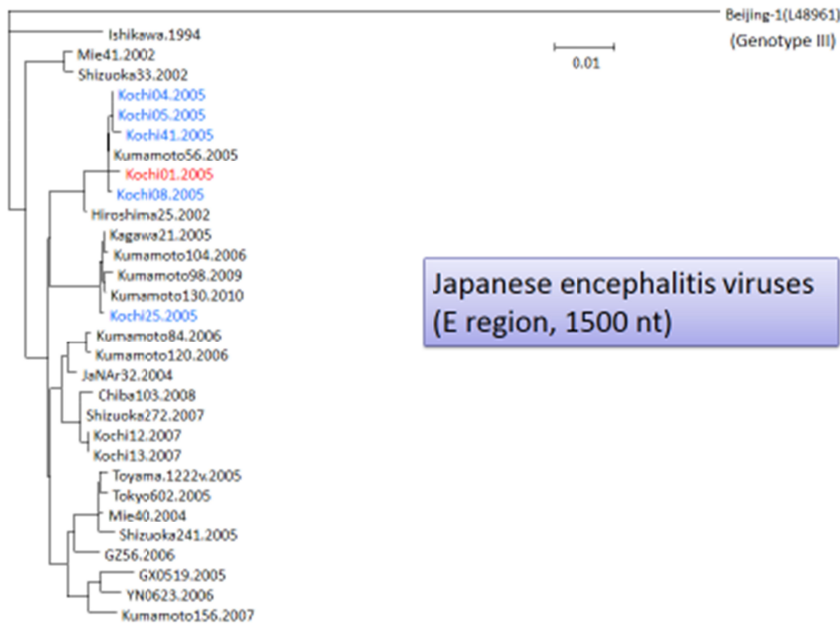
図6 GETV/Kochi/01/2005 の完全長配列を使用した分子系統樹解析

Phylogenetic analyses of getah viruses (4)



\*Wekesa et al., Veterinary Microbiology 83: 137-146 (2001)

図7 GETV/Kochi/01/2005 の部分的 nsP1 配列を使用した分子系統樹解析



No JEV strain with nucleotide sequence identical to JEV/Kochi/01/2005 was found

図8 JEV/Kochi/01/2005 の E 領域配列を使用した分子系統樹解析

The relative amount of viral genome in 2 times- to 5 times-passaged Kochi/01/2005

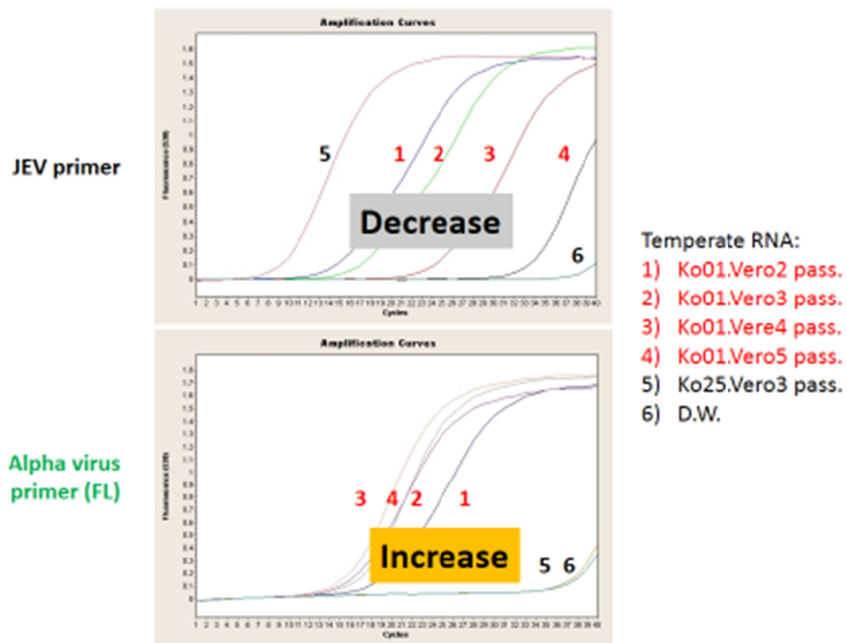


図9 各継代数の Kochi/01/2005 の JEV および GETV ゲノムコピー相対数の変化

ウエストナイルウイルスNS1蛋白質の発現と精製

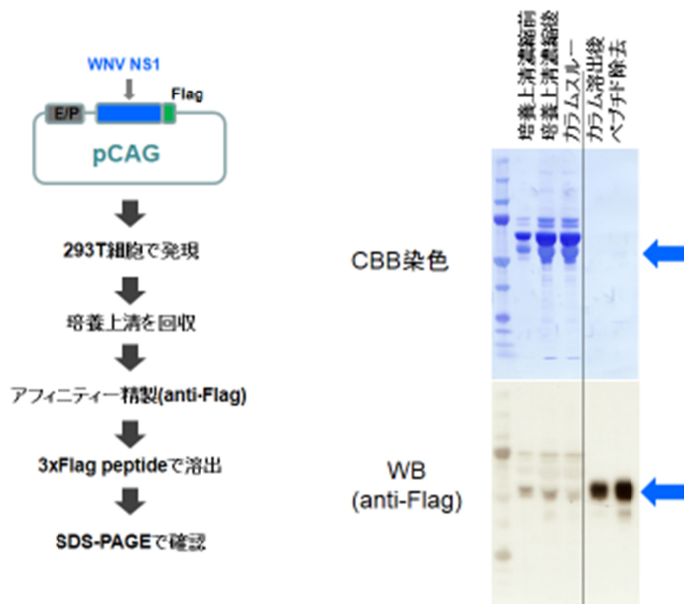


図10 ウエストナイルウイルス NS1 の発現と精製

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Krayukhina E,Uchiyama S,Nojima K,Okada Y,Hamaguchi I, and Fukui K	Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity.	J.Biosci Bioeng	115	104-10	2013
Baylis SA,Blumel J, Mizusawa S,Matsubayashi K,Sakata H,Okada Y,Nubling CM, Hanschmann KM, H EV collaborative Study Group.:	World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA.	Emerg.Infect. Dis.	19(5)	729-735	2013
Imai, K., Maeda, T., Sayama, Y., Mikita, K., Fujikura, Y., Misawa, K., Nagumo, M., Iwata, O., Ono, T., Kurane, I., Miyahira, Y., Kawana, A. and Miura, S.:	Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan.	Emerging Infectious Diseases.	20(1)	146-148	2014
Kazuo Imai, Takuya Maeda , Yusuke Sayama, Kei Mikita, Yuji Fujikura, Kazuhisa Misawa, Morichika Nagumo, Osamu Iwata, Takeshi Ono, Ichiro Kurane, Yasushi Miyahira, Akihiko Kawana, and Sachio Miura	Mother-to-Child Transmission of Congenital Chagas Disease, Japan	Dispatch	Vol.20 Number 1		2014
岡田 義昭	輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発。	検査と技術	42 巻	4-7	2014

<p>今井一男、前田卓哉、三木田馨、吉川幸尾、佐山勇輔、小野岳史、岩田理、武田晋作、宮平靖、川名明彦、三浦左千夫.</p>	<p>シャーガス病における遺伝子学的診断法の開発と検討.</p>	<p>臨床寄生虫学会雑誌</p>	<p>23号</p>	<p>41-45</p>	<p>2013</p>
<p>前田卓哉、南雲盛親、佐山祐輔、三沢和央、今井一男、藤倉雄二、河野修一、原悠、叶宗一郎、三木田馨、小野岳史、宮平靖、川名明彦、三浦左千夫</p>	<p>ベンズニダゾールにより治療を行ったシャーガス病の2症例：</p>	<p>日本臨床寄生虫学会誌</p>	<p>Vol.24</p>	<p>1-33</p>	<p>2013</p>