

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業

**血液製剤及び献血血の安全性確保と安定供給の
維持のための新興・再興感染症に関する総合的研究**

(H26-医薬A-一般-002)

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

平成 28 (2016) 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

血液製剤及び献血血の安全性確保と安定供給の維持のための新興・再興感染症に関する
総合的研究・・1

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所 所長）

II. 分担研究報告

1. バベシア感染の検査法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13

研究分担者：横山直明（帯広畜産大学 原虫病研究センター）

2. アカイエカの飛翔能力と行動範囲に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

研究分担者：澤邊京子（国立感染症研究所 昆虫医科学部）

3. ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応に関する研究・・・・・・・・・・・・23

研究分担者：平 力造（日本赤十字社 血液事業本部）

4. 血液製剤による *Leishmania* 感染予防のための研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27

研究分担者：岡田義昭（埼玉医科大学病院 血液・細胞移植部）

5. 日本脳炎ウイルス・ウエストナイルウイルス共通遺伝子高感度検出法の開発と評価・・35

研究分担者：高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

6. 輸血血液における Dengue ウイルスおよび HTLV-2 の検出法開発に関する研究・・・・39

研究分担者：大隈 和（国立感染症研究所 血液・安全性研究部）

7. 輸血用血液製剤における *Trypanosoma cruzi* 原虫の動態・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所 所長）

. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業

総括研究報告書

血液製剤及び献血血の安全性確保と安定供給の維持のための新興・再興感染症
に関する総合的研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所 所長）

研究要旨：

献血血の安全性確保と安定供給のため、シャーガス病、リーシュマニア症、パベシア症およびウエストナイル熱、デング熱等の蚊媒介性ウイルスを対象として検査法・スクリーニング法等の開発、及び媒介蚊に関する研究を行った。

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

ウエストナイルウイルスについて輸血用血液スクリーニング用の核酸増幅検査システムに関し、精度試験を行った。95%検出限界感度は 23.9copies/mL であった。日本脳炎ウイルス及びウエストナイルウイルス両方を検出する TaqMan PCR 法を開発した。デングウイルスの 4 血清型の高感度同時検出が可能な新規マルチプレックス PCR 法を確立した。本法は、特にこれまで困難であった血液中の微量な DENV の検出に有用である。ウイルス媒介蚊について、アカイエカ幼虫の空間分布を調べその分布様式を調べた。アカイエカ幼虫が発生している雨水マスは調査範囲内にランダムに分布しており、また産卵期のアカイエカの行動範囲は少なくとも 450 m × 350m であると推測された。飛翔距離については、アカイエカは 25℃では連続して 0.2 時間、約 100m しか飛翔しなかったが、15℃では 5 時間 4.5km 飛翔可能であることが示唆された。以上の研究により、献血血の安全性確保と安定供給に貢献するための科学的基盤を進展させた。

研究分担者：

大隈 和（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長）

岡田義昭（埼玉医科大学病院血液・細胞移植部 部長）

澤邊京子（国立感染症研究所昆虫医科学部 部長）

平 力造（日本赤十字社血液事業本部安全管理課長）

高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部 室長）

横山直明（帯広畜産大学原虫病研究センター 教授）

研究協力者：

倉光 球（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員）

佐竹正博（日本赤十字社中央血液研究所 所長）

佐山勇輔（日本赤十字社中央血液研究所）

田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官）

津田良夫（国立感染症研究所昆虫医科学部 研究員）

手塚健太（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員）

浜口 功（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長）

松本千恵子（日本赤十字社中央血液研究所）

A．研究目的

これまで日本に存在しなかった病原体（トリパノゾーマクルージ、リーシュマニア等の原虫やデングウイルスやウエストナイルウイルス等）の国内への侵入や、国内

に存在しても大きな問題とされなかった病原体（バベシア）等による、輸血を介した感染が問題となる。これらの病原体は、いずれも血液を介して感染することが報告されているが、現在わが国においては献血血についてこれらの病原体の検査はなされていない。これらの病原体による感染症が国内で発生した場合に備え、輸血用血液や血液製剤の安全性確保と安定供給のための検査法の開発と標準化、血液スクリーニング法の標準化を行う。さらに、現在患者診断のための検査が確立されている病原体についても、血液製剤の安全性確保のための、より感度の高い新検査法の開発や改良を行う。上記蚊媒介性ウイルスが国内に侵入した場合には、地域的な献血制限を考慮すべき状況も発生することから、媒介蚊の生態を把握することが献血制限区域を考える上で必須な情報となる。本研究は、以上のように、種々の病原体に関して、検査法開発や検査情報を科学的知見から検討することによって献血血の安全性確保と安定供給に貢献することを目的とする。

B．研究方法

1．輸血用血液製剤中におけるトリパノゾーマクルージ（*T. cruzi*）の動態

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

1) トリパノゾーマクルージ：

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

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

2) 白血球除去フィルターによる低減化能の解析：

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

3) 赤血球製剤における*T. cruzi*の動態解析：

輸血用血液製剤は異なる3名の献血者由来の赤血球液を用いた。培養した*T. cruzi*を各製剤へ接種後、4℃にて保管をおこなった。接種後0, 4, 7, 14, 21日経過時にそれぞれ一部採取したサンプルを段階希釈後、培養を行った。

4) 低温環境下における*T. cruzi*の増殖性および感染性の評価：

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

間接蛍光抗体法でamastigotesの観察を行った。

2. 血液製剤によるリーシュマニア感染予防のための開発

1) Leishmaniaの無鞭毛型原虫の培養法：

Leishmania donovani(以下 *L. donovani* と略)は10%FCS添加シウジョウバエ細胞培養液で25℃、炭酸ガス濃度5%で培養した。ヒト単球細胞株であるTHP-1にホルオールエステルを最終濃度100nMになるように添加し、24時間37℃で培養し、マクロファージ様細胞株を誘導した。MOI 10~20になるように鞭毛型原虫を添加し、37℃で培養した。感染1日後と3日後に培養液を交換し、鞭毛型原虫を取り除いた。感染5日後にTHP-1細胞とcell-freeの無鞭毛型原虫を集めた。

2) 血液製剤中での生存率の解析：

感染させたTHP-1細胞とcell-freeの無鞭毛型原虫をヒト血漿に添加し、赤血球製剤を想定して4℃で4週間保存、血小板を想定して室温で1週間保存、新鮮凍結血漿を想定して-20℃で2ヶ月冷凍保存した、採取した検体は、シウジョウバエ細胞培養液を用いて10倍ずつ段階希釈し、25℃、CO₂5%で4週間培養後増殖してくる鞭毛型原虫の有無を顕微鏡下に観察した。各希釈で増殖が観察できたウエル数を用いてウイルス感染価と同様にTCID₅₀を計算し、生存していた原虫数とした。

3) 白血球除去フィルターによるLeishmania原虫の除去効果の解析：

*L. donovani*をTHP-1に感染させ、感染後5日目のTHP-1とcell free無鞭毛型原虫を遠心で集め、ヒト血漿200mLに添加した。3mL

を白血球除去フィルター濾過前の検体として採取した。白血球除去フィルター濾過後の検体は、チューブやバッグに残存したが約185mL回収した。濾過検体は、そのまま感染価を測定、遠心してペレットの感染価を測定、100mLを遠心し、ペレットを1mLに溶解して感染価を測定、の3つの方法で感染価を評価した。

3. 変異型 CJD 発生動向：

変異型 CJD の発生状況を英国と WHO の CJD サーベイランスから経時的に評価した。2014 年のフランスの発生状況は 2013 年度からの増加数で評価した。

4. バベシア感染の検査法に関する研究：
バベシア症に対する迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を作製し、感度・特異性の確認と標準化、我が国および献血血液における抗体陽性状況および遺伝子陽性状況の調査開発するため、ICT および LAMP 法の確立をおこなった。

1) ヒト血清試料エール大学公衆衛生学部 Peter Kraus 教授より60検体のヒト血清の提供を受けたこれらの血清は、インフォームドコンセントを実行して得られており、非感染者血清10例、陽性血清49例、感染の有無が不明の1例を含んでいる。

2) *B. microti* 遺伝子増幅用のLAMPプライマーの設計：

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

3) LAMPの感度の検討：

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

4) ヒトDNAを用いたPCRとLAMPの検討：

B. microti 実験感染マウスモデル系を用いて、標的遺伝子の定量解析を行った。最初に、作製したプラスミドベクターを段階希釈し、コピー数を基にReal-time LAMPを行ってスタンダードカーブを作成した。次に *B. microti* をマウスに感染させ、経時的に血液を採取し、標的遺伝子の定量解析を行った。また、ヒトバベシア患者の血液を用いて、マウスモデル系と同様にReal-time LAMPを行い、標的遺伝子の増幅を検討した。

5. ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応に関する研究：

日本赤十字社では、平成26年8月1日採血分よりノバルティス社 (Grifolix 社) 製 PANTHER システムを全国8施設に導入した。同システムは、ウエストナイルウイルス (WNV) も測定可能であり、危機的状況下においてはこれまで以上に迅速かつ広域的な対策も可能となった。WNV 国内発生に備えている PANTHER 用試薬 (Procleix WNV ABD Assay : Novartis 社製)

の感度等について入手可能な非感染性の WNV 液を使用した感度試験等と実検体による特異性試験を実施した。

1) 感度試験：

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

(8重測定を3日間(回))した。

2) 特異性試験:

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

6. 日本脳炎ウイルス・ウエストナイルウイルス共通遺伝子高感度検出法の開発と評価

血液製剤及び献血血液の検査ではより広範囲に検出できる系が望まれることから日本脳炎ウイルスおよびウエストナイルウイルスを共通で検出できる系の開発をめざした。リアルタイム RT-PCR による JEV ゲノム検出のための鋳型には、日本脳炎ウイルス I 型株として Hiroshima/46/1998 株、Mie/41/2002 株、Mie/51/2005 株を、III 型株として JaTH160 株、JaTAn1/75 株、JaTAn1/90 株を、V 型株として Muar 株および E 領域組換え JEV rJEV-E^{Z0934}-M41 株を使用した。また GenBank から日本脳炎ウイルス、型遺伝子配列情報を取得した。さらにウエストナイル塩基配列も収集し、ウエストナイルウイルスも検出できる配列のプライマーおよびプローブを設計した。日本脳炎ウイルスの検出感度の評価は、型 3 株、型 3 株、型 2 株を用いて評価した。ウエストナイルウイルスの検出の評価は、NY99 株 (Lineage 1a)、Eg101 株 (Lineage 1a)、g2266 株 (Lineage 1c)、FCG 株 (Lineage 2) を用いて評価した。

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

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

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

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

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

2) DENV ゲノム RNA の精製:

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

3) 新規マルチプレックス PCR 検出系の構築:

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

8. アカイエカの飛翔能力と行動範囲に関する研究

産卵場所を探索する成虫の行動範囲について検討した。また、フライトミル (虫を固定し強制的に飛翔させる装置) を用いてアカイエカの未吸血雌成虫を飛翔させ、連続飛翔時間と総飛翔距離を算出し、コガタアカイエカと比較した。

1) 産卵期のアカイエカ成虫の行動範囲: 調査は、周囲を河川で囲まれた広さ 450

m × 750 m (面積約 133,000 m²) の庭園で実施した。幼虫の分布様式を分析するために、雨水マスが少なくとも 1 つある区画を対象として、区画当たりの平均幼虫発生雨水マス数 (m) とその分散 (s²) を算出し、分布の集中度指数 (s²/m) を求めた。

2) アカイエカの飛翔能力の評価:

フライトミルを用い、羽化後約 1 週間の未吸血の雌成虫を 15 長日あるいは 25 長日の温度条件下で飛翔させた。5 秒間に 3 回以上回転した回数のみを集計し、連続飛翔時間と総飛翔距離を算出した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる場合には、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を遂行した。

C. 研究結果

1. 輸血用血液製剤中におけるトリパノゾーマクルーゼの動態

1) 白血球除去フィルターによる *T. cruzi* の除去:

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

2) 赤血球製剤における *T. cruzi* の動態:

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

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

3) 低温環境下での *T. cruzi* の増殖性および感染性:

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

2. 血液製剤によるリーシュマニア感染予防のための研究

1) 血液製剤中での生存率:

4 °C 保存では、2 週間で 1 Log、3 週間で 2 Log 以上感染価は減少した。4 週間では感染価は検出感度以下に減少した。-20 °C 保存では、1~8 週間の何れでも感染性は確認できなかった。室温保存では、感染価の低下は認められなかった。

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

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

3. 変異型 CJD 発生動向

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

た。2000年に発生のピークがあり、第2次の発生ピークが危惧されているがその兆候は認められていない。

4. バベシア感染の検査法に関する研究

1) ICTの試作と人血清に対する感度の検討:

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

2) LAMPの感度の検討:

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

3) ヒトDNAを用いたLAMPの検討:

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

5. ウエストナイル熱等の新興感染症発生

時の献血対応に関する研究:

1) 感度試験:

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

2) 再現性試験:

同時再現性:

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

日差再現性:

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

3) 特異性試験:

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

6. 日本脳炎ウイルス・ウエストナイルウイルス共通遺伝子高感度検出法の開発と評価

日本脳炎ウイルスの検出感度は、目標としたct値20~25の範囲内に入り、十分な感度を示した。一方ウエストナイルウイルスに関しては、NY99株とEg101株は、日本脳炎ウイルス群と同等の感度を示したが、Lineage 1cに分類されるg2266株はct=36.8、Lineage 2に分類されるFCG株は

ct=29.9 と感度はやや低かった。

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

1) DENV 特異的高感度 Primer 及び Probe の同定:

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

2) マルチプレックス PT-PCR による 4 血清型の同時検出:

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

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

8. アカイエカの飛翔能力と行動範囲に関する研究

1) 産卵期のアカイエカ成虫の行動範囲:

アカイエカ幼虫が発生していた雨水マスの空間分布について調査を行ったところ、区画当たりの幼虫発生雨水マスは平均 0.81 個で分散は 0.84 であった。集中度指数は 1.04 となり、アカイエカ幼虫が発生している雨水マスは調査範囲内にランダムに分布していることが示された。

2) アカイエカの飛翔能力の評価:

アカイエカの総飛翔距離を算出したところ、5 秒間に 5 回以上の非常に速いスピードで羽ばたくが、短時間で頻繁に休止することが確認された。一方、コガタアカイエカは 5 秒間で 5 回以下の非常にゆっくりとしたスピードで翅を羽ばたかせ、最長 25 時間連続して飛翔する個体も確認された。アカイエカの 25 での連続飛翔時間は 0.2 時間で約 100 m であったが、15 では連続 5 時間で 4.5 km 飛翔すると推測された。

D. 考察

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

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

リーシュマニア症は、地中海沿岸やインド、南米に存在することから旅行者や長期滞在者、さらに在日している感染国出身の人から日本に持ち込まれる可能性がある。また、無症候性感染者の場合には献血する可能性があり、地中海沿岸の国々ではこのような感染者からの輸血による感染例が報告されている。従って、現行の我が国で実施されている輸血用血液の製造や保存によって *Leishmania* 原虫の感染リスクがどの程度減少するのか評価することは、輸血の安全性確保にとって重要である。今回の検討で凍結によ

って原虫は短期間で死滅すること、4℃や室温では血液製剤の有効期間内は生存することが明らかになった。また、白血球除去フィルターは、*Leishmania* が感染した細胞や原虫を効率良く除去できることを示すことができた。無症候性の感染者には、最大 400mL の血液中に約 2,000 個の感染細胞や無鞭毛型原虫がいると推定されており、白血球除去フィルターは感染防止に非常に有効であることが示された。次年度は、赤血球製剤の白血球除去による有効性を評価する予定している。

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

ウエストナイル熱 (WNV) 国内発生に備え

ている PANTHER 用試薬 (Procleix WNV ABD Assay、Novartis 社製) の感度等について入手可能な非感染性の WNV 液を使用した感度試験等と実検体による特異性試験を実施した。試薬添付文書とほぼ同等の検査結果が得られ、再現性においても充分の性能をしめした。特異性試験においても、陽性コントロールや陽性検体と陰性検体の S/Co が明確に分離されており、比較的非特異反応が起こりにくい試薬検出系となっていることが示唆された。

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

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

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

産卵期のアカイエカ成虫の行動範囲について調査した。アカイエカの幼虫が発生している雨水マスは、雨水マスがある区画に対してランダムに分布していた。この結果は、雨水マスに幼虫発生源としての質的な違いがなく、アカイエカ幼虫が発生する確率 (= 成虫が産卵する確率) はどの雨水マスでも同じであったことを意味している。産卵雌は本研究で調査対象としたエリア全体を飛び回って雨水マスを探し、その中のひとつをランダムに選んで産卵していると考えられた。アカイエカはこのような行動様式を持っていると思われる。さらに、産卵期のアカイエカの行動範囲は少なくとも 450 m × 350 m ほどの広がりがあると推測された。

吸血源を探索するための雌蚊の移動距離をフライトミルを用いて推測した。アカイエカは 25 °C では平均 100 m 程度 (最高でも約 300 m) しか飛翔しなかったが、15 °C では 4.5 km (最高で約 10 km) 飛翔可能と推測された。涼しい気温では広範に吸血源探索を行うと推察される。また、その飛翔パターンや先行研究の結果から、コガタアカイエカは気流を利用して長時間・長距離を

飛ぶことが可能と考えられるが、アカイエカは吸血源を探して約 4.5 km は飛翔できるものの、長距離移動性は有していないと推察された。

E . 結論

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

リーシュマニア症については 4 、3 週間保存で約 2 Log 感染価が低下した。一方、-20 では生存は確認できなかった。また、白血球除去フィルターを用いて除去するとアルブミン液では 5 Log、血漿では、4 Log の除去が認められた。白血球除去フィルターがヒト血中に存在するリーシュマニア原虫を除去するために有効であることが示唆された。

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

ウエストナイルウイルスについて輸血用血液スクリーニング用の核酸増幅検査システムに関し、精度試験を行った。95%検出限

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

新たに設計した TaqMan プライマーを用いることにより、日本脳炎ウイルス遺伝子 ~ 型に対応し、かつウエストナイルウイルスにも対応できる TaqMan 系を開発した。

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

ウイルス媒介蚊については、雨水マス単位として、アカイエカ幼虫の分布様式を調べた。アカイエカ幼虫が発生している雨水マスは調査範囲内にランダムに分布しており、また産卵期のアカイエカの行動範囲は、少なくとも 450m x 350m であると推測された。飛翔距離については、アカイエカは 25 では連続して 0.2 時間、約 100m しか飛翔しなかったが、15 では 5 時間、4.5 km 飛翔可能であることが示唆された。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) 英文論文

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

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

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

2) 和文論文

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

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

2. 学会等発表

1) 国際学会

なし

2) 国内学会

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

-30日、東京

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

Trypanosoma cruzi (シャーガス病)の動態。

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2015-215906

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

バベシア感染の検査法に関する研究

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：バベシア症は、ダニ媒介性の赤血球内寄生原虫病で、主として動物に感染する。*Babesia microti* は主としてげっ歯類に感染するが、ヒトにも感染が認められ人獣共通感染症の原因として重要である。*B. microti* による人バベシア症はアメリカ北東部では地方病として知られており、更に近年では世界的な感染の拡大が報告されている。日本でも、1999年に神戸において輸血により本邦初の *B. microti* の人感染例が認められた。そこで、本研究では輸血用血液や血液製剤の安全性確保と安定供給のために、*B. microti* 感染に対する血清及び遺伝子診断法の開発と標準化、血液スクリーニング法の標準化を目的とした。平成27年度は、*B. microti* の組換え Bmn1-17 蛋白質を用いたイムノクロマト法（ICT）および簡便で迅速な遺伝子増幅法である LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法について検討を行った。その結果、アメリカの流行地のヒト血清のうち、ELISA で高い OD 値を示した血清で陽性ラインが確認されが、ELISA で低い OD 値を示した陽性血清では陽性ラインが認められなかった。また、アメリカの流行地で得られたヒト DNA サンプルを用いた LAMP で PCR とほぼ同様の陽性結果が得られた。

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。しかし、人にも感染し、人獣共通感染症として重要で、アメリカ北東部の**ナンタケット**島や沿岸地帯では地方病として知られている。人への感染は主としてダニによる刺咬によるが、アメリカでは、近年キャリアからの輸血により感染する例が増加しており、その対策が急がれている。また、本症は米国での感染拡大に加えて、中国、メキシコ、台湾、アフリカやヨーロッパ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ている。そのため、血液製剤の安全性確保や更なる人へのバベシア症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、バベシア症に対する迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を作製し、感度・特異性の確認と標準化、我が国および献血血液における抗体陽性状況および遺伝子陽性状況の調査開発することを目的としている。平成26年度は、ELISA および ICT の作製を目的とし、*B. microti* の純度の高い組換え蛋

白質の調整、組換え蛋白質の抗原性の検討、人感染血清による組換え抗原を用いた ELISA について検討した。

B. 研究方法

(1) ヒト血液試料

エール大学公衆衛生学部 Peter Kraus 教授より60検体のヒト血清の提供を受けた。また、P. Kraus 教授から提供を受けた16例のヒト DNA を LAMP の検討に用いた。

(2) Bmn1-17 の組換え蛋白質の産生

B. microti から DNA を抽出し、*bmn1-17* 遺伝子をクローニングして pGEX6P2 発現ベクターに組み込み、GST 融合蛋白質として大腸菌に発現させた。次に、得られた大腸菌を融解後、Glutathione Sepharose で溶出させ、限外濾過フィルターにより蛋白質の濃縮を行なった。

(3) 金コロイドの組換え蛋白質標識条件の検討

Bmn1-17 組換え蛋白質を精製・濃縮後、直径 30 nm の金コロイド粒子を標識するために、蛋白質濃度と pH の条件を変えて検討した。

(4) *B. microti* 遺伝子増幅用の LAMP プライマーの設計

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

(5) LAMP の感度の検討

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

(6) ヒト DNA を用いた PCR と LAMP の検討

B. microti 実験感染マウスモデル系を用いて、標的遺伝子の定量解析を行った。最初に、作製したプラスミドベクターを段階希釈し、コピー数を基に Real-time LAMP を行ってスタンダードカーブを作成した。次に *B. microti* をマウスに感染させ、経時的に血液を採取し、標的遺伝子の定量解析を行った。

また、ヒトバベシア患者の血液を用いて、マウスモデル系と同様に Real-time LAMP を行い、標的遺伝子の増幅を検討した。

(倫理面への配慮)

人の血液材料を用いた実験については、帯広畜産大学、エール大学の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) 金コロイドの組換え蛋白質標識条件の検討

直径 30nm の金コロイド粒子を Bmn1-17 組換え蛋白質に標識する最適条件を見つけるために、蛋白質濃度が 50, 100, 200, 400, 600 µg/ml の組換え抗原を用意し、標識緩衝液の pH を 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7 と変えて検討した。その結果、蛋白質濃度が 100 µg/ml、標識緩衝液の pH が 6 の条件で最適な標識が認められた。

(2) ICT の試作と人血清に対する感度の検討

エール大学で陰性と判定され、ELISA でも 0.2 以下の低い OD 値を示した血清では、対照ラインに陽性バンドが認められたが、テストラインに陽性バンドは認められなかった。一

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

(3) LAMP の感度の検討

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

(4) ヒト DNA を用いた LAMP の検討

16 例のヒト DNA を用いて LAMP を行ったところ、7 例で遺伝子増幅が認められた。また、LAMP に用いられた 4 種類のプライマーから 2 種類を用いて PCR を行った結果、6 例で濃いバンド、1 種類で弱いバンドが認められた。この 1 例については、LAMP で増幅が認められる場合と認められない場合があった。

D. 考察

26 年度は、*B. microti* の Bmn1-17 組換え抗原は、人バベシア病の流行地であるアメリカのヒト血清を用いた ELISA の検討により、診断用抗原として有用であることが示唆された。そこで、本年度はこの組換え抗原を用いた迅速簡便血清法であるイムノクロマト法に確立について検討を行った。その結果、ELISA で高い OD 値を示したアメリカの患者血清に陽性反応が確認された。しかし、希釈倍数を高くすると陽性バンドの減弱が認められた。従って、今後使用する血清の希釈倍数について更に検討する必要がある。また、陽性とされた血清でも ELISA の OD 値が 1.0 以下の場合、陽性バンドが認められなかった。以上の事から、今後金コロイドの大きさや標識粒子の材料に関して更に検討し、検出感度を向上させることが必要である。

また、本研究では、人バベシア症の遺伝子診断法についても検討を行った。PCR は最も用いられている遺伝子診断法であるが、高価な機器や増幅法や結果を得るまでに時間を

要するなどの難点がある。そこで、PCR と比較して、簡便で迅速に診断可能な LAMP 法について検討した。その結果、アメリカ人の患者 DNA を用いて検討した LAMP は PCR と同様の検出率を示した。しかしながら、1 例については、PCR での増幅が悪く、LAMP でも安定した増幅が得られなかった。今後、プライマー、増幅条件の改良を、より多くのヒトサンプルを用いて行い、LAMP 法の感度並びに特異性を向上させる事が重要である。

E. 結論

本研究では、迅速で簡便な血清並びに遺伝子診断法である ICT と LAMP に関して検討を行なった。その結果、組換え抗原を用いた ICTA はヒト感染血清中の抗体を検出する事が可能であったが、更なる感度の向上が必要である。また、LAMP においても PCR と同様の検出率が認められたが、実用化するためには反応条件や感度に関して更なる改良が必要である。

F. 研究発表

1 論文発表

1) Terkawi MA, Cao S, Herbas MS, Nishimura M, Li Y, Moumouni PF, Pyarokhil AH, Kondoh D, Kitamura N, Nishikawa Y, Kato K, Yokoyama N, Zhou J, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. 2015. Macrophages are the determinant of resistance to and outcome of nonlethal *Babesia microti* infection in mice. *Infect Immun.* 83:8-16.

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

2 書籍

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

3 学会発表

なし

G . 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政策研究事業
分担研究報告書

アカイエカの飛翔能力と行動範囲に関する研究

研究分担者 澤邊京子 (国立感染症研究所 昆虫医科学部)
研究協力者 津田良夫 (国立感染症研究所 昆虫医科学部)

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

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

A. 研究目的

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

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

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

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

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

B. 研究方法

1) 産卵期のアカイエカ成虫の行動範囲

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

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

2) アカイエカの飛翔能力の評価

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

C. 研究結果

1) 産卵期のアカイエカ成虫の行動範囲

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

2) アカイエカの飛翔能力の評価

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

D. 考察

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

測された。

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

E. 結論

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

アカイエカは 25℃では連続して 0.2 時

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

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

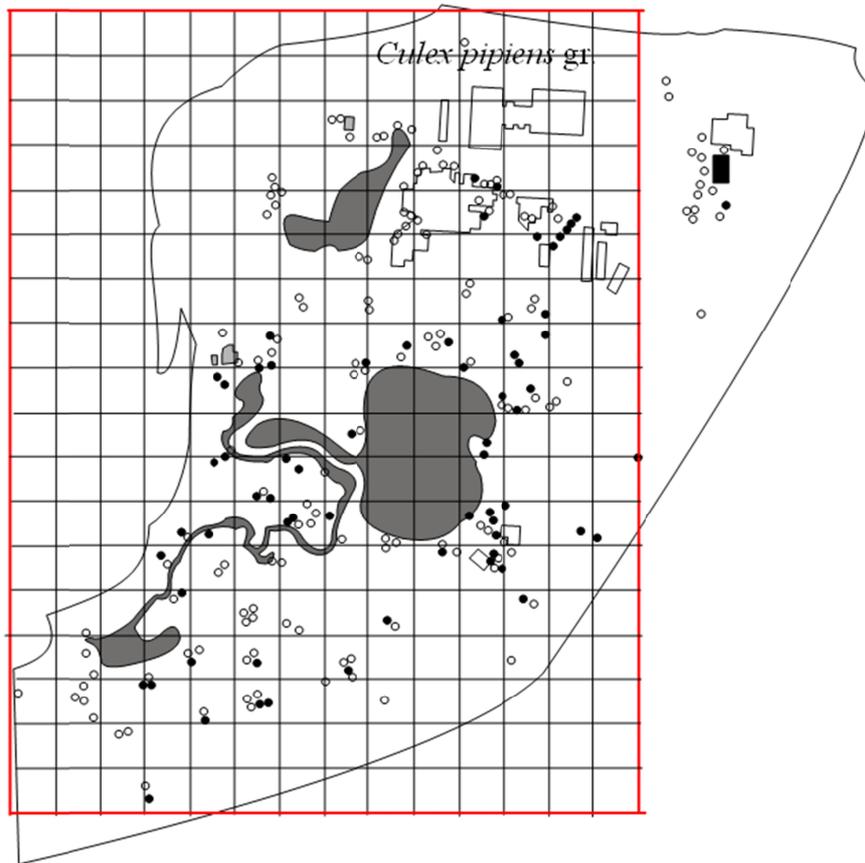


図1 調査地内の雨水マスの分布(○と●)とアカイエカ幼虫が発生していた雨水マス(●)の分布を示す地図(区画の大きさは25m四方)

表1 コガタアカイエカおよびアカイエカの総飛翔時間および総飛翔距離

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

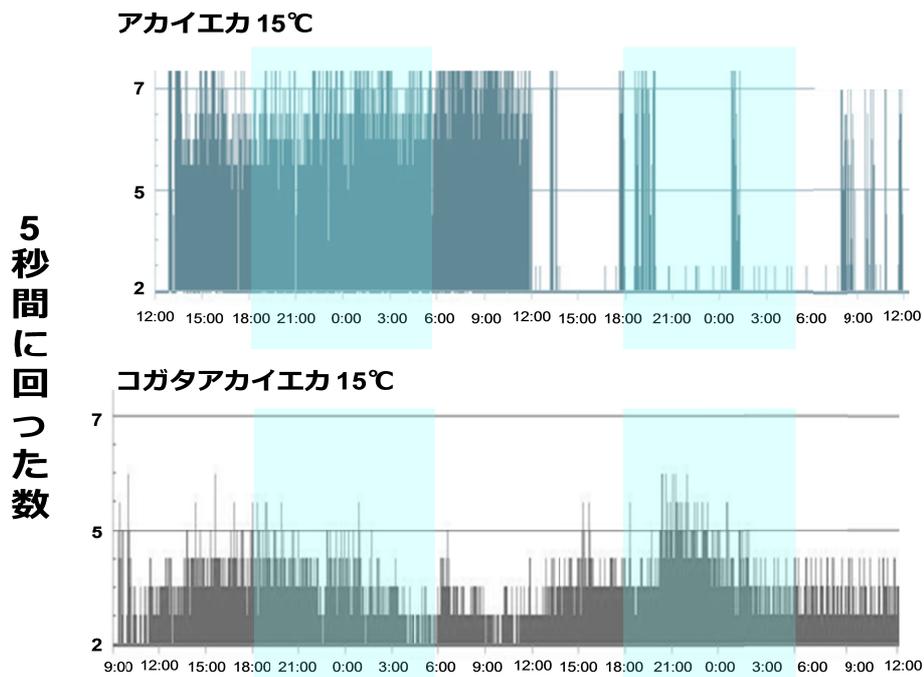


図2 フライトミルによるアカイエカ（上段）およびコガタアカイエカ（下段）の飛翔パターンの比較

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

ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応に関する研究

研究分担者 平 力造（日本赤十字社 血液事業本部安全管理課長）

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

A. 研究目的

日本赤十字社では、輸血用血液製剤等の安全性の向上、検査時間の短縮及び危機管理体制の充実等を目的に平成 26 年 8 月 1 日採血分よりノバルティス社（Grifolis 社）製 PANTHER システムを全国 8 施設に導入し、個別検体によるスクリーニング NAT（HBV、HCV、HIV）を開始した。同システムは、ウエストナイルウイルス（WNV）も測定可能であり、危機的状況下においてはこれまで以上に迅速かつ広域的な対策も可能となった。

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

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

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

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

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

B. 研究方法

（1）感度試験

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

（2）特異性試験

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

C. 研究結果

(1) 感度試験

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

(2) 再現性試験

ア. 同時再現性

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

イ. 日差再現性

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

(3) 特異性試験

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

D. 考察

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

E. 結論

PANTHER システム (自動化) を使用した検査体制を構築しており、今回、その試薬の感度試験等の結果から、その精度については十分なパフォーマンスがあることが確認された。また来年度は、さらに WNV 熱国内発生時の検査対応におけるシミュレーションと対応マニュアル案の策定を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表
なし
2. 論文発表
なし

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

血液製剤による Leishmania 感染予防のための研究

研究分担者 岡田義昭（埼玉医科大学病院 血液・細胞移植部 部長）

研究要旨 Leishmania 原虫は、世界に広く分布し、約 15 種がヒトに病原性を有していると言われ不顕性感染も存在する。そのため地中海沿岸諸国では輸血や臓器移植による感染例が報告されている。我が国には存在しないが、海外から持ち込まれ輸血用血液製剤に混入した場合のリスクを解析した。マクロファージ様細胞に分化させた TPH 細胞株に鞭毛型 Leishmania を感染させ無鞭毛型原虫を得た。これを血漿に添加し、4℃、室温、-20℃ の各温度で保存し、生存率を解析した。4℃、3 週間保存で約 2 Log 感染価が低下した。一方、-20℃ では生存は確認できなかった。また、白血球除去フィルターを用いて除去するとアルブミン液では 5Log、血漿では、4Log の除去が認められた。白血球除去フィルターがヒト血中に存在する Leishmania 原虫を除去するために非常に有効であることが示唆された。

A. 研究目的

Leishmania は、主にアフリカ北部、地中海沿岸、中東、西アジア、南米に広く分布している原虫である。サシチョウバエ (sandfly) と呼ばれる蚊帳を通り抜けられる程小さい「ハエ」によって媒介される。世界 88 カ国に 1200 万人の感染者がいると推定されている。不顕性感染が存在することは知られており、これまで輸血や臓器移植によって感染した報告がある。日本では、輸入感染症として報告はあるが、ほとんど知られていない。不顕性感染の献血者が献血した場合に現行の製法（白血球除去や保存温度）で製造された血液製剤の感染リスクを明らかにすることを目的とした。Leishmania 原虫は、マクロファージに主に感

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

B. 研究方法

(1) Leishmania の無鞭毛型原虫の培養法

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

で培養した。感染1日後と3日後に培養液を交換し、鞭毛型原虫を取り除いた。感染5日後に THP-1 細胞と cell - free の無鞭毛型原虫を集めた。

(2)血液製剤中での生存率の解析

感染させた THP-1 細胞と cell-free の無鞭毛型原虫をヒト血漿に添加し、赤血球製剤を想定して 4 で4週間保存、血小板を想定して室温で1週間保存、新鮮凍結血漿を想定して -20 で2ヶ月冷凍保存した、その間に経時的に検体採取して L.donovani 原虫の生存率を検討した。採取した検体は、ショウジョウバエ細胞培養液を用いて10倍ずつ段階希釈し、25℃、CO₂5%で4週間培養後増殖してくる鞭毛型原虫の有無を顕微鏡下に観察した。各希釈で増殖が観察できたウエル数を用いてウイルス感染価と同様に TCID₅₀を計算し、生存していた原虫数とした。

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

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

(4)変異型 CJD 発生動向

変異型 CJD の発生状況を英国と WHO の CJD サーベイランスから経時的に評価した。2014年のフ

ランスの発生状況は 2013 年度からの増加数で評価した。

C. 研究結果

(1)血液製剤中での生存率の解析

4 保存では、2週間で 1Log、3週間で 2Log

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

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

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

(3) 変異型 CJD 発生動向

図3に年度毎の患者数(死亡者数)を示した。英国では、2012年と2014年は0名だが、2013年に1名、フランスでは2013年と2014年にそれぞれ1名感染者の報告があった。2000年に発生のピークがあり、第2次の発生ピークが危惧されているがその兆候は認められていない。

D. 考察

Leishmania 原虫症は、世界に広く分布するものの日本では馴染みが薄い感染症である。地中海沿岸やインド、南米に存在することから旅行者や長期滞在者、さらに在日している感染国出身

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

変異型 CJD は牛の管理が適切に実施されたことから 2000 年を境に感染者数は激減した。フランスは英国に 6 年遅れて変異型 CJD の死亡件数がピークとなり、この 2 年間でそれぞれ 1 名の死亡例が報告されている。死亡例は、0 とはならず未発症の感染者が存在していることから疫学調査と長期的に対策を取り続ける必要がある。

E. 結論

輸血による Leishmania 感染症を防止するために保存温度における生存率を検討した。-20 では感染価は検出感度以下にまで低下したが、4 や室温では感染性が残存していた。一方、白血球除去フィルターによる Leishmania 除去効率は約 4 Log と非常に感染防止に有効であることが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

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

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

4) 内田理恵子、水沢左衛子、岡田義昭、皆木隆男、高倉明子、他6名:血液製剤のウイルス安全性確保;パルボウイルス B19 DNA 参照パネルの樹立に関する共同研究、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成27年4月、東京

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

日本脳炎ウイルス・ウエストナイルウイルス共通遺伝子高感度検出法の開発と評価

高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

田島 茂（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

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

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

C. 研究結果

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

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

D. 考 察

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

のスクリーニングをより効率化できると考えられる。

E. 結 論

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

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

F . 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G . 研究発表

- 1 . 学会発表
関連するものなし
- 2 . 論文発表
関連するものなし

表1 プライマー&プローブセット

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

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

表 2

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

ND : 検出されない

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

輸血血液におけるデングウイルスおよびHTLV-2の検出法開発に関する研究

研究分担者 大隈 和 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長)

研究要旨：輸血用血液を含む血液製剤は、ヒトの血液を原料とするためウイルス等の病原体混入のリスクが存在する。一方本邦で製造される血液製剤は、抗体検査やNATなど極めて精度の高い方法によって病原体スクリーニングが実施され、その安全性が担保されてきた。しかしながら、新興・再興感染症の原因ウイルス等に対する検査体制については十分な整備がなされておらず、日本国内への移入に備え早急な対応が求められている。特に、デング熱の原因となるデングウイルスは昨年約70年ぶりに国内感染が確認され、今後も感染の拡大及び血液製剤への混入が危惧されている。血液製剤の安全性を確保するためには原料血漿や血液製剤などに微量に混入した病原体を高感度に検出できる方法が不可欠であるが、現存の検査系においては感度が不十分であり改善が必要であった。そこで本研究では、血液製剤の安全性評価への適用を想定し、マルチプレックスPCR法を用いたデングウイルスの新規高感度検出系を確立した。本年度は特にデングウイルスの検出法開発を優先的に推し進め、HTLV-2の検出法開発は昨年の研究を継続した。

研究協力者

倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
研究員
手塚健太 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
任期付研究員
浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
部長
高崎智彦 国立感染症研究所 ウイルス第一部
室長

A . 研究目的

血液製剤の安全性を担保する上で、病原体の混入を防止及び製造過程より排除することは極めて重要な課題である。国内の献血血液に対して日本赤十字社でこれまでにHBV, HCV, HIV 等々の様々な病原体に対して高感度なスクリーニング検査を実施しており、本邦における血液製剤のこれらの病原体に対する安全性は極めて高く管理されている。しかしながら、海外への渡航者などを介して、本来は国内に存在しなかった病原体の輸入症例が増加しており、新規感染症の本邦での定着が危惧されている。実際、デング熱やデング出血熱の原因となるデングウイルス (DENV)においては、約 70 年ぶりに東京を中心として国内感染事例が発生した。DENV の感染者は無症候である場合も多く、献血血液を介した DENV の血液製剤への混入を検出し、感染の拡大を未然に防止する高感度検査法が必要である。

これまで、国立感染症研究所において DENV の輸

入症例等に対して依頼検査を行ってきたが、DENV 核酸検査に用いられる Primer 及び Probe セットが、献血血液や血液製剤の原料血漿などに混入した DENV を高感度に検出可能であるかについてはこれまで十分に検討されていなかった。血液製剤の製造過程で大幅に希釈されると想定される DENV を検出するためには、極めて高感度な検出法が必要であり、既存の手法を再検討・改善する必要があると考えられる。

そこで本研究においては、デングウイルス各血清型の RT-PCR 用 Primer 及び Probe を大規模スクリーニングすることにより、新規高感度 Primer 及び Probe を同定し、これらの Primer 及び Probe を用いて検出系を最適化した後、全血清型の高感度同時検出が可能な新規マルチプレックス PCR 法を確立することを目的とした。

B . 研究方法

・ DENV特異的Primer及びProbeの大規模スクリーニング

Primer Express ver3 ソフトウェア (Life Technologies) を使い Primer 及び Probe を設計した。Primer のスクリーニングには SYBR Green PCR Master Mix の推奨プロトコルに従い、Probe (FAM 標識) のスクリーニングには RNAt0Ct One-Step RT-PCR キットの推奨プロトコルに従って、real-time RT-PCR を行った。各血清型で最も効率良く PCR が実施されるオリゴセットを同定した。

・DENVゲノムRNAの精製

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

・新規マルチプレックスPCR検出系の構築

マルチプレックスPCR法は、同定したPrimer及びProbeを用い、QuantiTect Multiplex RT-PCR kitの推奨プロトコルに従い検討・実施された。各血清型のProbeはそれぞれ異なる蛍光色素で標識した(DENV-1: FAM, DENV-2: VIC, DENV-3: NED, DENV-4: Cy5)。

C. 研究結果

・DENV特異的高感度Primer及びProbeの同定

DENV-1, 2, 3, 4の各血清型について、ForwardおよびReverse Primerセットをそれぞれ108, 80, 72, 71セット(合計約350セット)を設計した。SYBR Greenを用いたreal-time RT-PCRの結果、各血清型についてそれぞれ17, 14, 18, 18セットの優良なPrimerセットを同定した。同定したPrimerセットについて、Taqman MGB Probeを設計した。それぞれの血清型について11~13セットのProbeを準備し、同じ分離株を用いてTaqman PCRを行った。その結果、各3~4セットのプロープが極めて優れた増幅を示した。さらに、同定したPrimer及びProbeを用いて、国立感染症研究所ウイルス第一部で解析された輸入症例の核酸(全52株)を検体として、各オリゴセットの検出能を検討した。その結果、最も検出域、感度、特異性に優れると考えられる各オリゴセットの組み合わせを決定した。

・マルチプレックスPCRによる4血清型の同時検出

DENVは4つの血清型が存在するため、DENVの検出及び血清型判別のためには、これまで数回のPCR反応が必要であった。しかし、1回のPCR反応で全ての血清型が検出可能であれば、コスト面の改善や煩雑な作業が簡略化されることでコンタミネーションのリスクも低下し、より有用性が高まると期待される。そこで、今回同定した新規オリゴセットを用いて、マルチプレックスPCR法による新規DENV検出系の構築を試みた。QuantiTect Multiplex RT-PCR kitと同定したオリゴセットを用いてマルチプレックスPCR反応を実施したところ、非特異的な反応が見られず、かつ異なる蛍光色素で標識された各血清型に特異的なシグナルの検出が可能であった(Figure 1)。また、DENV臨床分離株を鋳型として各血清型のシングルプレックスPCRとマルチプレックスPCRの検出感度を比較したところ、2つの検出系は各血清型において同等のCt値を示した(Table 1)。さらに、DENV以外の種々の核酸を鋳型として検討したところ、非特異的な反応は見られなかった。

以上のことから、構築した新規マルチプレックス

PCR法は、感度・特異性共にシングルプレックスPCRと同等であり、かつ1反応当たりのコストが低く、より簡便で有用な手法であると考えられた。

Serotype	Strain	Ct value	
		Singleplex	Multiplex
DENV-1	01-44	27.2	27.3
DENV-2	12-26	26.2	26.6
DENV-3	00-40	25.9	26.1
DENV-4	08-11	26.0	27.1

Table 1. シングルプレックスとマルチプレックスPCRの比較

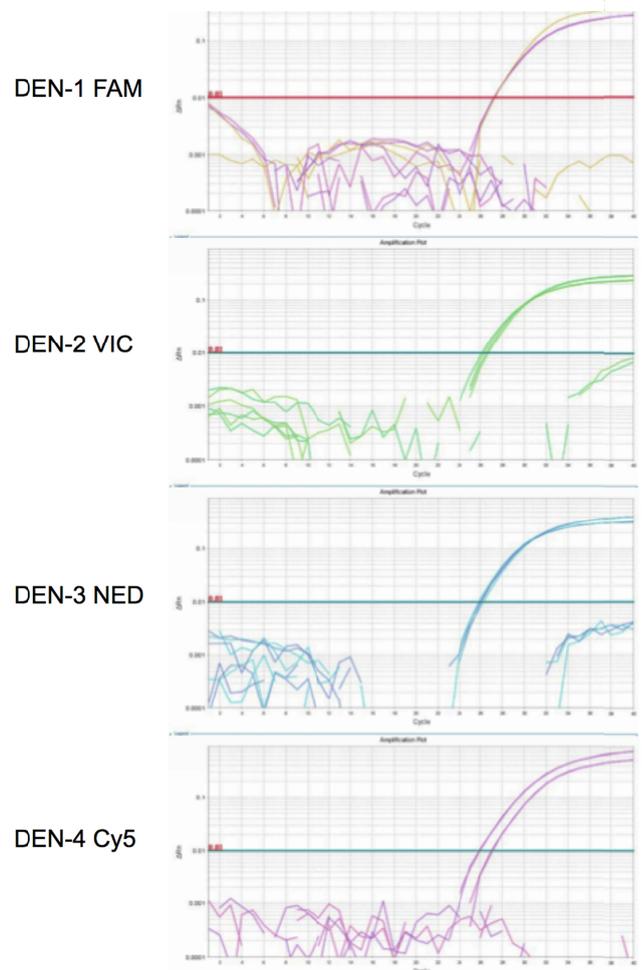


Figure 1. 各血清型におけるマルチプレックスPCRの特異性

D. 考察

DENVは昨年8月に約70年ぶりに国内感染例が発生し、当該ウイルスに対する血液製剤の安全性確保は喫緊の課題となった。

本研究では、DENV特異的なPrimer及びProbeの大規模スクリーニングによって、多数の新規オリゴセットを得ることが出来た。これらのオリゴセットの中から、さらにDENVの臨床分離株を用いて選

定を行うことで、感度・特異性そして検出域の非常に優れたオリゴセットを同定した。

国立感染症研究所を中心に、これまで DENV の検査・検出に用いられてきた PCR 法は主にシングルプレックス PCR 法であったが、DENV は 4 つの血清型が存在するために複数の PCR が要求されるなどアッセイ系が煩雑になっていた。本研究においては、1 反応の PCR で全ての血清型を高感度・特異的に検出するマルチプレックス PCR 法の確立に成功した。この新規手法は、アッセイ当たりの実質コストが半減以下になるだけでなく、簡便で、かつこれまでの手法よりも高感度であると考えられた。今後は、血液製剤や原料血漿などにおいて、微量な DENV の混入をスクリーニングする手法として有用と考えられ、血液製剤の安全性確保に寄与することが期待される。

さらに、今回の研究で確立した Primer 及び Probe の大規模スクリーニング、その後の高感度マルチプレックス PCR 法の確立は、DENV に限らず多くの病原体についても応用可能であると考えられる。新興・再興感染症など、検査法の十分な検討が進んでいない分野について、画期的な手法を提供する可能性がある。

E . 結論

本研究により、DENV 全血清型特異的な高感度マルチプレックス PCR 法を確立した。本検査法は、特にこれまで困難であった血液中の微量な DENV の検出に有用であり、献血血液などのスクリーニングに適していると考えられる。本検査法の開発は、今後の血液製剤の安全性確保に繋がることが期待される。

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
なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特願 2015-215906

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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

輸血用血液製剤における *Trypanosoma cruzi* 原虫の動態

研究代表者 倉根一郎 (国立感染症研究所 所長)
研究協力者 佐竹正博 (日本赤十字社中央血液研究所 所長)
佐山勇輔 (日本赤十字社中央血液研究所)
松本千恵子 (日本赤十字社中央血液研究所)

研究要旨

シャーガス病は、*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) 原虫の感染により引き起こされる疾患であり、主にラテンアメリカで流行している。感染者(キャリア)では、末梢血や臓器に原虫が存在するため、輸血や移植などにより患者に *T. cruzi* が伝播される可能性がある。シャーガス病非流行国において、輸血を介した *T. cruzi* 感染例の主な原因製剤は、血小板製剤である。本研究において、これまで輸血用血液製剤(血小板製剤および血漿製剤)に *T. cruzi* を接種して各輸血用血液製剤中の *T. cruzi* の動態を解析してきた。今回、(1)白血球除去(白除)フィルターの *T. cruzi* の低減化能、(2)赤血球製剤中での *T. cruzi* の動態、さらに(3)低温環境下での *T. cruzi* の増殖性および感染性を解析した。白除フィルターにより、増殖可能な *T. cruzi* は 4 Log 程度の減少が認められた。赤血球製剤中では、増殖可能な *T. cruzi* は、接種 4 日目から 1~2 Log 程度減少し、21 日目では 2~4 Log の減少が認められたが、減少幅にはばらつきが認められた。低温環境下(4)にて培養した *T. cruzi* は増殖が認められず、特に 4 日目から amastigotes の減少が認められ 14 日目では検出限界以下となり、感染性も低下していることが考えられた。本邦で使用されている白除フィルターには、*T. cruzi* を低減化させる効果が認められ、さらに赤血球製剤中では、その保管環境により増殖性および感染性が低下し、赤血球製剤による *T. cruzi* 感染のリスクは低いことが示唆された。

A. 研究目的

シャーガス病は *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) により引き起こされる原虫疾患である。主に、中南米地域で流行している。ヒトへの感染は、サシガメおよび汚染された食品による感染の他、キャリアからの垂直感染および輸血・臓器移植による感染がある。

輸血による感染は、これまでシャーガス病非流行国であるアメリカ、カナダ、スペインにおいて、これまで 20 例が同定されている。

その原因となった輸血用血液製剤のほとんどは血小板製剤であり、血漿製剤および赤血球製剤からの輸血を介した伝播は認められていない。しかしながら、保管条件や組成成分の異なる血漿および赤血球製剤の保管中の *T. cruzi* の動態を詳細に解析した報告は少なく、これらの製剤の感染性については不明である。さらに、国内で使用されている白血球除去(白除)フィルターの有効性は不明である。

そこで本研究では、輸血用血液製剤へ *T. cruzi* を接種し、白除フィルターの低減化能および通常の保管状態における赤血球製剤の *T. cruzi* の動態を解析した。

B. 研究方法

(1) *T. cruzi*原虫

*T. cruzi*は、中南米出身キャリアから分離した JRC Tc-1 (DTUs TcV) および JRC Tc-2 (DTUs TcII) を用いた。各 *T. cruzi* は、Schneider 's Drosophila Mediumに最終濃度が30%になるようにFBSを添加し、25 °Cで培養した。原虫数は、顕微鏡下にて細胞計算盤により計測した。

(2) 白除フィルターによる低減化能の解析

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

(3) 赤血球製剤における *T. cruzi*の動態解析

輸血用血液製剤は異なる3名の献血者由来の赤血球液を用いた。培養した *T. cruzi* を各製剤へ接種 (10^8 parasites/Bag) 後、4 °C

で保管をおこなった。接種後0,4,7,14,21日経過時にそれぞれ一部採取したサンプルを段階希釈後、培養を行った。培養は、(2)と同様の方法でおこなった。

(4) 低温環境下における *T. cruzi*の増殖性および感染性の評価

培地に *T. cruzi* ($10,000$ parasites) を接種し、25 °C および4 °Cにて培養をおこなった。接種後0,4,7,14,21,28,35,42日経過時にそれぞれ一部採取し、qPCRによる *T. cruzi*量の測定および感染性を評価した。感染性の評価は、採取した *T. cruzi* を段階希釈後、MRC-5細胞(ヒト線維芽細胞、ATCC)に接種し、37 °Cにて培養を行った。7日後に細胞を固定後、間接蛍光抗体法によりamastigotesの観察を行った。

C. 研究結果

(1) 白除フィルターによる *T. cruzi* の除去

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

(2) 赤血球製剤における *T. cruzi* の動態

赤血球液中での再増殖可能な *T. cruzi* 数は、JRC Tc-2 Bag#3を除き4日目以降から減少が認められ、21日目には2~4 Log程度の減少が確認された(図2)。JRC Tc-2 Bag#3は、14日目まで *T. cruzi* の減少は認められなかった。赤血球液の有効期間内である21日では、いずれの赤血球液においても増殖可能な *T. cruzi* が確認された。

(3) 低温環境下での *T. cruzi* の増殖性および感染性

25 で培養を行った *T. cruzi* は、時間の経過と共に増殖が認められたが、4 では *T. cruzi* の増殖は認められなかった(図 3)。同様に 25 で培養を行った *T. cruzi* では、amastigotes の増殖が認められたが、4 での *T. cruzi* は、4 日目から amastigotes の減少が認められ、14 日目以降では検出限界以下であった。両株とも同様の結果であった。

D. 考察

白除フィルターにより *T. cruzi* は、2~3 Log 程度の減少が認められ、さらに培養による再増殖可能な *T. cruzi* は、4 Log 以上の減少が認められた。これはフィルターがそのトラップ能によって *T. cruzi* を低減化するだけでなく、*T. cruzi* の増殖にも影響を与えていることを示唆するが、詳細は不明である。

また、赤血球製剤は低温(2~6)に保管されているため、今回赤血球液中における *T. cruzi* の動態だけでなく低温環境下(4)での *T. cruzi* の増殖性および感染性を評価した。その結果、赤血球液中での *T. cruzi* は、製剤有効期限である21日目においても2~4 Log 程度の減少を示すだけであったが、低温環境下にて *T. cruzi* を培養すると *T. cruzi* の増殖は認められず、さらに感受性細胞への感染性が低下することが示された。これにより、これまで非流行地域における赤血球製剤を介した *T. cruzi* 感染が認められていないのは、低温保存条件により感染性が低下していることが一因であると考えられた。

これまで非流行地域での血液製剤を介し

た *T. cruzi* 感染においては、血漿製剤および赤血球製剤による感染は認められていない。昨年度の本研究において血漿製剤中における *T. cruzi* は、一度の凍結融解により5 Log 以上減少し、検出限界以下となることを報告した。さらに本年度の研究にて、白除フィルターによる *T. cruzi* のトラップ能および増殖能の減少、そして赤血球製剤の低温保存による増殖可能な *T. cruzi* の減少および感染性の低下が認められたことから、本邦にて製造される全血採血由来輸血用血液製剤を介した *T. cruzi* の感染は、非常に低いリスクであると考えられた。

E. 結論

白除フィルターにより *T. cruzi* の低減化が認められた。赤血球液中では、*T. cruzi* は保管期間中に増殖可能な *T. cruzi* が認められたが、低温環境下に保管することでその増殖性および感染性が減少することから赤血球液による *T. cruzi* の感染リスクは低いことが示唆された。

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

国内学会

1. 佐山勇輔、松本千恵子、三浦左千夫、瀧崎晶宏、内田茂治、佐竹正博、田所憲治. 輸血用血液製剤における *Trypanosoma cruzi* (シャーガス病)の

動態. 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会. 2015 年 5 月 28 日-30 日(東京都)

2. 佐山勇輔、山岸尚仁、松本千恵子、内田茂治、永井正、佐竹正博：輸血用血液製剤における製造および保存条件による *Trypanosoma cruzi* (シャーガス病)の動態. - 白血球除去フィルターおよび赤血球製剤を中心に-. 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会. 2016 年 4 月 28 日-30 日(京都市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
五十嵐郁男	バベシア症	木村哲、木田宏	人獣共通感染症(改訂3版)	医薬ジャーナル社	大阪	2016	430-434

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Terkawi MA, Cao S, Herbas MS, Nishimura M, Li Y, Mounouni PF, Pyarokhil AH, Kondoh D, Kitamura N, Nishikawa Y, Kato K, Yokoyama N, Zhou J, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X	Macrophages are the determinant of resistance to and outcome of nonlethal Babesia microti infection in mice	Infection and Immunity	83(1)	8-16	2015
Tuvshintulga B, Sivakumar T, Battsetseg B, Narantsatsaral SO, Enkhtaivan B, Battur B, Hayashida K, Okubo K, Ishizaki T, Inoue N, Igarashi I, Yokoyama N	The PCR detection and phylogenetic characterization of Babesia microti in questing ticks in Mongolia.	Parasitology International	64(6)	527-532	2015