

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 23 年度～平成 25 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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・・・13
研究分担者：岡田義昭（国立感染症研究所・血液・安全性研究部）
（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（慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室）
（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・・・29
研究分担者：百瀬俊也（日本赤十字社・血液事業本部）
（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・・・47
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：疾病媒介蚊の移動分散に関する基礎研究・・・51
研究分担者：津田良夫（国立感染症研究所・昆虫医科学部）

6 . デングウイルス感染による宿主側応答の解析 Flap 付加プライマーによる節足動物媒介性ウイルスゲノムの増幅とその応用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 59

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 73

総合研究報告書

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。

変異型プリオン病研究について、白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去効果を検討した。また、エキソソーム精製試薬を用いて異常プリオンが濃縮された。貯留前白血球除去法と初流血除去に関し、報告データを用いた解析を行った。

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存在することも明らかとなった。また、*T. cruzi* 抗体陽性者の存在が明らかとなった。

バベシア症については、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を開発し、動物検体を用いて基礎研究を行った。さらに、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、ヒトスジシマカとアカイエカの分散範囲を推定した。ヒトスジシマカは、観察された1日の最長移動距離は92mであった。ヒトスジシマカの最大分散範囲を、野外調査により得られた成虫の最長余命40.8日と1日当たり最大移動距離92mの積によって、3,753.6mと推定した。一方、アカイエカは吸血後数日間に少なくとも350m移動した。

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 Flap RT-PCR 法の開発を行った。Flap RT-PCR 法が、フラビウイルス共通プライマーやアルファウイルス共通プライマーでは検査法の感度を増加させた。

研究分担者：

岡田義昭(埼玉医科大学血液・細胞移植部
部長)

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
室長)

三浦左千夫(慶応大学医学部熱帯医学寄生

虫学教室 非常勤講師) (平成 23 年度)
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)
小島 精 (前、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客
員研究員) (平成 24, 25 年度)
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)
五井 薫 (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. 変異型プリオン病に関する研究:

1) 白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去:

ウシ海綿状脳症を発症したウシの脳乳剤を用いて異常プリオンを感染させたヒト glioma 細胞株の培養上清にキレート剤を添加後、0.5mL を 5% アルブミン 200mL に加えた。これを白血球除去フィルターのバッグに注入しよく混合した。1 部を除去前の検体として採取した。仕様書に従って白血球除去フィルターで濾過した。フィルターを通した溶液は処理後の検体として採取した。

(2) エキソソームの精製法と異常プリオンの検出:

マウス白血病ウイルスと異常プリオンが重感染したヒト腎癌細胞株の培養液を 10mL 取り、3000g で 15 分遠心し、上清に ExoQuick-TC (System Biosciences 社) 2mL を添加した。混合し 4 にて 14 時間以上静置後、1500g で 30 分遠心し 沈殿を得た。

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々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. バベシア症に関する研究:

1) LAMP の開発

B. microti 18s ribosomal DNA (rDNA) の遺伝子情報を基に、LAMP 用のプライマー 4 種類 (FIP、BIP、F3、及び B3) を設計し、遺伝子増幅の条件検討を行った。また、*B. microti*、*Anaplasma*、*Ehrlichia*、及び *Plasmodium falciparum* の DNA サンプルを用いて、LAMP の特異性ならびに感度についても検討を行った。

2) ICT の開発:

B. microti に特異的な BMN1-17 の組換え蛋白質を大腸菌に発現させ、SDS-PAGE およびウエスタンブロットを行い、組換え蛋白質の分子量と抗原性について検討を行った。次に異なる蛋白質濃度 (10~1,000 mg/ml) および pH (5.0~7.0) の条件検討を行い、rBMN1-17 抗原と金コロイド (50nm) への最適な標識条件の検討を行った。次に、得られた金コロイド標識 rBMN1-17 蛋白質をサンプルパットに、rBMN1-17 蛋白質と抗ウサギ BMN1-17 蛋白質 IgG をニトロセルロース膜へジェット塗布し ICT ストリップを作製した。更に、ハムスターの陽性、陰性コントロール、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いて得られた ICT ストリップの特異性について検討を行った。

3) ヒト検体を用いた評価:

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、ヒト血液試料を用いてその有用性を確認した。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。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：

1) ヒトスジシマカの移動分散範囲の推定：成虫の寿命と1日当たりの移動距離をマーキング実験によって求め、その積によって分散範囲の推定を行った。

2) 吸血飛来成虫の平均余命：東京都立林試の森公園で6月から11月の期間にヒトスジシマカの人囀採集を行った。採集されたヒトスジシマカの雌成虫を持ち帰り $26.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $58 \pm 0.9\%$ 、16時間日長に調節した飼育室で飼育し、すべての個体が死亡するまで死亡日と死亡個体数を毎日記録した。この調査結果に基づいて、野外捕集蚊の実験室内における平均余命を求めた。

3) マーキング実験による移動距離の測定：ヒトスジシマカが1日の間に動き回る範囲を知るために、1個体ずつ異なるマークを付けて放逐し、複数の採集場所で再捕獲を継続して行って、個体ごとに動いた軌跡を調べた。

4) 胸部への個体識別マーキング法の検討：翅にマークを行うことによるダメージが大きいと考え、ダメージが小さく抑えられる方法として胸部背面にマークする方法を検討した。

5) 野外における個体識別マーキング調査：2013年3月17日から3月27日の期間、石垣島の住宅街でマーキング実験を行った。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。

6) アカイエカの吸血個体の移動分散に関する研究：本研究では野外で既に吸血した個体を採集し、その個体が保持していた動物血液からDNAを抽出し、吸血源となった動物を推定して、その動物のいた場所と採集場所の距離を吸血した蚊の移動分散距離の推定に用いた。

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. 変異型プリオン病に関する研究：

1) 血液からの異常プリオン除去法の開発：

フィルターによる除去前後の検体は、それぞれ 10 倍ずつの段階希釈を行い、 1×10^5 /well に撒いた異常プリオン非感染ヒト glioma 細胞株に感染させた。感染させた細胞は、2 回/週の頻度で継代し、サンプリングし、異常プリオンの感染の有無は感染 30 日後ウエスタンブロット法で解析した。異常プリオンを 5% アルブミンに添加し、白血球除去フィルターを通した検体からは、 10^{-3} に希釈して感染させた細胞からも異常プリオンは検出されなかった。一方、濾過前の検体からは 10^{-4} 倍希釈した検体まで異常プリオンが検出でき 2Log 以上除去できたと考えられた。

2) 初流血除去の効果の解析：

海外の輸血の専門雑誌と日本輸血細胞治療学会誌から初流血除去に関する文献検索を行ないその有効性を考察した。2001 年に Bruneau らは、採血した最初の血液 15mL とその次の 15mL をそれぞれ細菌培養し、最初の血液からの方が細菌培養が陽性になる率が高い事を報告した。日本においても名雲らが、初流血除去しない群 2967 検体と除去した群 2890 検体の細菌培養を行ない、除去なし群では 0.24% が陽性になったのに対し除去群では 0.07% だったことを報告した。同様に、Satake らは血小板採血時に初流血除去を行なったところ実施前の陽性率 0.17% が実施後 0.05% になったことを報告した。

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：

東海4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実施した。(東海4県パイロットスタディ 期)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。

上記とは別に、在日ラテンアメリカ人集住地域においての抗体検査を行った。平成24年度195名の抗体検査を行ない、5名が抗体陽性であった。うち、在日17年を経過するボリビア日系家族に先天性シャーガス病感染者が検出された。平成25年度272名の抗体検査を実施し、抗体陽性者は2名であった。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の出身であった。

3. ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発：

1) 実験感染マウスの試料を用いた real-time LAMP 法の評価：

real-time LAMP による標的遺伝子の定量化について検討したところ、検出時間と標的遺伝子のコピー数をプロットした結果、直線上の検量線が得られた。次に *B. microti* 感染マウスでは、血液塗沫による原虫の検出は実験感染 6 日目で 1%未満だったが、real-time LAMP 法による定量検出では 3 日目あるいは 4 日目から血中に含まれる微量の標的遺伝子を検出できることが示された。また、血液塗沫で検出できなくなった 28 日以降も real-time LAMP 法により感染の検出が可能であった。

2) 実験感染ハムスターの試料を用いた ICT の評価：

ハムスターに *B. microti* を感染実験させ、継時的に血液を採取して、血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の測定、IFAT、rBMN1-17 を用いた ELISA 及び ICT の抗体検出感度を比較した。赤血球寄生率は、実験感染後 5 日目に 1%を越えて急激に増加し、約 2 週間後にピークを迎えた後、8 週後に 1%以下に減少した。ELISA では、5 日目から抗体が検出され始め、1 週間ほどで急激に上昇してその後高い値を維持した。一方、ICT と IFAT では 7 日後から検出され始め、その後抗体が継続的に検出された。

3) ヒト検体を用いての評価

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：

ヒトスジシマカとアカイエカの分散範囲を推定した。東京都内の公園で 6 月から 11 月の期間にヒトスジシマカを採集し、実験室内における平均余命を求めたところ、最も短かったのは 9 月の採集雌で 13.8 日、最も余命が長かったのは、6 月の採集蚊で平均 40.8 日だった。林に生息するヒトスジシマカを対象として行われたマーキング実験結果から、1 日当たり移動距離を推定したところ平均移動距離は、 10.1 ± 10.6 m、最長移動距離は 44m であった。成虫に与えるダメージが小さい個体識別マーキング法を考案し、石垣島の住宅街でヒトスジシマカを対象としてマーキング実験を実施した。個体識別マークを行って放逐した個体数は、232 個体で、再捕獲されたのは 43 個体、再捕獲率は 0.21 であった。放逐された個体が再捕獲された 48 例について、再捕獲するまでに要した日数を求めたところ、最長 8 日、最短 1 日で、平均は 2.5 ± 1.7 日であった。再捕獲された 48 例のうち、放逐された場所とは異なる場所で再捕獲された例について個体別に 1 日当たりの平均移動距離を求めたところ 35 ± 22 m で、観察された 1 日の最長移動距離は 92m であった。献血制限に関わるヒトスジシマカの“最大”分散範囲を、野外調査により得られた成虫の最長余命 40.8 日と 1 日当たり最大移動距離 92m の積によって、3,753.6m と推定した。

アカイエカの吸血蚊を用いて、吸血源動物の同定を行った。131 個体のサンプルを分析し、DNA の塩基配列の類似性によって鳥類 17 種と哺乳類 5 種が吸血源となっていると推定された。これらの吸血源動物の中で飼育場所が特定できるものについて、飼育場所と吸血個体が採集された場所の距離を測定して、吸血後のアカイエカの移動分散距離を求めた。新鮮な血液を持った個体の平均移動分散距離は 30.6m および 66.7m で 40m 以内の個体が多かった。これに対して完成卵を持った個体は 350m を移動しており、血液を消化中の個体は 10m から 350m の範囲の様々な距離を移動していた。これらの結果から、アカイエカは吸血後数日間に少なくとも 350m を移動すると結論した。過去の研究でアカイエカが吸血源動物の探索のために動き回る範囲の推定値として得られた 1.2km と、本研究で得られた吸血後の移動距離を加算した 1.55km は、献血制限範囲に関するひとつの科学的根拠を与えると思われた。

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 ヲ所の 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るとの報告がある。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。

D. 考察

白血球除去フィルターによって 5% アルブミンに添加した異常プリオンを 2Log 以上除去できることを実験的に示すことがで

きた。輸血後に vCJD を発症した供血者とその血液の受血者における vCJD 感染症例の解析から、血液製剤中に存在する異常プリオンの量は極めて少ないことが統計学的に示されているため、白血球除去フィルターは完全とは言えないまでも感染予防に効果を発揮していると考えられる。効果的なスクリーニング法がない現状では、白血球を除去することによって輸血の副作用の発生も抑制する事が期待できることから、白血球除去フィルターの導入は適切な判断だと言える。また、初流血除去の効果では、多くの報告が細菌感染の率が減少しているとその効果を認めている。無症候性の菌血症には無効であるが、穿刺部からの細菌の混入防止には効果的だと考えられた。

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（カテゴリー 1）の対象 457 名中 *T. cruzi* 抗体陽性者は 1 名であったこと、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。

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、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。

ヒトスジシマカの移動距離を推定した。ヒトスジシマカは好適な茂みへ移動して、そこに留まる傾向がある。長崎市の林の内部で行われたマーキング実験で求められた1日の移動距離は平均 10.1 ± 10.6 m, 最長44mであった。これに対して、石垣島の住宅街の場合、1日の平均移動距離は 35 ± 22 m, 観察された1日の最長移動距離は92mであった。これらの結果は、ヒトスジシマカが好適な林の中に留まる傾向があるため、1日の移動距離は林の中では短く、緑地が点在するような住宅街では長くなることをはっきり示している。ヒトスジシマカの分散範囲は好適な茂みがあれば狭くなり、好適な茂みがなければ広くなると予想される。分散範囲を1日の移動距離によって推定する場合、もうひとつの重要なパラメータは、成虫の寿命である。本研究の調査では、吸血のために飛来する成虫の平均余命は、最短13.8日、最長40.8日であることが示された。献血制限に関わるヒトスジシマカの移動分散範囲の推定は、通常行われる平均値に基づく推定ではなく、いわゆる過大推定である方が適切である。したがって、本研究で観察された最長余命40.8日と1日当たり最大移動距離92mを掛け合わせて得られた、3,753.6mを“最大”分散範囲とするのが妥当と推察される。

E. 結論

白血球除去フィルターは輸血のアレルギー反応に関する副作用を減少させた。また、実験的には異常プリオンをある程度除去できることが示された。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を簡便に濃縮できることを明らかにした。

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。一方、これとは別に在日ラテンアメリカ人居住地域においての抗体検査を行った。平成24年度195名の抗体検査を行ない、5名が抗体陽性であった。平成25年度272名の抗体検査を実施し、抗体陽性者は2名であった。

バベシア症については、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、献血制限に関わるヒトスジシマカの最大分散範囲を、野外調査により得られた成虫の最長余命40.8日と1日当たり最大移動距離92mの積によって、3,753.6mと推定した。

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、両者とも各社が示している感度とほぼ同等であった。

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

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

Tsuda, Y. and Kim, K.S.: Ecology of mosquitoes inhabiting a park in urban Tokyo, Japan: density of biting *Aedes albopictus* and laboratory estimation of the residual longevity. *Medical Entomology and Zoology* 63: 223-230. 2012

Kato, F., Kotaki, A., Yamaguchi, Y., Shiba, H., Hosono, K., Harada, S., Saijo, M., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S. Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR. *Virus Genes* 44: 191-197, 2012.

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: 104-110. 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

2) 和文論文

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-tripanosoma cruzii test and questionnaire survey in Japan for blood donors native of Latin America. 24th Regional Congress of the ISBT, Kuala Lumpur, Malaysia 2013

2) 国内学会

百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、内田茂治、日野学、鬼束惇義、南澤孝夫、小島精、高松純樹、田所憲治：東海4県の中南米居住歴を有する献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査とシャーガス病に関するアンケート結果について、第60回日本輸血・細胞治療学会総会、福島、2012年

百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、石野田正純、松本千恵子、内田茂治、日野学、高松純樹、田所憲治：東海4県の中南米からの定住者の献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査パイロットスタディと日本における中南米からの定住者の献血者数の推計について、第53回日本熱帯医学会大会、帯広、2012年

石野田正純、百瀬俊也、柴田玲子、日野学：

問診票改訂に伴う中南米滞在歴を有する献血者数の変動について、第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会、福島、2012 年	なし 2. 実用新案登録 なし 3. その他
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	なし
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	
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，川口市	
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	
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	

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

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

- 1) エキソソーム精製試薬を用いて異常プリオンが感染している細胞株の培養上清から異常プリオンを濃縮することができ、ウエスタンブロット法で検出することができた。
- 2) 白血球除去フィルターで異常プリオン感染細胞株の培養上清を濾過したところ 2Log 以上除去できることが示唆された。
- 3) エキソソーム精製試薬を用いて 5%アルブミン製剤 10mL に添加した C 型肝炎ウイルスを効率良く回収・濃縮することができた。
- 4) 10%牛胎児血清入りの細胞培養上清から牛下痢症ウイルス、仮性狂犬病ウイルス シンドビスウイルスなどのウイルスを感染性を保持した状態で濃縮することができた。
- 5) 牛血清やヒト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。
- 6) 濃縮効果は非常に微量なウイルスも効果的に濃縮することができた。
- 7) 保存前白血球除去によってショックを含むアレルギー反応が減少した。
- 8) 初流血除去により日本の血小板製剤の細菌混入率は 減少している。

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 年をピークとして以後減少し、2012 年の英国の死亡例は 0 となった。しかし、ニューギニアの Kuru の追跡調査から感染してから発症するまで 50 年以上を要した例があることや英国の切除された虫垂を用いた疫学調査から未発症の感染者が、存在していることも明らかとなり、今後も長期にわたり対策を取り続ける必要がある。これまで英国において輸血を介

した vCJD 感染例が 4 例報告されているが、白血球除去フィルター導入後、輸血による受血者の vCJD 発症例は報告されていない。白血球除去フィルターは羊の vCJD 感染モデルを用いた輸血による感染の解析から完全ではないが、異常プリオンを除去できることが証明されている。これは白血球除去フィルターが、感染細胞だけではなく血中の異常プリオンを除去している可能性を示唆するものである。そこで、異常プリオン感染細胞株の培養上清を用いて白血球除去フィルターから実際に異常プリオンが除去できるか検討をした。

さらに輸血による副作用について保存前白血球除去の効果を解析した。併せて、初流血除去の効果も情報を集め解析した。

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・検出できるのか検討した。また、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ることによってウイルスも異常プリオンと同様に濃縮できるか検討した。予想通り濃縮できたのでさらに 10mL という大容量からウイルスの検出が困難な血清やヒト血漿からもウイルスを濃縮できるか検討した。さらに血清や血漿に極微量なウイルスが混入した場合においてもウイルスを効率良く濃縮できる稼働が検討した。

B. 研究方法と結果

(1) 白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去

ウシ海綿状脳症を発症したウシの脳乳剤を用いて異常プリオンを感染させたヒト glioma 細胞株の培養上清にキレート剤を添加後、0.5mL を 5% アルブミン 200mL に加えた。これを白血球除去フィルターのバッグに注入しよく混合した。1部を除去前の検体として採取した。仕様書に従って白血球除去フィルターで濾過した。フィル

ターを通した溶液は処理後の検体として採取した。フィルターによる除去前後の検体は、それぞれ 10 倍ずつの段階希釈を行い、 1×10^5 /well に撒いた異常プリオン非感染ヒト glioma 細胞株に感染させた。感染させた細胞は、2 回/週の頻度で継代し、サンプリングし、異常プリオンの感染の有無は感染 30 日後ウエスタンブロット法で解析した。異常プリオンを 5% アルブミンに添加し、白血球除去フィルターを通した検体からは、 10^{-3} に希釈して感染させた細胞からも異常プリオンは検出されなかった。一方、濾過前の検体からは 10^{-4} 倍希釈した検体まで異常プリオンが検出でき 2Log 以上除去できたと考えられた。

(2) エキソソームの精製法と異常プリオンの検出

マウス白血病ウイルスと異常プリオンが重感染したヒト腎癌細胞株の培養液を 10mL 取り、3000g で 15 分遠心し、上清に ExoQuick-TC (System Biosciences 社) 2mL を添加した。混合し 4 にて 14 時間以上静置後、1500g で 30 分遠心し沈殿を得た。この沈殿 Proteinase K 処理し、異常プリオンを抽出したところ培養上清から異常プリオンを検出することができた。

(3) 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 μ 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 μ L の PBS で溶解しウイルス濃縮液とした。濃縮前後の総ウイルス量を比較すると効率良く濃縮されていた。また、ウイルスの濃縮できる至適条件を解析するため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に含まれるウイルス量を測定したところ 2mL よりも少量で充分ウイルスは濃縮することが可能であった。

一方、牛胎児血清とヒト血漿では、2mL の精製試薬を添加したところ溶解不可能な程の沈殿が生じたが、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に含まれるウイルス量を測定したところ 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くなる（溶解可能）ことが明らかになった。

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 0.3mL エキソソーム精製試薬を添加し、同様の処理を行い、回収効率を検討した。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。

(4) 保存前白血球除去の効果の解析

日本赤十字社に報告されている輸血による副作用の種類とそれぞれの件数を導入前後で調べた。また、海外の文献等から情報を集めた。2007 年から赤血球製剤の貯留前白血球除去が導入された。各副作用の報告件数をみると最も変

化が認められたのは、アナフィラキシー（アナフィラキシー反応とアナフィラキシーショックを併せて集計）の発生件数が半減したことである。また、発熱の報告件数も減少傾向が認められた。海外からの報告では、これまでに幾つかのランダムイズされた治験が実施されているが、貯留前白血球除去が有効か、無効かの一致した結論は得られていない。

(5) 初流血除去の効果の解析

2001 年に Bruneau らは、採血した最初の血液 15mL とその次の 15mL をそれぞれ細菌培養し、最初の血液からの方が細菌培養が陽性になる率が高い事を報告した。日本においても名雲らが、初流血除去しない群 2967 検体と除去した群 2890 検体の細菌培養を行ない、除去なし群では 0.24% が陽性になったのに対し除去群では 0.07% だったことを報告した。同様に、Satake らは血小板採血時に初流血除去を行なったところ実施前の陽性率 0.17% が実施後 0.05% になったことを報告した。

D. 考察

白血球除去フィルターによって 5% アルブミンに添加した異常プリオンを 2Log 以上除去できることを実験的に示すことができた。輸血後に vCJD を発症した供血者とその血液の受血者における vCJD 感染症例の解析から、血液製剤中に存在する異常プリオンの量は極めて少ないことが統計学的に示されているため、白血球除去フィルターは完全とは言えないまでも感染予防に効果を発揮していると考えられる。2011 年に McCutcheon らによって PLoS ONE に発表されたヒツジの輸血を介したプリオン感染モデルでは、無処理の赤血球製剤におけるプリオン感染率

18.9%が白血球除去フィルター処理によって6.9%、血小板が24.3%から3.4%、血漿が13.2%から3.4にそれぞれ1/3~1/4に減少していた。効果的なスクリーニング法がない現状では、白血球を除去することによって輸血の副作用の発生も抑制する事が期待できることから、白血球除去フィルターの導入は適切な判断だと言える。

また、初流血除去の効果では、多くの報告が細菌感染の率が減少しているとその効果を認めている。無症候性の菌血症には無効であるが、穿刺部からの細菌の混入防止には効果的だと考えられた。

また、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は、PMCA法と組み合わせることによって検出感度が大幅に向上する可能性がある。

その一方でエキソソーム精製試薬によってウイルスが濃縮することを発見した。当初は、5%アルブミン製剤や細胞培養上清に添加したウイルスを濃縮できる程度であり、血清や血漿の濃縮は不可能であった。しかし、添加する試薬の量を適正化することによって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になった。しかも検討した3つのウイルスは何れも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。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。1mL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

白血球除去フィルターは輸血のアレルギー反応に関する副作用を減少させた。また、実験的には異常プリオンをある程度除去できることが示された。

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

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

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成し、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. cruzi* 抗体の Rapid 法による検査を実施した。2011～13 年度の研究調査により判明した *T. cruzi* 抗体陽性者にどのように対処するべく医療体制を整えるかを検討、先天性感染例を含めて本疾患慢性期治療にも期待でき南米で本疾患治療に推奨されている LAPEPE-Benzonidazole を用いての治療を試みた。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検査から治療に至る一連の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 病例の有無について検討及び治療指針を策定する。

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、NGO、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々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 法で調べる。

3) 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、信頼性についても検討した。

以上の疫学調査検診による血清検査診断は、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学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ーのある地域で *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。

25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の出身であった。また在日歴は16~20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33/272名(12.13%)名が日本での献血を経験していた。

25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。日系ポリビア人家族では母子感染も判明している。

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、ポリビア日系先天性感染児もすでに初回検査時には12歳であった。然し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。ちなみに現在まで医療機関を通じての検査依頼は1990年以降45件中19名が抗体陽性(10/19=52.6%)はPCRで抗原 *T. cruzi*-DNAを検出)慢性キャリアーと確認した。特に2011~13年度に行ったラテンアメリカ人コミュニティーでの *T. cruzi* 抗体検査では11/522(2.1%)と前回調査研究期間を上回るものであった。

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%)

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ーでの *T. cruzi* 抗体検査

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

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、神奈川県、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がある。

昨年度からの東海4県のパ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。

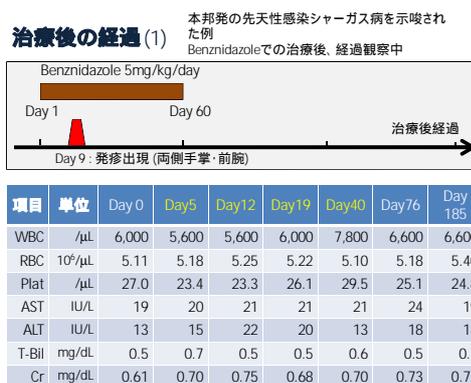
更に在日ブラジル人およびポリビア人の献

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%）から潜在的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）では現在CHAGAS-STAT-PACK（CHEMBIO）、Detect-Trypanosoma cruzi(*In-Bios*)の特異性が高く中南米の流行地でスクリーニングに採用をされている。しかし、我が国の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として常備出来ない。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及びChagas病に対する特異的治療を行った者

に対しての予後観察に関しては、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3例について以下に示す。



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 *T. cruzi* 抗体検査、健康相談にて *Chagas* 病末期合併症の診断のもと、*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。



この例は我が国で今後最も多く経験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 *T. cruzi* 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对症治疗にて軽減し、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みられない。

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)については日赤より基幹病院を紹介、紹介先病院からの依頼に基付き、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、2011年度の震災以来定住者の動向が安定せず懸念されたが2012、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522名の検査が実施出来、官民一体となつての作業が重要である事が認識された。国内で感染慢性期を示すケースは19名におよび、そのうち10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ている。

同時に今後Brazil・Bolivia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ー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から *T.cruzi* 抗体陽性者は2名であり、1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、他の1名に関しては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。今後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、検査啓発を行い今後の国内での健康相談、抗体検査の呼びかけを行うことが可能と期待する。

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、患者医療情報を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 (LAF EPE-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* 病に関しても検査～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今後に予想され、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する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有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は対象として用いた 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て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。今回治療を行った例に関わった医療従事者 7 名に関しては幸いにも二次感染は否定された。しかしこのような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。

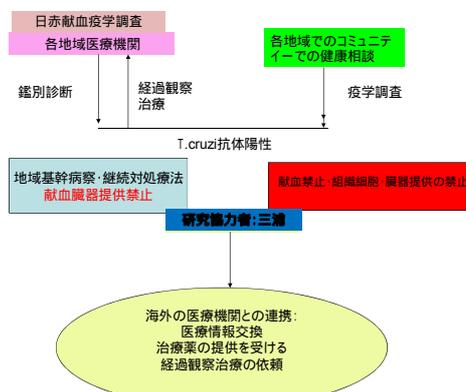
Bolivia では慢性シャーガス病妊婦の約 5% に先天性感染児の出産が報告されている。本研究期間中ラテンアメリカ人を対象にした検診調査ができたのも各地の NPO、NGO、及びブラジル領事館の協力が得られた結果である。地域社会医療の面からも意義があったと思われる、今後のラテンアメリカ人集住地域での活動の推進につな

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。東海4県の以外に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。

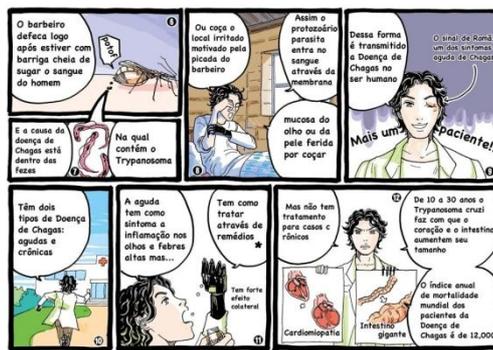
F) 健康危険情報

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』朱戸アオ著；講談社のダイジェスト版をポルトガル語に翻訳して、掲示、検査の呼びかけを行っている。

Chagas病について



感染から慢性期合併症とは？



献血輸血臓器移植による二次感染の危険性を提示、検査を受けましょう！！



すでに南米長期滞在者（日本人）から抗体陽性者が検出されたことなどから、献血現場では日本人に対しても中南米4週間以上の滞在経験者には経過時間の長短に関係なく *T. cruzi* 抗体スクリーニングを行うように献血リーフレットで呼びかけている。また在日ラテンアメリカ人妊婦の抗体陽性者については本疾患の慢性感染からの先天性感染児出産を想定すべきであることを産科、小児科領域へ注意喚起を更に強化する必要がある。既に日本で出産経験をしたラテンアメリカ人家族についての抗体検査の呼びかけにより、潜在的先天性感染者に関しても今後の献血輸血の禁止など健康管理面での注意を促す事が必要。早期診断、治療により *Chagas* 病慢性期合併症予防にも繋がる。更に在日定住者ラテンアメリカ人の多くにシャーガス病に関する啓蒙口演など情報の発信が不可欠。ラテンアメリカ人集住地域での献血血に関しては抗体スクリーニング検査を全例行う事が望ましい。同時に地域の医療機関従事者への呼びかけも重要である。

T. cruzi 抗体陽性者に対する対応について。

献血者及びラテンアメリカ人コミュニティで検出された *T. cruzi* 抗体陽性者に対する医療機関としての対応は以下の通りである。

1) 居住地域基幹病院への受診紹介。

2) 紹介先医療機関からの精査依頼：

抗体検査及び抗原検出について日赤中央血液研究所感染症解析部で行う。治療後の予後診断についても同様に行う。

既に *Chagas* 病慢性期合併症患者などを診た経験ある医療機関

滋賀県守山成人病センター、滋賀医大付属病院、滋賀県甲賀市公立甲賀病院、三重県医大付属病院、菰野厚生病院、四日市市立病院、愛知県増子記念病院、豊田厚生病院、岡崎市民病院、名古屋記念病院、豊田ハトセンター、静岡県：

聖隷三方原病院、J A 厚生連遠州病院、浜松医大付属病院、神奈川県：東海大学大磯病院、鳥越クリニック、横浜市民総合医療センター、埼玉県：**防衛医科大学病院**、群馬県：太田総合病院、栃木県：**那須日赤病院**、赤字表記は *Chagas* 病特異的治療薬（国内未承認薬）Benznidazole の使用経験あり。

地方に散在するラテンアメリカ人コミュニティでの健康相談会が潜在感染者を検出するためには有効である。

ラテンアメリカ人コミュニティでの健康相談風景を示す。静岡県浜松市にて、日系ブラジルNGO - Disque-saude との協力によるブラジル人医師も含めての健康相談会風景：



群馬県邑楽町大泉にて日本ポリビア協会・NPO-MAIKEN, NGO-D. Saudeの共同作業、JICA中南米シャーガスプロジェクト参加OGなど、民間の多くの方々の支援を得てラテンアメリカ人コミュニティーで*T. cruzi* キャリアーの検査・健康相談活動を行っている。こうした活動が潜在キャリアーを検出するためには必要不可欠であり、彼らの健康管理にも貢献する。



こうしたコミュニティーで判明した抗体陽性+有症者に対してはブラジル人医師も含めて健康相談を行い、精査治療可能な感染症科を有する医療機関を紹介した

紹介医療機関

防衛医科大学付属病院感染症科

独協医科大学付属越谷病院感染症科

国立医療センター感染症科

那須日赤病院

三重医科大学病院

滋賀県成人病センター

三重県厚生菰野病院

等が協力を申し出ている。25年度は防衛医科大病院・那須日赤病院に於いてシャーガス病の患者について予後経過観察を行っている。献血者からの感染者及び医療機関からの依頼検査に限り日赤感染症解析部で

研究的予後観察調査は継続する。

治療：Chagas 病の治療に関しては我が国では熱帯病治療薬研究班に Lampit(Nifrutimox) を保有しているはずであるが、日本では先天性感染新生児（急性期）、輸血・臓器移植などによる二次感染急性期にのみ対応可能であるが、現在我が国では在日ラテンアメリカ人の慢性感染者を対象にする治療薬としては慢性期にも一定の効果を期待できる LAFEPE-Benznidazole をブラジル連邦共和国・保健省・地域保健局 Chagas 病対策委員会より提供を受ける以外に方策が無い。今後、熱帯医学治療薬研究班の協力を得て国レベルでの提供ルートを確認すべきである。先に示す通り治療を受けた3名の患者は血液中の *T. cruzi* は消滅したが、抗体価の推移については経過観察を防衛医科大学病院及び日赤中央血液研究所にて継続する。3例目の日系ブラジル人慢性感染シャーガス病患者についても治療中であり、特筆すべく副作用もなく経過良好である。今後の問題は母国への帰国を望む場合は以下の機関が協力可能である。1～3はブラジル国内、4～5はポリビア国内である。

海外での協力機関

- 1) Ambulatorio Chagas/ICC: PROCAPE-UPE Hospital-Oswald Cruz-Pernambuco-Brazil
- 2) USP-Faculdade de Medicina Dept-Infect Sao Paulo-Brazil
- 3) Serviço Publico Federal Conselh Regional de Medicina do Sao Paulo-Brazil
- 4) CENETROP/Banco National de Sangre/ SC-Bolivia
- 5) Programa Nacional de Chagas/SC.Bolivia

更にサンパウロ州全地域に支部を持つ APM (Associacao Paulista de Medicina)

Av.Brigadeiro Luis Antonio 278

Boavista-Sao Paulo-SP-Brasil

TEL: -55-11-3188-4200

が在日日系人のChagas病治療に協力が可能である。

G ; 業績

論文発表

- 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

- 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

学会発表

- 1) 今井一男、前田卓哉、三木田馨、吉川幸尾、小野岳史、佐山勇輔、小林正規、川

名明彦、宮平靖、三浦左千夫. シャーガス病に対する遺伝子診断開発. 第53回日本熱帯医学会(帯広)2012.9.

- 2) 今井一男、吉川幸尾、三木田馨、前田卓哉、小野岳史、川名明彦、宮平靖、三浦左千夫. シャーガス病における遺伝子学的診断法の開発と検討. 第23回日本臨床寄生虫学会(東京)2012.6.

国際シンポジウム

第11回日本ポリビア国際内視鏡シンポジウム(招待講演): 日本ポリビア医療友好協会・スクレ・ポリビア・スクレ

2012・11

La situación de infección de la enfermedad de Chagas residiendo en Japao de bolivianos y profilaxis de infección secundaria

Sachio Miura

在日ポリビア人のChagas感染状況と二次感染予防について。

ブラジル日系人文科学研究会

- 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/2013/131106-74colonia.html>

その他: TV放映

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

H: 該当なし

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

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)
小島 精(前、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)
五井 薫(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:

1. ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応

ウエストナイルウイルス(以下、WNV という)の国内感染が認められた場合の献血者への対応については、感染媒体ごとに献血制限範囲や WNV-NAT の実施有無などが示されている(平成 17 年度第 1 回血液事業部会安全技術調査会)(表 1)。日本赤十字社では、都道府県単位で 1 ヶ月間 WNV-NAT が実施できるよう TMA 法の WNV-NAT 試薬(Procleix® WNV Assay)を備蓄している。この 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、特異性の比較検討を行った。TMA 法の試薬の方が、TaqMan PCR 法の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。同じフラビウイルス属の日本脳炎ウイルスとの交差反応性は両試薬で認められたが、WNV 国内発生時において、このことは大きな問題とはならないと考えられる。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。

2. 国内献血におけるシャーガス病の感染リスクの把握

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、献血血液の重要な安全対策上の課題である。シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴を有する献血者数を、血液事業統一コンピュータシステムから平成 22 年度データを抽出し集計したところ、10,190 人であり、日本人は 8,490 人 (83.3%)、外国人 1,700 人 (16.7%) と推計された。外国人の国別内訳では、ブラジルが 1,299 人と最も多く全体の 76.4% を占め、以下、ペルー 211 人 (12.4%)、アルゼンチン 64 人 (3.8%) などであった。

平成 23 年 4 月の問診票の改訂に伴い、問診票の外国滞在歴に関する質問が、マラリアの感染リスクを想定した滞在期間を限定した質問に変更されたことから、中南米からの定住者の中南米居住歴を十分に拾えなくなった可能性が考えられた。

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) の献血申込 (受付) 者のうち同意を得た者に対し、*Trypanosoma cruzi* 抗体検査を実施した。(東海 4 県パイロットスタディ 期)平成 23 年 2 月～平成 24 年 9 月で、対象者 120 人 (男性 81 人、女性 39 人) 全て *T. cruzi* 抗体検査陰性であった。国籍別では、ブラジルが 97 人と最も多く、ペルー 8 人、メキシコ、コロンビア、パラグアイが各 1 人、日本 12 人であった。

日本赤十字社では、薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会の審議を踏まえ、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。

東海 4 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実施した。(東海 4 県パイロットスタディ 期)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

1．WNV-NAT

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。迅速かつ広域的な対応を可能とするため、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。

2．シャーガス病の感染リスク

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。

平成 23 年 4 月から外国居住歴・滞在歴の問診票が図 1 のとおり変更となったことによる中南米居住歴又は滞在歴を有する献血受付け者、献血者の推移を検討した。併せて中南米滞在歴を有する献血者が、日本人渡航者か中南米出身者かを推計した。

さらにブラジル居住歴を有する献血受付け者が偏在している愛知県、静岡県、岐阜県、三重県の東海 4 県において、中南米居住歴を有する献血申込者 (日本人の長期滞在歴を有する者を含む) 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実施し、抗体陽性者に対しては、その後の健康管理に繋げていくこととした。(パイロットスタディ 期)

日本赤十字社では、薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会の審議を踏まえ、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 2) 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。

安全対策実施以降、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、期と同様に *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た。(パイロットスタディ 期)

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 試薬及び Procleix® WNV Assay 試薬を用いて NAT を 3 回実施した(平成 24 年度)。さらに、TaqScreen®WNV assay 試薬については、MPX 検査陰性の 80 検体で WNV-NAT を 2 回実施した(平成 25 年度)。

WNV-RNA 及び日本脳炎ウイルス RNA を用いた特異性・交差反応性試験

国立感染症研究所から WNV (NY99 株) 3.33×10^7 cps/mL の 50 μ L から抽出し凍結乾燥した RNA と、日本脳炎ウイルス (Beijing-1 株) 1.0×10^8 PFU/mL の 200 μ L から抽出した RNA を 100 μ L の蒸留水で再浮遊し、その 50 μ L を凍結乾燥した RNA 検体の提供を受けた。この凍結乾燥した RNA を WNV の RNA については 300、100、30、10、1、0.1 cps/mL 濃度に、日本脳炎ウイルスの RNA については 1000、500、100、50、10 PFU/mL 濃度に注射用水で希釈したものを各々 3 本作製し、両 WNV-NAT 試薬を用いて NAT を 2 回測定した。各々の濃度における 6 重測定の結果から試薬の交差反応性を評価した。

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

平成 23 年 4 月から外国居住歴・滞在歴の問診票が変更となったので、中南米諸国の居住歴(平成 23 年 1~3 月)又は滞在歴(同年 4~12 月)を有する献血申込(受付)者数及び献血者数を血液事業統一コンピュータシステムより抽出し集計・解析した。

問診票変更前のデータとして、中南米諸国の居住歴(平成 22 年 4 月~平成 23 年 3 月)を有する献血者数を血液事業統一コンピュータシステムより抽出し、氏名表記を基に日本人(氏名漢字表記)、外国人(ミドルネーム又はカタカナ表記)に分類し集計した。

<東海 4 県パイロットスタディ 期>

東海 4 県(愛知県、静岡県、岐阜県、三重県)における献血申込(受付)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の質問票に回答いただいた。別に検体を採血し、愛知県赤十字血液センター(平成 24 年 4 月以降は、東海北陸ブロック血液センター)にてイムノクロマト法(Chembio 社 CHAGAS STAT-PAK®)迅速検査を実施した。また、三浦班員の協力を得て、ELISA 法(ORTHO® *T. cruzi* ELISA TEST System)及びイムノクロマト法(InBios 社 Trypanosoma Detect®)迅速検査による *T. cruzi* 抗体検査を実施した。

平成 24 年 10 月 15 日からのシャーガス病の安全対策実施以降、献血受付時に、図 2 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。

<東海 4 県パイロットスタディ 期>

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）

中南米居住歴を有する者のシャーガス病の感染リスク調査（期）については、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満20歳以上の者を対象とした。中南米滞在歴カテゴリ1の献血者に対するシャーガス病の感染リスク調査（期）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2）

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3）

TMA法（表3）

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4）

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4）

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

20本プールした献血者検体80検体を用い、TMA法及びTaqMan PCR法について、WNV-NATを3回実施したが、両法共に全て陰性で、陽性又は偽陽性は検出されなかった（平成24年度）

同様に、20本プールした献血者検体80検体を用いTaqMan PCR法で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（平成25年度）

WNV-RNA及び日本脳炎ウイルスRNAを用いた特異性・交差反応性試験（表5）

TaqMan PCR法試薬では、WNV NY99株は100cps/mLまでが陽性率100%で、30cps/mLで陽性率が83.3%、10cps/mLで33.3%であっ

た。日本脳炎ウイルスは 10 PFU /mL まで全て陽性となり、交差反応性が認められた。

TMA 法試薬 WNV NY99 株は 1cps/mL までが陽性率 100%で、0.1cps/mL で陽性率が 16.7%となった。日本脳炎ウイルスでは 50 PFU /mL までが陽性となり、交差反応性が認められた。

3) 実検体を用いた検査シミュレーション

(図 5)

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 分であり、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) 中南米居住歴又は滞在歴を有する献血申込(受付)者数及び献血者数(平成 23 年 1 月～平成 23 年 12 月)

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴又は滞在歴を有する、平成 23 年(2011

年:速報値)の献血申込(受付)者数及び献血者数を集計・解析した。平成 23 年 1～3 月の中南米居住歴のある献血申込(受付)者数 3,184 人(月平均 1,061 人)献血者数 2,683 人(同 894 人)に対し、同年 4 月の問診票改訂以降の 4～12 月(9 ヶ月間)では、過去 1 年以内の中南米滞在歴のある献血申込(受付)者数 4,020 人、献血者数 3,244 人、過去 4 年以内に 1 年以上の中南米滞在歴のある献血申込(受付)者数 451 人、献血者数 337 人であり、その合計(重複あり)は、献血申込(受付)者数 4,471 人(月平均 497 人)献血者数 3,581 人(同 398 人)であった。国別で分類してみると、従来最も多かったブラジルは、1～3 月の献血申込(受付)者数 1,344 人(月平均 448 人)献血者数 1,127 人(月平均 376 人)から 4～12 月の献血申込(受付)者数 1,040 人(月平均 116 人)献血者数 835 人(月平均 93 人)と約 1/4 に減少していた。一方、メキシコは、1～3 月の献血申込(受付)者数 701 人(月平均 234 人)献血者数 607 人(月平均 202 人)から 4～12 月の献血申込(受付)者数 1,525 人(月平均 169 人)献血者数 1,240 人(月平均 138 人)となり、国別では最も多くなった。(表 6)

2) 中南米諸国の居住歴を有する献血者数(平成 22 年 4 月～平成 23 年 3 月)

平成 22 年度の献血者 10,190 人を、日本人と外国人に分類したところ、日本人は 8,490 人(83.3%)外国人 1,700 人(16.7%)であり、外国人の国別内訳では、ブラジルが 1,299 人と最も多く全体の 76.4%を占め、以下、ペルー 211 人(12.4%)アルゼンチン 64 人(3.8%)と続いた。(表 7、表 8、図 6)

3) 東海 4 県パイロットスタディ 期

平成 23 年 2 月～平成 24 年 9 月で、東海 4 県における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 120 人(男性 81 人、女性 39 人)は全て *T. cruzi* 抗体検査陰性であった。年齢別では、20 代 36 人、30 代 46 人、40 代 31 人、50 代 6 人、

60代1人であった。国籍別では、ブラジルが97人と最も多く、ペルー8人、メキシコ、コロンビア、パラグアイが各1人、日本12人であり、中南米国籍を有する者は108人(男性74人、女性34人)年齢別では、20代33人、30代43人、40代27人、50代5人で、年齢の中央値は32.5歳(20~57歳)であった。彼らの日本滞在期間は平均10.7年(2ヵ月~28年)であった。(図7)

シャーガス病に関するアンケート調査は、家の構造に対する回答は様々であったが、サシガメの生息が類推されるような回答はなかった。サシガメやシャーガス病の認知度は、日本人を除いた中南米国籍者では各々70%、79%であった。また、サシガメに刺された者はいなかった。過去に*T. cruzi*抗体検査を行っていた者は18名であり、全員ブラジル人で陰性であった。また、家族にシャーガス病の者がいたのは2名(祖母、親)だけであり、いずれもブラジル人であった。シャーガス病の症状である心疾患や消化器疾患を指摘された者はいなかった。(図8)

4) 中南米滞在歴等を有する受付者数及び献血者数(図9)

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。

5) 東海4県パイロットスタディ 期

平成25年1月8日から(平成26年1月31日まで)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。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。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。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10・図11)

シャーガス病に関する7項目のアンケート調査については、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、サシガメが生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。(図12)

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年のポリビア人で、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

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。同じフラビウイルス属の日本脳炎ウイルスとの交差反応性は両試薬で認められたが、このことは大きな問題とはならないと考えられる。

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

シャーガス病の非流行地域の日本では、中南米からの定住者や中南米に長期滞在歴のある日本人の感染リスクを考慮する必要がある。献血時の問診上の取り扱いは、「シャーガス病の既往歴のある者から採血しないこと」としているが、感染者自身も無症候期には自覚していないことから、実際にはシャーガス病の既往歴を申告する者はいないと考えられる。現状においては、日本語を十分に理解していない外国人は献血に協力することが困難であること、中南米の一部地域はマラリア流行地と重なることなどから一定のバリアになっていると考えられる。

しかし、平成23年4月以降の中南米滞在歴のある献血者数の減少は、東日本大震災の影響により中南米出身定住者の減少も考えられるが、問診票の外国滞在歴に関する質問が、マラリアの感染リスクを想定した、滞在期間を限定した質問になっていることから、中南米出身定住者の中には問診項目に該当せず中南米滞在歴を拾えなくなったと考えられる。

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期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として、平成24年10月15日から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ない製造制限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) 百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、内田茂治、日野学、鬼束惇義、南澤孝夫、小島精、高松純樹、田所憲治：東海4県の中南米居住歴を有する献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査とシャーガス病に関するアンケート結果について、第60回日本輸血・細胞治療学会総会、福島、2012年

2) 石野田正純、百瀬俊也、柴田玲子、日野学：問診票改訂に伴う中南米滞在歴を有する献血者数の変動について、第60回日本輸血・細胞治療学会総会、福島、2012年

- 3) 百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、石野田正純、松本千恵子、内田茂治、日野学、高松純樹、田所憲治：東海4県の中南米からの定住者の献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査パイロットスタディと日本における中南米からの定住者の献血者数の推計について、第53回日本熱帯医学会大会、帯広、2012年
- 4) 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
- 5) 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、24th 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
研究分担者 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。本研究は3年間にわたり、簡易・迅速遺伝子診断法として最近注目を浴びている LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) の開発について、実験モデルの系を用いて検討を行った。その結果、設計した LAMP プライマーは、*B. microti* ribosomal DNA 遺伝子を増幅し、既存の PCR 法よりも高い検出感度を示した。また、マウスを用いた感染実験では、赤血球寄生率が低い感染初期及び慢性期においても、LAMP 法により感染の検出が可能であった。一方、大腸菌により発現させた組換え BMN1-17 蛋白質を用いた ICT は、*B. microti* に対する高い特異性を示した。ハムスターを用いた感染実験では、赤血球寄生率が検出されるほぼ同時期に ICT により抗体の検出が可能であった。また、神戸の人感染血液を用いた LAMP 法および ICT においても、標的遺伝子の増幅並びに抗体検出が可能であった。以上の結果を基盤にして今後、国内ばかりでなく海外の流行地で得られた人の試料を用いてこれらの遺伝子および血清診断法の実用性を検討する必要がある。

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の開発を目的とした。主として実験動物モデル系を用いて、簡易・迅速遺伝子診断法として最近開発された LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) について、実

験モデルの系を用いて検討を行った。また、日本で最初に認められ、*B. microti* 感染者の試料を用いて、人患者への有用性について検討した。

B. 研究方法

(1) LAMP の開発

B. microti 18s ribosomal DNA (rDNA) の遺伝子情報を基に、LAMP用のプライマー4種類 (FIP、BIP、F3、及びB3) を設計し、遺伝子増幅の条件検討を行った。また、*B. microti*、*Anaplasma*、*Ehrlichia*、及び *Plasmodium falciparum* の DNA サンプルを用いて、LAMPの特異性ならびに感度についても検討を行った。

(2) 実験感染マウスを用いた LAMP の評価

B. microti をマウスに感染させ、経時的に血液を採取し、Real-time LAMP を標的遺伝子の定量解析を行った。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。

(3) ICTの開発

*B. microti*に特異的なBMN1-17の組換え蛋白質を大腸菌に発現させ、SDS-PAGEおよびウエスタンブロットを行い、組換え蛋白質の分子量と抗原性について検討を行った。次に異なる蛋白質濃度(10~1,000 mg/ml)およびpH(5.0~7.0)の条件検討を行い、rBMN1-17抗原と金コロイド(50nm)への最適な標識条件の検討を行った。次に、得られた金コロイド標識rBMN1-17蛋白質をサンプルパットに、rBMN1-17蛋白質と抗ウサギBMN1-17蛋白質IgGをニトロセルロース膜へジェット塗布しICTストリップを作製した。更に、ハムスターの陽性、陰性コントロール、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いて得られたICTストリップの特異性について検討を行った。

(4) 実験感染ハムスターを用いた ICT の評価

ハムスターを用いて *B. microti* 感染実験を行い、継時的に血液試料を採取した。血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の算定、IFAT、rBMN1-17を用いたELISA及びICTの検出感度を比較した。また、ヒトバベシア患者の血液を用いて、rBMN1-17蛋白質を用いたICTにより患者血清の抗体検出について検討した。

(5) ヒト血液試料

神戸医療大学薬学部より日本で最初の人バベシア患者、献血者、その他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採血されている。

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。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、帯広畜産大学実験動物委員会の承認を得て実施した。また、人の血液材料を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) LAMP法の特異性と感度の検討

B. microti の18s rDNA 遺伝子の塩基配列

に基づいて設計した4種類のプライマーを用いて、63度で90分の反応条件でLAMP法を実施したところ、スメア状の陽性増幅が認められた。また、増幅産物を制限酵素で切断しその配列を決定した結果、目的とする18s rDNA 遺伝子が正確に増幅されていることが確認された。さらに、マダニに媒介される可能性が考えられる *Anaplasma*, *Ehrlichia* や形態的にバベシアに類似性が認められる *P. falciparum* のDNAサンプルを用いてLAMP法の特異性を検討した。その結果、*B. microti* にのみ増幅が認められ、特異性が高いことが示された。

精製DNAサンプルを用いてLAMP法とPCR法の検出感度を比較したところ、LAMPの方が約100倍の高い感度を示した。次に熱処理によるDNA抽出物を用いて検討した結果、同様にLAMP法はPCRに比べて約100倍高い感度を示した。

(2) 実験感染マウスの試料を用いた real-time LAMP 法の評価

最初に、real-time LAMPによる標的遺伝子の定量化について検討したところ、検出時間と標的遺伝子のコピー数をプロットした結果、直線上の検量線が得られた。次に *B. microti* 感染マウスでは、血液塗沫による原虫の検出は実験感染6日目で1%未満だったが、real-time LAMP法による定量検出では3日目あるいは4日目から血中に含まれる微量の標的遺伝子を検出できることが示された。また、血液塗沫で検出できなくなった28日以降もreal-time LAMP法により感染の検出が可能であった。

(3) *Babesia microti* BMN1-17 組換え蛋白質を用いた ICT) ストリップの作製

B. microti BMN1-17 抗原をST融合蛋白質として大腸菌に発現させた。この蛋白質は可溶性で、SDS-PAGEにより、約75kDaのGST融合蛋白質として認められ、GSTを除いた分子量は約50kDaと推定された。また、rBMN1-17蛋白質を用いてウエスタンブロットを行ったところ、約50kDaに主要バンドが確認され、GST蛋白質にはバンドが認められなかった。

次に、組換え抗原を用いて金コロイド標識の条件について検討した結果、組換えBMN1-17蛋白質の濃度が200mg/ml、pH 5.0で金コロイド標識が最良であった。得られた

金コロイド標識 rBMN1-17 蛋白質、BMN1-17 蛋白質と抗ウサギ BMN1-17 蛋白質 IgG を用いて、ICT ストリップを作製し、特異性について検討を行った。その結果、ハムスターの陽性血清、陰性血清、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いて検討を行ったが、陽性コントロールにのみバンドが確認され、他のサンプルでは陽性ラインは認められなかった。

(4) 実験感染ハムスターの試料を用いた ICT の評価

ハムスターに *B. microti* を感染実験させ、継時的に血液を採取して、血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の測定、IFAT、rBMN1-17 を用いた ELISA 及び ICT の抗体検出感度を比較した。赤血球寄生率は、実験感染後 5 日目に 1% を越えて急激に増加し、約 2 週間後にピークを迎えた後、8 週後に 1% 以下に減少した。ELISA では、5 日目から抗体が検出され始め、1 週間ほどで急激に上昇してその後高い値を維持した。一方、ICT と IFAT では 7 日後から検出され始め、その後抗体が継続的に検出された。

(5) ヒト検体を用いた診断法の検討

マウスおよびハムスターで高い特異性と感度が認められた、LAMP と ICT について、日本で初めて認められた人バベシア患者、献血者の検体を用いてその有用性について検討した。LAMP では、バベシア患者と感染源と考えられる献血者の DNA から、標的遺伝子の増幅が認められた。また、ICT でも、患者血清および感染源とされる献血者血清で陽性バンドが認められた。

さらに、111 例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。しかし、*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。

また、ICT の人血清の有用性について検討するため、アメリカのエール大学より 60 例の人患者の血清の提供を受けた。今後、これらの血清を用いて ICT の人への応用の可能性について検討する予定である。

D. 考察

本研究では、輸血による感染が懸念される人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の開発を目的とした。迅速で PCR よりも簡便な遺伝子増幅法である LAMP 法は、約 60 度の等温で短時間(1 時間以内)に標的遺伝子を増幅することが可能である。また、特別の機器を必要とせず増幅の結果を目視で判定することも可能である。また、4 種類のプライマーを使用するため、特異性も高いとされている。これらの特徴は、多数の検体を短時間で検定する必要がある輸血の安全性を評価する方法として非常に適していると考えられる。

本研究では、輸血用血液の *B. microti* 感染の有無を評価する遺伝子診断法として LAMP 法の開発を試みた。*B. microti* の 18s rDNA 遺伝子配列に基づいて設計した 4 種類のプライマーを用いた LAMP 法は、*B. microti* の遺伝子のみを増幅し、ダニによって媒介される *Anaplasma*, *Ehrlichia*、形態や臨床症状が類似しているマラリア原虫の遺伝子を増幅せず、高い特異性を有することが明らかにされた。また、制限酵素によって切断される遺伝子配列を挿入することにより、増幅遺伝子の塩基配列の確認も可能であった。更に、この LAMP 法は、遺伝子診断法として最も広く普及している PCR 法と比較して約 100 倍高い感度を有していることが明らかになった。また、熱処理した血液上清を用いても遺伝子増幅が認められ、DNA 抽出の簡易化も可能であった。*B. microti* 感染マウスを用いた実験では、赤血球感染率が 1.0% 未満の感染初期や原虫がほとんど血液中に認められない慢性期においても、*B. microti* の 18s rDNA 遺伝子の増幅が認められた。

ICT は、ニトロセルロースなどの毛細管現象を利用した免疫学的測定法の 1 つである。微小金属粒子やラテックス粒子などを標識体として用い、検出対象が存在すると、多孔質体上に設けられた判定部位に標識体が捕捉されることで判定部位が発色し、検出対象の存在が確認できる。この方法は、血清試料などを滴下するだけで操作が簡便であり、判定時間も約 15 分と短い。また判定は目視で可能であり、コスト面からも利点がある。

本研究では、血液中の *B. microti* 抗体の検出をする迅速血清診断法として ICT の開発を試みた。最初に、*B. microti* の遺伝子を大腸菌に組み込み、約 50kDa の可溶性 BMN1-17 蛋白質として発現させた。この組換え抗原を用い

て作製したICTストリップは、*B. microti*のハムスター感染血清にだけ陽性バンド認められ、ダニに媒介されるアナプラズマやエールリキアの感染血清ではバンドは認められず、*B. microti*に対する高い特異性が認められた。また、ハムスター感染モデル実験では、感染後5日に赤血球内に*B. microti*に認められ、ELISAによっても抗体が検出された。ICTでは、やや遅れてIFATと同様感染後7日後に抗体が検出された。一般的にICTはELISAと同程度の検出感度を有するとされている。しかしながら、本研究ではICTによる抗体検出がELISAよりも若干遅れたことから、更にICTの検出感度を上げる改善が必要である。

以上の実験動物モデルでの結果に基づき、日本で初めて感染が確認される人試料を用いて、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る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。

E. 結論

本研究において、*Babesia microti*の18s rDNA 遺伝子を標的としたLAMP法および組換えBMN1-17蛋白質を用いたイムノクロマト（ICT）法が確立された。LAMP法は、PCR法より高い感度を示し、日本初の人患者の血液から抽出したDNAサンプルからも標的遺伝子の増幅が認められた。また、ICTによりハムスター実験感染モデルにおいて、IFATやELISAとほぼ同様の感度が示された。更に、*B. microti*発症患者と血液ドナーの血清中からも抗体が認められた。LAMP法とICTは国際的に応用できる可能性を有しており、今後その実用化に向けて、多数の人血液試料を用いて更に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

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., Ishizaki T., 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：疾病媒介蚊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）

献血制限に関わるヒトスジシマカとアカイエカの分散範囲を推定した。東京都内の公園で6月から11月の期間にヒトスジシマカを採集し、実験室内における平均余命を求めたところ、最も短かったのは9月の採集雌で13.8日、最も余命が長かったのは、6月の採集蚊で平均40.8日だった。林に生息するヒトスジシマカを対象として行われたマーキング実験結果から、1日当たり移動距離を推定したところ平均移動距離は、 10.1 ± 10.6 m、最長移動距離は44mであった。成虫に与えるダメージが小さい個体識別マーキング法を考案し、石垣島の住宅街でヒトスジシマカを対象としてマーキング実験を実施した。個体識別マークを行って放逐した個体数は、232個体で、再捕獲されたのは43個体、再捕獲率は0.21であった。放逐された個体が再捕獲された48例について、再捕獲するまでに要した日数を求めたところ、最長8日、最短1日で、平均は 2.5 ± 1.7 日であった。再捕獲された48例のうち、放逐された場所とは異なる場所で再捕獲された例について個体別に1日当たりの平均移動距離を求めたところ 35 ± 22 mで、観察された1日の最長移動距離は92mであった。献血制限に関わるヒトスジシマカの“最大”分散範囲を、野外調査により得られた成虫の最長余命40.8日と1日当たり最大移動距離92mの積によって、3,753.6mと推定した。

上野動物園で採集されたアカイエカの吸血蚊を用いて、吸血源動物の同定を行った。131個体のサンプルを分析し、DNAの塩基配列の類似性によって鳥類17種と哺乳類5種が吸血源となっていると推定された。これらの吸血源動物の中で飼育場所が特定できるものについて、飼育場所と吸血個体が採集された場所の距離を測定して、吸血後のアカイエカの移動分散距離を求めた。新鮮な血液を持った個体の平均移動分散距離は30.6mおよび66.7mで40m以内の個体が多かった。これに対して完成卵を持った個体は350mを移動しており、血液を消化中の個体は10mから350mの範囲の様々な距離を移動していた。これらの結果から、アカイエカは吸血後数日間に少なくとも350mを移動すると結論した。過去の研究でアカイエカが吸血源動物の探索のために動き回る範囲の推定値として得られた1.2kmと、本研究で得られた吸血後の移動距離を加算した1.55kmは、献血制限範囲に関するひとつの科学的根拠を与えられる。

A.研究目的

蚊によって媒介される病原体の流行を想定し、感染の中心からどの程度の範囲を献血制限範囲とするかを決定するために重要な情報として、問題となる病原体の媒介者である蚊が飛翔する範囲がある。本研究は我国における重要な2種の疾病媒介蚊、アカイエカとヒトスジシマカを取り上げて、成虫の移動分散範囲に関する基礎的な情報を得ることを目的として実施された。

ヒトスジシマカは、 Dengue熱やチクングニヤ熱など熱帯・亜熱帯地方で大流行を繰り返す、近年温帯地方でも流行が確認されている蚊媒介性疾患の重要な媒介蚊である。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の推定には、従来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。

本研究ではヒトスジシマカの個体識別マーキング実験を行うとともに、野外で採集された成虫の余命を実験室で調査した。こ

れらの実験によって得られた結果に基づき、本種の分散範囲の推定を行った。

アカイエカは特にウエストナイルウイルスの潜在的な媒介蚊として医学的に重要な種類である。本種の移動分散範囲は蛍光塗料でマークした多数の個体を放逐することによって調べられており、少なくとも1.2kmは移動することが明らかにされている。蚊の飛翔範囲の推定はほとんどの場合、吸血のために探索飛翔する個体を用いて行われており、アカイエカに関する移動分散範囲の推定も未吸血の成虫を使って行われている。しかし、吸血に成功した個体はその後の数日間に起こる卵巣の発育と産卵を無事に経過するために好適な場所に移動する。蚊媒介性病原体の感染拡大を考える場合、感染者から吸血して病原体を取り込んだ蚊がどの程度の範囲まで分散していくかという空間的な広がりも重要である。したがって、従来行われている吸血飛来個体の飛翔範囲だけでなく、吸血に成功した個体の移動分散に関する情報も加味して、防除対策の実施範囲や献血制限範囲を決定するべきである。本研究は吸血したアカイエカが、その後どの程度の範囲まで移動するかを目的として行った。

B.研究方法

ヒトスジシマカの移動分散範囲の推定：成虫の寿命と1日当たりの移動距離をマーキング実験によって求め、その積によって分散範囲の推定を行った。

吸血飛来成虫の平均余命：東京都立林試の森公園で6月から11月の期間にヒトスジシマカの人囿採集を行った。採集されたヒトスジシマカの雌成虫を持ち帰り 26.5 ± 0.1 °C、相対湿度 $58 \pm 0.9\%$ 、16時間日長に

調節した飼育室で飼育し、すべての個体が死亡するまで死亡日と死亡個体数を毎日記録した。この調査結果に基づいて、野外捕集蚊の実験室内における平均余命を求めた。

マーキング実験による移動距離の測定：ヒトスジシマカが1日の間に動き回る範囲を知るために、1個体ずつ異なるマークを付けて放逐し、複数の採集場所で再捕獲を継続して行って、個体ごとに動いた軌跡を調べた。個別マークは、左右の翅それぞれに3か所、合計6ヶ所に、マジックペンで印をつけて行った。2012年7月24日から8月2日に感染研の構内とその周辺で合計199頭のヒトスジシマカを採集しマークして放逐したが、再捕獲された個体数がわずかに3頭と少なく、分析できるデータが得られなかった。そのため、同様の方法によって1990年に長崎市の市街地に隣接した林内で実施した調査結果から、44個体の再捕獲データを取り出して分析を行った。

胸部への個体識別マーキング法の検討：翅にマークを行うことによるダメージが大きいと考え、ダメージが小さく抑えられる方法として胸部背面にマークする方法を検討した。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、この上にクロロフォルムで軽く麻酔した蚊を乗せた。胸部背面5ヶ所に塗料でマークを付けた。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。

野外における個体識別マーキング調査：

2013年3月17日から3月27日の期間、石垣島の住宅街でマーキング実験を行った。実験地として住宅や商店、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。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し、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。

アカイエカの吸血個体の移動分散に関する研究：本研究では野外で既に吸血した個体を採集し、その個体が保持していた動物血液からDNAを抽出し、吸血源となった動物を推定して、その動物のいた場所と採集場所の距離を吸血した蚊の移動分散距離の推定に用いることを考えた。分析に用いたサンプルは上野動物園で2009年に採集されたアカイエカの吸血蚊である。吸血蚊の腹部からDNAを抽出し、脊椎動物のミトコンドリアDNA16SrRNA遺伝子（16SrRNA）

を標的とした PCR を行い、増幅産物の塩基配列を決定して GenBank に登録されている塩基配列データと比較した。動物園で飼育されており、吸血場所の特定が可能なケースについて、吸血個体の採集場所と吸血源となった飼育動物の飼育場所の距離を地図上で測定した。

C. 研究結果

ヒトスジシマカの移動分散範囲の推定：

野外で採集されたヒトスジシマカの飼育室における平均余命には、調査した月によって大きな変動がみられた。最も短かったのは 9 月の採集雌で 13.8 日、最も余命が長かったのは、6 月の採集蚊で平均 40.8 日だった。

長崎市の林で行ったマーキング実験では、合計 856 雌に個別のマークをつけて、林の中に放逐した。林内の 10 か所で再捕獲と再放逐を 15 日間繰り返した。放逐後に、2 回再捕獲された個体のデータが 44 組えられた。各個体について再捕獲された 2 ケ所の採集場所の直線距離を移動距離として、1 日の平均移動距離を推定した。その結果、1 日当たりの平均移動距離は、 10.1 ± 10.6 m、最大移動距離は 44 m であった。

石垣島の住宅街では調査期間中にヒトスジシマカ 309 個体が採集された。このうち個体識別マークを行って放逐した個体数は、232 個体で、再捕獲されたのは 43 個体（うち 5 個体は 2 回再捕獲）、再捕獲率は 0.21（48/232）であった。

採集場所ごとに再捕獲率を求めて表 1 に示した。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有意に高かった。

4 ケ所の採集場所間についてマーク虫の

動きを表 2 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 3, 2, 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 2 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なかっ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 1 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。

放逐された個体が再捕獲された 48 例について、再捕獲するまでに要した日数を求めたところ、最長 8 日、最短 1 日で、平均

は 2.5 ± 1.7 日であった (表 3)。再捕獲された 48 例のうち同じ場所で再捕獲された例は 31 例だった。これらを除外して、放逐された場所とは異なる場所で再捕獲された例について分析したところ、再捕獲までに要した日数は 2.8 ± 1.8 日、再捕獲された場所までの距離は平均 69 ± 22 m であった。また、各個体について 1 日当たりの移動距離を計算して、17 例について平均移動距離を求めたところ、 35 ± 22 m であった。また、観察された 1 日の最長移動距離は 92 m であった。

本研究で観察された最長余命 40.8 日と 1 日当たり最長移動距離 92 m の積として、“最大”分散範囲を推定すると、 $40.8 \times 92 = 3,753.6$ m であった。

アカイエカ吸血個体の移動距離の推定：

アカイエカの吸血源動物と推定された動物のリストを表 4 に示した。分析に用いた 131 個体のうち 54 個体では DNA の増幅が見られず同定できなかった。DNA の塩基配列の類似性 (99% 以上) によって種類が同定されたのは鳥類 17 種、哺乳類 5 種であった。これらの吸血源動物のうち飼育場所が 1 ヶ所に限られ移動距離が推定できたのは、9 ヶ所で飼育されている 15 種類であった。

採集された吸血蚊は保持している血液の量と状態によって、Full-fed, Partial-fed, half-gravid, Gravid の 4 種類に分類した。Full-fed は新鮮な血液を満腹に吸った個体、Partial-fed は新鮮な血液を少しだけ吸った個体、half-gravid は血液を消化中で腹部が部分的に黒色を呈する個体、Gravid は完成卵を持つ個体で腹部白くて卵で膨らんでいる個体である。新鮮な血液を持った個体の平均移動分散距離は 30.6 m および 66.7 m で 40

m 以内の個体が多い。これに対して完成卵を持った個体は 350 m を移動しており、血液を消化中の個体は 10 m から 350 m まで移動距離は様々であった。

これらの結果から、吸血したアカイエカは卵を成熟させ産卵するまでの期間 (ふつう 3~4 日間) に、少なくとも 350 m の距離を移動すると推定された。

D. 考察

ヒトスジシマカの動きが生息場所の植生に強く影響されていることは多くの研究で報告されている。我が国の場合、都市域であっても緑地や公園が散在し、これらがヒトスジシマカの潜伏場所を提供している。したがって、都市域であってもヒトスジシマカの分散範囲を推定するとき、緑地や茂みの空間分布を考慮することが大切である。

本研究で示されたように、ヒトスジシマカは好適な茂みへ移動して、そこに留まる傾向がある。長崎市の林の内部で行われたマーキング実験で求められた 1 日の移動距離は平均 10.1 ± 10.6 m、最長 44 m であった。これに対して、石垣島の住宅街の場合、1 日の平均移動距離は 35 ± 22 m、観察された 1 日の最長移動距離は 92 m であった。これらの結果は、ヒトスジシマカが好適な林の中に留まる傾向があるため、1 日の移動距離は林の中では短く、緑地が点在するような住宅街では長くなることをはっきり示している。

ヒトスジシマカの分散範囲は好適な茂みがあれば狭くなり、好適な茂みがなければ広がると予想される。分散範囲を 1 日の移動距離によって推定する場合、もうひとつの重要なパラメータは、成虫の寿命である。本研究の調査では、吸血のために飛来

する成虫の平均余命は、最短 13.8 日、最長 40.8 日であることが示された。

献血制限に関わるヒトスジシマカの移動分散範囲の推定は、通常行われる平均値に基づく推定ではなく、いわゆる過大推定である方が適切である。したがって、本研究で観察された最長余命 40.8 日と 1 日当たり最大移動距離 92m を掛け合わせて得られた、3,753.6m を“最大”分散範囲とするのが妥当だろう。

アカイエカは吸血後 3~4 日で卵を成熟させ産卵する。この期間中にはまったく吸血せず、水分や糖分の補給を行う以外は潜伏に適した場所に留まっていると考えられてきた。しかしながら、本研究の結果に示されているように、実際には卵巣を发育させながら、あちこちの潜伏場所を転々と動き回っていると思われる。完成卵を保持している Gravid 個体は 350m 離れた場所から移動した個体しか得られなかったが、これは技術的な制約のためと思われる。Gravid 個体の場合、動物血液はほとんど消化されているため、血液残渣から DNA が増幅される例は少ない。そのため、仮に近い距離から移動してきた Gravid 個体が採集されていたとしても、吸血源動物が同定できなかった可能性が高い。

過去に推定された吸血のために飛来するアカイエカの移動範囲 1.2km と本研究で推定された吸血後の移動距離 350m をどのように総合するかという問題については、今後の生態学的な検討を要する。これらの推定値を単純に合計した 1.55km という移動分散範囲は、もっとも単純な考えであり、献血制限範囲に関するひとつの科学的根拠となりうるだろう。

E. 結論

献血制限に関わるヒトスジシマカの“最大”分散範囲を、野外調査により得られた成虫の最長余命 40.8 日と 1 日当たり最大移動距離 92m の積によって、3,753.6m と推定した。

吸血後のアカイエカの移動分散距離が少なくとも 350m と推定された。吸血源動物の探索のために動き回る範囲の推定値 1.2km と吸血後の移動距離を加算した 1.55km という値は、献血制限範囲に関するひとつの科学的根拠を与えると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda, Y. and Kim, K.S. 2012. Ecology of mosquitoes inhabiting a park in urban Tokyo, Japan: density of biting *Aedes albopictus* and laboratory estimation of the residual longevity. *Medical Entomology and Zoology* 63: 223-230.

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

表 1 . マーク放逐されたヒトスジシマ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		
	再捕獲数	放逐数	再捕獲率
Site A	8	54	0.15
Site B	10	25	0.40
Site C	26	125	0.21
Site D	4	28	0.14
Total	48	232	0.21

表 2 . 4 つの採集場所間で観察されたヒトスジシマカ（マーク虫）の動き

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

表 3 . 再捕獲されたヒトスジシマカの再捕獲までの日数、再捕獲された場所までの距離、1 日当たりの移動距離

	平均	標準偏差	最大	最小	観察数
すべての再捕獲個体					
再捕されるまでに要した日数	2.5 日	1.7	8 日	1 日	48
異なる場所で再捕獲された個体 :					
再捕されるまでに要した日数	2.8 日	1.8	7 日	1 日	17
再捕獲場所までの距離	69m	22	95m	48m	17
1 日当たり移動距離	35m	22	92m	8m	17

表 4. 上野動物園で採集された吸血したアカイエカの吸血源動物の同定結果と飼育場所と採集場所の位置関係から推定した移動距離

吸血源動物	サンプル数	移動距離* (m)
鳥類 (合計)	57	
サンカノゴイ <i>Botaurus stellaris</i>	16	10
オグロヅル <i>Grus nigricollis</i>	6	130
アオサギ <i>Ardea cinerea</i>	5	10
ハシブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	5	
ケーブペンギン <i>Spheniscus demersus</i>	4	170
ホオカザリヅル <i>Bugeranus carunculatus</i>	3	130
オオワシ <i>Haliaeetus pelagicus</i>	3	40
スズメ <i>Passer montanus</i>	3	
イヌワシ <i>Aquila chrysaetos</i>	2	40
ネパ - ルワシミミズク <i>Bubo nipalensis</i>	2	40
シジュウカラ <i>Parus major</i>	2	
チョウゲンボウ <i>Falco tinnunculus</i>	1	40
ハゲトキ <i>Geronticus calvus</i>	1	
ハゲワシ <i>Gyps africanus</i>	1	
ソリハシセイタカシギ <i>Recurvirostra avosetta</i>	1	
フクロウ <i>Strix uralensis</i>	1	40
アフリカクロトキ <i>Threskiornis aethiopicus</i>	1	90
哺乳類 (合計)	20	
ウシ <i>Bos taurus</i>	15	350
ユーラシアカワウソ <i>Lutra lutra</i>	2	60
ニホンザル <i>Macaca fuscata</i>	1	210
タヌキ <i>Nyctereutes procyonoides</i>	1	100
ホッキョクグマ <i>Ursus maritimus</i>	1	
同定不可	54	
合 計	131	

*飼育場所と採集場所の直線距離によって推定した。

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

デングウイルス感染による宿主側応答の解析
Flap 付加プライマーによる節足動物媒介性ウイルスゲノムの増幅とその応用
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)

蚊によって媒介されるデングウイルスは熱帯・亜熱帯地方で、ウエストナイルウイルスは北米を中心に毎年多くの患者が発生している。これらのウイルスは現在日本には存在しないとされるが、いつ日本に侵入してきてもおかしくない状況である。さらに両ウイルスは感染ヒト血中で比較的高いウイルス血症を呈することから、輸血や臓器移植の際には注意を要する。本事業において我々は献血者や血液製剤がこれらのウイルスに感染しているか否かを判断するための新規方法を開発するための基礎データを得ること目的とし研究を進めてきた。

本研究期間中の成果として、1) マイクロアレイ解析により、日本脳炎ウイルス感染よりもデングウイルス感染の方でより顕著に誘導される遺伝子を抽出した。2) 1)で抽出された遺伝子の1つである補体成分の一つである C1s の誘導についてより詳細に解析した。3) Flap RT-PCR 法が、デングウイルス特異的プライマーでは効果的でない一方で、フラビウイルス共通プライマーやアルファウイルス共通プライマーでは効果的である場合が多いことがわかった。4) Flap RT-PCR 法により、ブタ血清から増幅させた日本脳炎ウイルス溶液中のゲタウイルスを検出し、さらに詳細な遺伝子解析を行った。5) ウエストナイルウイルス NS1 検出系開発に向けた NS1 蛋白の哺乳動物細胞を用いた大量発現系を確立し、NS1 を精製した。

A. 研究目的

米国において輸血や臓器移植によるウエストナイルウイルス感染例が報告されていることから、移植組織におけるフラビウイルス検査は非常に重要である。ウエストナイルウイルスと同じフラビウイルス属に属するデングウイルスは、デング熱およびデング出血熱の原因ウイルスである。世界 100 か国以上で年間数千~1 億人がデングウイルスに感染し、患者数は 4 千万人以上に上

り 2 万人が死亡していると推定されている。デングウイルスは 1~4 型の 4 種の血清型群からなり、ときに以前と異なる型のデングウイルスに感染した場合に、より重篤度の高いデング出血熱に至る可能性が高くなる。これは中和能のないあるいは弱い抗デング抗体により引き起こされる抗体依存的感染増強が主要因と考えられている。ウエストナイルウイルスおよびデングウイルスはともに蚊によりヒトに伝搬される。

これらのウイルスは現在日本には存在しないとされるが、感染蚊、感染動物、あるいは感染したヒトを介して何時日本に侵入してきてもおかしくない状況である。さらに両ウイルスは感染ヒト血中で比較的高いウイルス血症を呈することから、輸血や臓器移植の際には注意を要する。本事業において我々は、献血者や血液製剤がこれらのウイルスに感染しているか否かを判断するための新規方法を開発する上での基礎データを得ること目的とし、1) デングウイルス感染による宿主側応答の解析、2) 高感度ウイルスゲノム検出法の検討、3) 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を行ってきた。

B. 研究方法

1) 感染細胞中の遺伝子動態の変化は DNA マイクロアレイ法によりおこなった。ヒト肺癌由来細胞 A549 細胞およびマウス肺癌由来細胞 Hepa 1-6 細胞にデング 1 型ウイルス (NIID02-20 株) および日本脳炎ウイルス (Mie/41/2002 株) を multiplicity of infection が 2 になるように感染させた。感染後 24、48、72 時間後に細胞を回収し全 RNA を抽出した。得られた RNA について、3D-Gene system によりマイクロアレイ解析を行った (マイクロアレイ解析は東レ株式会社に委託した)。得られた遺伝子発現データについてクラスター解析等を行った。また両ウイルス感染細胞での発現上昇が顕著であったものを抽出し、ウイルス間および細胞間で比較した。ヒト A549 細胞において、デングウイルス感染でより顕著な発現上昇が観察された遺伝子 C1s については、新たに遺伝子増幅用プライマーを作製しリアル

タイム RT-PCR 法により発現変化を確認した。さらに培養上清中の C1s は抗 C1s 抗体を使用してウエスタンブロット法により検出した。A549 以外のヒト由来細胞として、ヒト肺癌由来 Huh-7 細胞を使用した。他の血清型のデングウイルスとして、デング 2 型ウイルス (Hu/OPD030NIID)、デング 3 型ウイルス (CH53489)、デング 4 型ウイルス (TVP360) を使用した。ヒト A549 細胞において、日本脳炎ウイルス感染に比べデングウイルス感染でより顕著な発現上昇が観察された遺伝子 C1s について、新たに遺伝子増幅用プライマーを作製しリアルタイム RT-PCR 法により発現変化を確認した。さらに培養上清中の C1s は抗 C1s 抗体を使用してウエスタンブロット法により検出した。日本脳炎ウイルスについてはこれまで使用してきた Mie/41/2002 株に加え、中山株および Mie/40/2004 株も用いた。またウイルス感染細胞としてヒト肺癌由来細胞 A549 株に加え、ヒト単球系細胞 THP-1 細胞も使用した。

2) Flap RT-PCR 法は Afonina らの報告(2007)を参考にした。具体的には従来我々が使用してきたデング 1 型ウイルス検出用プライマー (Ito et al., 2004) の 5'末端側に非ウイルス由来ヌクレオチドを 12 塩基 (Flap 配列: 5'-AATAAATCATAA-3') 付加した。鋳型にはデング 1 型ウイルス (NIID02-20 株) を A549 細胞に感染させたのちの培養上清から回収したウイルスゲノム RNA を使用した。また RT-PCR は SYBR Green I を用いた方法によりおこなった。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Flap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。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) 2万以上のプロープを用いたDNAマイクロアレイ解析により、両ウイルス感染細胞

中における遺伝子発現プロファイルを得ることができた。クラスター解析により変動の大きかった遺伝子を分類した。変動の見られた遺伝子および変動の大きさはHepa1-6細胞よりもA549細胞で顕著であった(図1)。顕著な増加を示した遺伝子は、1) インターフェロン応答・関連遺伝子(OAS, Mx, ISGs, IFITs, IFIs, IRFs)、サイトカイン・ケモカイン、TREM/TRIM、STAT、RIG-Iなどであった。これらの遺伝子の多くは、日本脳炎ウイルス感染細胞の方が早く誘導されてきたが、異なるパターンを示す遺伝子も見られ、それほど単純ではないことが明らかとなった。日本脳炎ウイルス感染よりもデング1型ウイルス感染でより顕著に発現上昇が観察された遺伝子を抽出した(図2)。筆頭のPLAT(tissue plasminogen activator; tPA)はすでにデングウイルス感染ヒト上皮細胞から分泌されることが明らかとなっており、さらにデング感染症の重症化過程で血清中のPLAT量の明らかな増加が観察されている。2番目に顕著であった補体因子C1sについてはリアルタイムRT-PCR法により確かにRNAレベルで発現量の上昇がみられることを確認した。同様の結果は別のヒト細胞(Huh-7)でも確認された。さらに発現上昇は蛋白質レベルでも確認された。次にC1sの誘導が今回用いたデング1型ウイルス株に特異的でないことを証明するため、他の血清型群のデングウイルスについてもリアルタイムRT-PCR法およびウエスタンブロット法により調べた(図3)。先のデング1型ウイルスでの結果と同様にC1sのRNAレベル、蛋白質レベルでの発現誘導が確認された。C1sが同じフラビウイルスでも日本脳炎ウイルス感染で

はほとんど発現誘導されず、デングウイルス感染で誘導されるのかは不明である。そこで両ウイルスで増殖速度が異なることが原因である可能性を疑い、日本脳炎ウイルス株の中でもプラーク形成が極度に遅い中山株を使用し C1s 遺伝子の誘導を RT-PCR 法及びウエスタンブロッティング法で調べた。すると RNA レベル、蛋白質レベルで C1s の発現誘導が確認された。次にこれまで使用してきた日本脳炎ウイルス株 Mie/41/2002 株とこれと近縁の Mie/40/2004 株を使用し、これまでよりも 10 倍以上低い multiplicity of infection (MOI) で感染させ、C1s 遺伝子の発現を観察した (図 4)。するとデングウイルス程ではないものの明らかな C1s 遺伝子の発現誘導が確認された。実際ヒトなどにデングウイルスが感染する場合、その主な標的細胞は単球系の細胞と考えられている。さらにこれらの細胞は Fc レセプターを発現していることから、デング重症化の原因の一つとされる抗体依存性感染増強 (ADE) 時の主標的と考えられている。そこでヒト単球系細胞株 THP-1 にデングウイルスを感染させたときの C1s 遺伝子の発現を調べた。また感染時に感染増強抗体 (4G2) を加えた。増強抗体を加えないと THP-1 中ではデングウイルスはほとんど増えないことが明らかとなった。デングウイルスが増殖できても C1s の特異的な発現上昇は観察されなかった。

2) 通常使用しているウイルス遺伝子検出用プライマーに 12 塩基の非ウイルス由来配列 (Flap 配列) を連結すると、検出感度および増殖量が顕著に増加するとの報告がされた (Afonina, I. et al., *Biotechniques* 43: 770-774, 2007) この報告ではエンテロウイ

ルスおよび水痘ウイルスで感度・増幅量が改善している。そこで我々が保有し、通常ウイルス検出用に使用しているプライマーに Flap 配列を連結した新たなプライマーを合成し、SYBR Green I を用いた RT-PCR 反応を行い従来のプライマーや、ややウイルス特異的配列を短縮したプライマーとの間で増幅感度・増幅量を比較した (図 5、6)。今回 5 パターンについて増幅したが、これまで使用してきたプライマーが最も高感度であった。次に 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 (図 7)。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 (図 8)。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。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、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、他のゲタウウイルスと比較した(図9)。すでに完全長の明らかになっているゲタウウイルス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 pCAGGS 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(図10)。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) 今回の研究により、デングウイルス感染により遺伝子発現が変動する遺伝子群を網羅的に抽出することに成功した。顕著発現上昇の見られた遺伝子のほとんどは、すでにインターフェロンにより誘導されること

が明らかな遺伝子であった。これらについてはすでに報告もあり、今回はそれ以上の解析対象とはしなかった。今回はヒト A549 細胞とマウス Hepa 1-6 細胞を用いたが、ヒト細胞の方が、発現が変動する遺伝子の数および変動の大きさが大きかった。これは、A549 細胞の方が両ウイルスの感染・増殖が良いためだと考えられる。また多くの遺伝子で日本脳炎ウイルスの方がデング 1 型ウイルスよりも発現変動が早いかつ大きかった。これは日本脳炎ウイルスの方がデング 1 型ウイルスよりも増殖速度が速いためと考えられる。そのような状況の中でも、デング 1 型ウイルス感染の方がより発現上昇が顕著であった遺伝子も見出された。これらのうちで最も顕著であった PLAT については、すでにデング熱患者でもその上昇は報告されていることから、今回の解析で新たな因子を見出せる可能性があるものと期待している。次いで顕著であった補体因子 C1s については、他の血清型群のデングウイルス株でも誘導が確認された。最近の論文では、補体因子がデング感染症において重要な役割を果たしている可能性が示唆されており、C1s もデングウイルスがコードする非構造蛋白質 NS1 と相互作用し、ウイルス感染による補体経路の活性化に干渉しているとの報告もある。しかし本当に C1s の発現誘導が日本脳炎ウイルスではほとんど起こらないのかを調べるため、プラーク形成が遅い(つまり細胞変性が弱い)中山株を使用して C1s の発現を観察したところ、誘導させることがわかった。さらにこれまでに使用してきたウイルスも、MOI を 10 倍以上に下げれば、C1s の誘導が起こることが明らかとなった。これより、in vitro

では日本脳炎ウイルスのような増殖速度が速いウイルスでは C1s が誘導される前に細胞変性により誘導が抑えられている可能性が示唆された。つまり C1s の誘導は本質的にデングウイルスに特異的な現象でないことが明らかとなった。一方、感染個体内でのデングウイルスの主要標的細胞と考えられている単球系細胞に由来する株化細胞 THP-1 細胞を使用して C1s の発現誘導を調べたが、誘導は確認されなかった。この原因としては、この細胞でのデングウイルス複製効率が非常に悪いことが(放出される感染性ウイルス粒子量が A549 細胞の約 1000 分の 1)考えられる。補体因子はデング感染症の悪性化に関与するとの報告がある。実際のデング患者血中での C1s の量などに関する報告はないが、この研究が端緒となり、そのような解析がされることを望んでいる。また今後は他の誘導蛋白質について詳細な解析を行う予定である。

2) 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。本研究では、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 法デングウイルス特異的プライマーを用いて試みた。しかし結果は従来法に勝るどころか、少々劣る結果となった。また他のウイルス(ポリオーマウイルス)でも同様の結果であったとの話を聞いている(私信)。この方法はすでに条件としてほぼ最適化されているものには適当でないのかもしれない。次に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当てて 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

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 種では変化なしもしくは悪化した。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。今回の実験ではさらに、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であり、ゲタウイルスがマジョリティ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。今後はブランク形態や、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) DNA マイクロアレイ解析により、日本脳炎ウイルス感染よりもデングウイルス感染の方がより顕著に誘導される遺伝子を抽出することに成功した。しかしその一つである補体成分 C1s の誘導が感染条件や株によっては日本脳炎ウイルス感染によっても誘導されることが明らかとなった。
- 2) Flap 配列をデングウイルス特異的プライマーに付加した場合は効果的でなかったが、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付加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。また Flap 付加アルファウイルス共通プライマーを使って、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

1. Kato, F., Kotaki, A., Yamaguchi, Y., Shiba, H., Hosono, K., Harada, S., Saijo, M., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S. Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR. *Virus Genes* 44: 191-197, 2012.
2. Yamaguchi, Y., Nukui, Y., Kotaki, A., Sawabe, K., Saijo, M., Watanabe, H., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S. Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein. *Journal of General Virology* 94: 90-96, 2013.
3. 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 Getahvirus 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。「日本脳炎ワクチンの品質管理」臨床とウイルス 第40巻第5号: 297 - 305, 2012.
2. 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

国際学会

1. Yamaguchi, Y., Kotaki, A., Sawabe, K., Watanabe, H., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S. Effects of a single amino acid

substitution (S123N) of the Japanese encephalitis virus E protein on its growth in vitro. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Japan. Sept., 2011.

国内学会

1. 左一八、田島茂、高崎智彦、倉根一郎、森田公一、鈴木隆: 病原性の異なる日本脳炎ウイルス株の硫酸化糖鎖認識 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会 金沢 2011年5月
2. 鎌田龍星、星野啓太、伊澤晴彦、田島茂、高崎智彦、佐々木年則、小林睦生、沢辺京子: イエカ属蚊の初代培養 第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 東京 2011年11月
3. 山口幸恵, 小滝徹, 新井智, 沢辺京子, 倉根一郎, 西條政幸, 高崎智彦, 田島茂. 非構造蛋白質 NS4A に着目した日本脳炎ウイルスの分子疫学的解析. 第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 熊本, 2012年5月
4. 田島茂, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. デングウイルスおよび日本脳炎ウイルス感染細胞における細胞側遺伝子発現動態の網羅的解析. 第19回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 大阪, 2012年11月
5. 田島茂, 山口幸恵, 小滝徹, 新井智, 沢辺京子, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. 日本脳炎ウイルス NS4A の分子疫学的解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012年11月
6. 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

7. 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．

発現上昇遺伝子 TOP 30

A549						Hepa 1-6						
D1 24h	D1 48h	D1 72h	JEV 24h	JEV 48h	JEV 72h	D1 24h	D1 48h	D1 72h	JEV 24h	JEV 48h	JEV 72h	
-	MOG	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	1	KOOS-30	000000000	k	IFIT5	IFIT5	IFIT5
OSAN20	IFIT2	OASL	OASL	OASL	OASL	5	Phox2b	Utrn3	D1476596	D1476596	D1476596	D1476596
REMYND	IFIT1	IFIT1	IFIT1	IFIT1	OCL4L1	3	Alysd	Asot5	Myo8	IKZF5	Oas5	Mpl1
IFIT32A	OASL	MOG	IFIT1	IFIT2	OCL4L1	4	Myom	Chap5	D100007396	D100007396	-	Oas5
MOG	IFIT1	IFIT2	IFIT2	IFIT4	IFIT2	5	Sec22-1	Asah	-	IKZF1	Oas5	IFIT5
OASL	IFIT2	IFIT1	IFIT4	OCL4L1	IFIT1	6	Sec22-2	CH1241	Chp5	-	Trna50	Oas5
CH1241	NP-957562	IFIT5	MOG	OCL4L1	CH1241	7	Chp	Sec22-5	Oas5	Chp5	Myo8	-
IFIT1	IFIT5	NP-957562	-	IFIT1	IFIT4	8	Stac	Gsh4	Trna30	Oas5	D100007396	Trna30
STOH1	IFIT5	IFIT5	OCL4L1	CH1241	OCL4L1	9	Ad4	D1476596	-	Chp5	IFIT5	Myo8
IFIT1	IFIT5	IFIT4	IFIT5	OCL4L1	IFIT1	10	Phox2b	-	Sec22-6	Myo8	Chp5	Oas5
MOG	IFIT2	IFIT2	IFIT5	IFIT5	OCL4L1	11	PPP4R3C	000000000	-	Tap4	Myo8	OCL4L1
IFIT3-1	IFIT4	CH1241	IFIT5	-	IFIT5	12	Chp10	CH1241	Myo8	Trna50	IFIT5	Myo8
IFIT5	NP-957562	IFIT5	IFIT5	OCL4L1	IFIT5	13	Chp10	D100007396	Myo8	Myo8	Myo8	Myo8
CH1241	OCL4L1	OCL4L1	IFIT5	OCL4L1	IFIT5	14	CH1241	000000000	k	IFIT5	IFIT5	OCL4L1
IFIT5	OCL4L1	OCL4L1	IFIT5	OCL4L1	IFIT5	15	Myo8	IFIT5	Myo8	Oas5	OCL4L1	D100007396
IFIT5	IFIT5	IFIT5	OCL4L1	IFIT5	OCL4L1	16	IFIT5	Chp5	Trna30	Oas5	IFIT5	IFIT5
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	17	-	Gsh4	-	-	Myo8	Oas5
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	18	Phox2b	Oas5	IFIT5	-	-	Chp5
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	19	Myo8	IFIT5	Myo8	Myo8	Myo8	IFIT5
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	20	OCL4L1	Chp5	Chp5	IFIT5	IFIT5	-
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	21	Myo8	Myo8	Myo8	Myo8	Myo8	IFIT5
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	22	Myo8	Chp5	IFIT5	Myo8	Myo8	IFIT5
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	23	Myo8	Sec22-30	Trna50	Trna50	Myo8	Myo8
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	24	CH1241	IFIT5	-	Oas5	Trna50	Myo8
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	25	Myo8	Chp5	Gsh4	Myo8	Myo8	Myo8
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	26	Myo8	Myo8	OCL4L1	-	-	IFIT5
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	27	-	Phox2b	OCL4L1	Myo8	Myo8	Myo8
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	28	Myo8	Oas5	Chp5	IFIT5	IFIT5	IFIT5
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	29	Chp5	Trna50	Trna50	Myo8	Myo8	OCL4L1
IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	IFIT5	30	-	IFIT5	Trna50	-	-	-

図1 マイクロアレイ解析により明らかとなった発現上昇遺伝子

DENV-1感染でのみ発現上昇が顕著であった遺伝子 (A549細胞)

Gene	D1 24h		D1 48h		D1 72h		JEV 24h		JEV 48h		JEV 72h	
	Ratio	up	Ratio	up	Ratio	up	Ratio	up	Ratio	up	Ratio	up
C11orf35*	5.8	**	35.4	***	22.0	***	1.0		0.8		0.8	
ELAT	2.9	*	30.8	***	14.7	***	0.8		0.8		1.0	
C15	1.1		5.0	**	13.9	***	0.8		1.5		1.7	
LGALS3BP	0.8		8.4	***	12.9	***	0.8		1.7		2.6	*
Conutabesemin precursor	1.0		6.4	**	10.5	***	0.7		0.9		0.9	
SMOCC1	1.0		5.2	**	10.5	***	0.8		1.1		1.8	
ITRM2	1.1		11.2	***	7.5	**	1.6		1.3		1.9	
TGM2	0.9		7.0	**	6.3	**	0.8		0.8		0.8	
NP_954500.1	1.0		12.6	***	13.9	***	1.5		2.8	*	3.9	*
ASS1	1.3		2.7	*	11.4	***	1.2		2.0	*	3.2	*
SP130	1.2		14.7	***	11.2	***	3.5	*	2.0		3.1	*
SNAP25	1.2		5.6	**	11.1	***	1.2		2.0		3.1	*
NM_130066	1.0		8.3	***	8.2	***	1.6		1.9		2.2	*
NP_060851.1	1.1		7.0	**	5.9	**	1.3		1.4		1.6	
OAS1	1.0		6.2	**	5.7	**	1.8		2.3	*	2.9	*
ENGR1	1.1		3.2	*	5.4	**	1.1		2.2	*	1.7	
CEHR1P	1.0		5.0	**	5.2	**	0.9		0.9		0.8	
TAP2HUMAN	1.1		6.4	**	5.0	**	1.1		1.7		1.8	
VIF1B	1.6		4.2	**	4.9	**	1.0		0.7		0.7	
LAP3	1.0		5.3	**	4.6	**	1.2		1.1		1.2	
ZNF138	1.5		3.5	*	4.6	**	0.7		0.7		0.6	
ADH4	1.2		2.8	*	5.3	**	0.7		0.7		0.5	
CD68	1.1		3.8	*	4.4	**	0.8		1.1		1.2	
FN1	1.1		3.4	*	4.2	**	1.0		1.6		1.4	
STAT1	0.8		4.8	**	3.9	*	1.0		1.0		1.6	
C-EB	1.2		7.4	**	11.4	***	1.6		3.8	*	4.7	**
GAPDH	0.9		0.8		0.5	?	0.7		0.5	?	0.2	?

* C11orf35のプロープはDENV-1と結合する可能性が高い。

図2 DENV-1感染でのみ発現上昇が顕著であった遺伝子 (ヒト細胞)

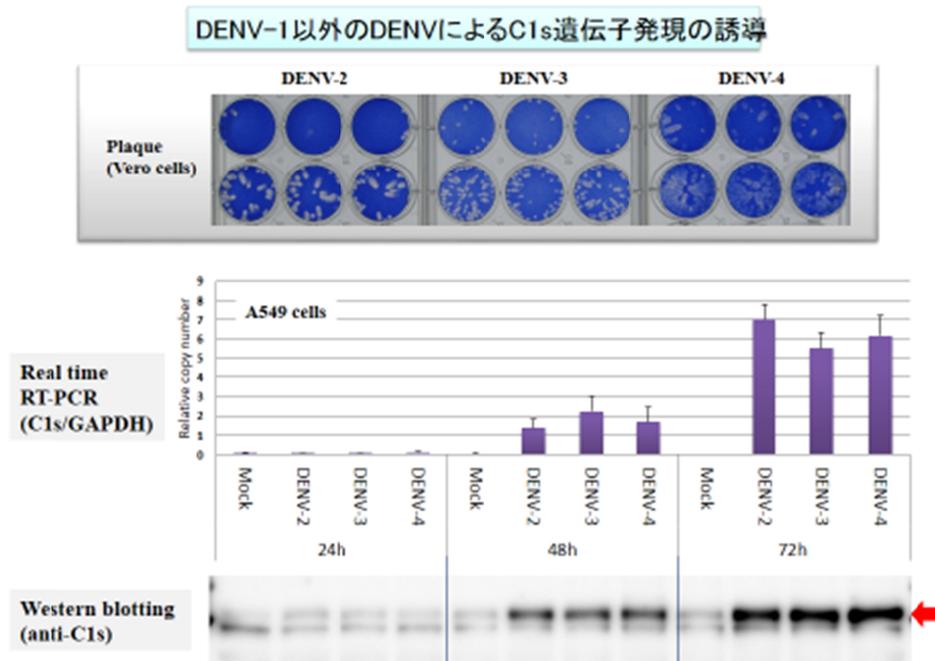


図3 DENV-1 以外の DENV による補体因子 C1s の発現誘導

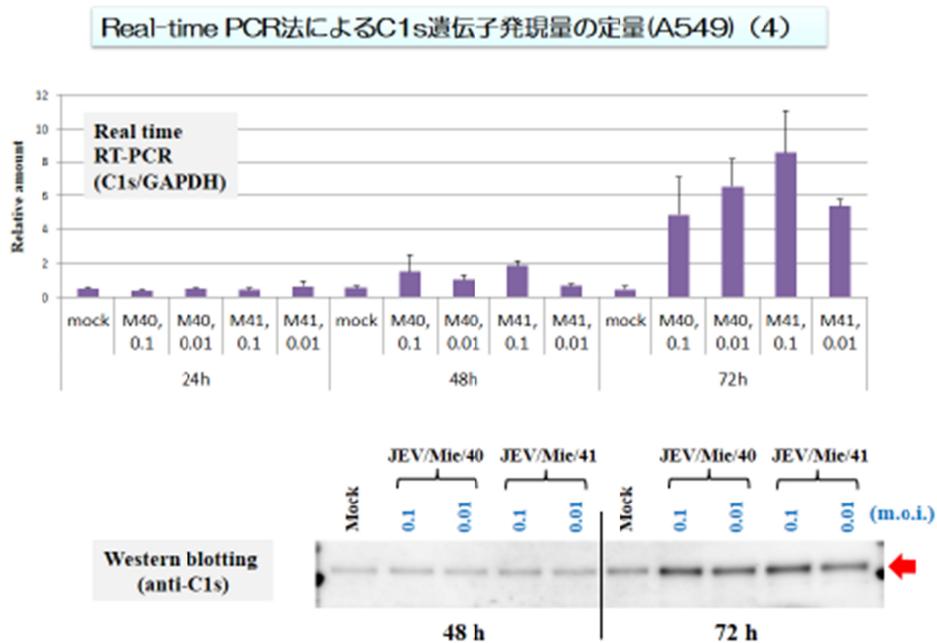
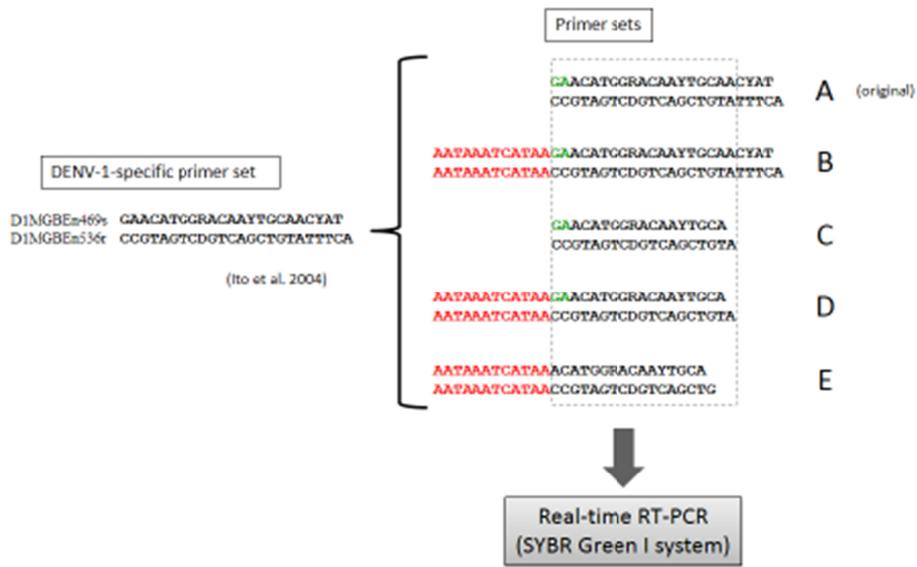


図4 日本脳炎ウイルスによる C1s 遺伝子発現誘導

1. デングウイルスゲノム検出用プライマーへの付加効果の検討



Template RNA: serially diluted ($10^1 \sim 10^4$) total RNA of DENV-1-infected A549 cells.

図5 デングウイルス特異的プライマーへの Flap 配列付加

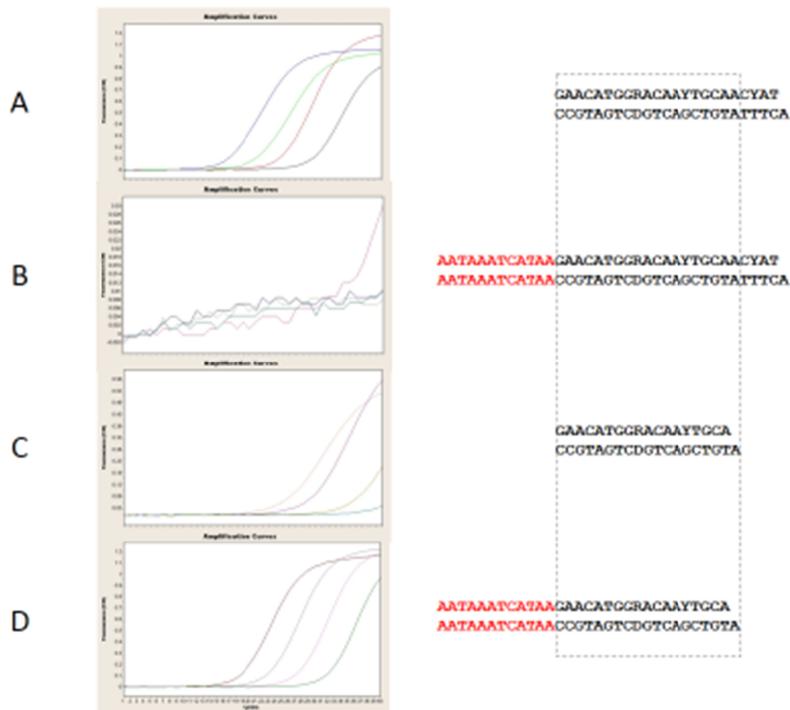


図6 Flap 付加デングウイルス特異的プライマーによる RT-PCR 結果

Summary
(Flavivirus-consensus primer sets)

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

図 7 Flap 配列付加フラビウイルス共通プライマーの検討結果

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 8 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)

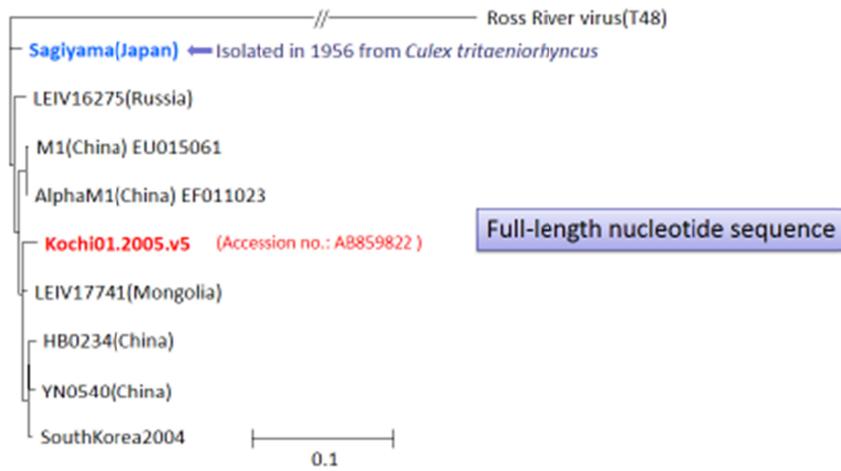


図9 GETV/Kochi/01/2005の完全長配列を使用した分子系統樹解析

ウエストナイルウイルスNS1蛋白質の発現と精製

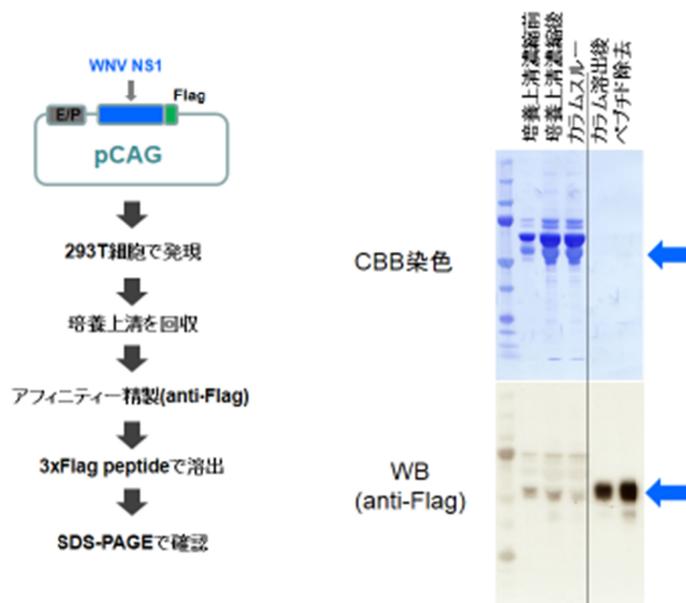


図10 ウエストナイルウイルス NS1 の発現と精製

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(1)	104-110	2013
Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsumabayashi 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.	19(5)	729-735.	2013
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 No. 1		2014
Tsuda, Y. and Kim, K.S.	Ecology of mosquitoes inhabiting a park in urban Tokyo, Japan: density of biting <i>Aedes albopictus</i> and laboratory estimation of the residual longevity.	Medical Entomology and Zoology	63	223-230.	2012
Kato, F., Kotaki, A., Yamaguchi, Y., Shiba, H., Hosono, K., Harada, S., Saijo, M, Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S.	Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR.	Virus Genes	44	191-197	2012

Yamaguchi, Y., Nukui, Y., Kotaki, A., Sawabe, K., Saijyo, M., Watanabe, H., Kurane, I., Takasaki, T., and <u>Tajima, S.</u>	Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein.	Journal of General Virology	94	90-96	2013
Imai, K., Maeda, T., Sayama, Y., M ikita, K., Fujikura, Y., Misawa, K., Nagumo, M., Iwat a, O., Ono, T., <u>Ku rane, I.</u> , Miyahira, Y., Kawana, A. a nd Miura, S.	Mother-to-child transmi ssion of congenital Cha gas disease, Japan.	Emerging Infectious Diseases.	20(1)	146-148	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
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。	シャーガス病における遺 伝子学的診断法の開発と 検討	臨床寄生虫学会 雑誌。	23号	41-45	2013
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	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	日本臨床寄生虫 学会誌	Vol.24-1- 33		2013