

**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 28 年度 総括・分担研究報告書**

**平成 29 (2017) 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11

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. ウイルス感染症媒介蚊の生理・生態学的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13

研究分担者：沢辺京子（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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21

研究分担者：岡田義昭（埼玉医科大学 医学部）

5. ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス\_マルチ遺伝子高感度検出法の評価・・24

研究分担者：高崎智彦（神奈川県衛生研究所 所長）

6. 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・・・・・・・・27

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. 日本の献血者における *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性率の調査・・・・・・・・・・・・・・・・29

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35

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

総括研究報告書

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

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所 所長）

研究要旨：

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

シャーガス病については、シャーガス病にリスクがあると考えられた日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率は、3/18,487 (0.016%)であった検査可能であった受血者5名は、*T. cruzi* の感染は認められなかった。

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

研究分担者：

大隈 和（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長）

岡田義昭（埼玉医科大学医学部 准教授）

沢辺京子（国立感染症研究所昆虫医科学部 部長）

平 力造（日本赤十字社血液事業本部安全管理課長）

高崎智彦（神奈川県衛生研究所 所長）

横山直明（帯広畜産大学原虫病研究センター 教授）

研究協力者：

石野田正純（日本赤十字社血液事業本部）

倉光 球（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員）

佐竹正博（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所 所長）

佐山勇輔（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）

鈴木理恵子（神奈川県衛生研究所 微生物部）

高倉明子（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）

津田良夫（国立感染症研究所昆虫医科学部 研究員）

手塚健太（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員）

浜口 功（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長）

古居保美（日本赤十字社血液事業本部）

松本千恵子（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）

## A．研究目的

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

## B．研究方法

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

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

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

## 2. 血液製剤によるリーシュマニア感染予防のための研究：

*Leishmania donovani*(以下 *L. donovani*) は 10%FCS 添加シヨウジョウバエ細胞培養液で 26、炭酸ガス濃度 5%で培養した。この条件では鞭毛型原虫が増殖する。ヒト単球細胞株である THP-1 にホルボールエステルを最終濃度 100nM になるように添加し、24 時間 37 で培養し、マクロファージ様細胞株を誘導した。また、HepG2(肝癌細胞株)、HuH7(肝癌細胞株)、A549(肺癌細胞株)、NJK(絨毛癌細胞株)、VERO、NEC8(胚細胞株)、N-TERA(胚細胞株)は無刺激で MOI 10 になるように鞭毛型原虫を添加し、37 で培養した。感染 1 日、3 日、5 日後に培養液を用いて洗い、添加した鞭毛型原虫を

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

## 3. 変異型 CJD 発生動向調査：

vCJD の発生状況を英国の National CJD Research & Surveillance Unit と米国 CDC の CJD サーベイランスから経時的に情報を集めた。2016 年のフランスの発生状況は 2015 年度からの増加数で評価した。変異型 CJD の発生状況を英国と WHO の CJD サーベイランスから経時的に評価した。2014 年のフランスの発生状況は 2013 年度からの増加数で評価した。

## 4. バベシア感染の検査法に関する研究：

バベシア症に対する迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を作製し、感度・特異性の確認と標準化、我が国および献血血液における抗体陽性状況および遺伝子陽性状況の調査開発するため、ICT および LAMP 法の確立をおこなった。ヒト血清試料はエール大学公衆衛生学部 Peter Kraus 教授より 60 検

体のヒト血清の提供を受けた。これらの血清は、非感染者血清 10 例、陽性血清 49 例、感染の有無が不明の 1 例を含んでいる。なお、ヒト血清を用いた実験については、帯広畜産大学、エール大学の倫理委員会の承認を得て実施した。組換え蛋白質を用いた ELISA と ICT の比較として、Bmn1-17 組換え蛋白質の ELISA を 60 検体のヒト血清を 100 倍希釈で検討を行った。また、Bmn1-17 組換え蛋白質で作製した ICT ストリップを 60 検体のヒト血清を 5 倍希釈で検討した。ヒト DNA を用いた LAMP の検討として、*B. microti* の LAMP についてプライマー、増幅条件の改良、ヒトサンプル数の増やして LAMP 法の感度並びに特異性を向上させる事を計画した。

5 . ウエストナイル熱等の国内発生時の検査対応におけるシミュレーションと対応マニュアル案の策定 :

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

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

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

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

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

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

8 . ウイルス感染症媒介蚊の生理・生態学的研究

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

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

（倫理面への配慮）

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

## C．研究結果

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

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

2．血液製剤によるリーシュマニア感染予防のための研究

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

3．変異型 CJD 発生動向

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

4．バベシア感染の検査法に関する研究

1) ヒト感染血清によるbmn1-17組換え抗原を用いたELISAの検討：

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

2) ヒト感染血清によるbmn1-17組換え抗原を用いたICTの検討:

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

3) ヒト DNA を用いた LAMP の検討:

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

5. ウエストナイル熱等の国内発生時の検査対応におけるシミュレーションと対応マニュアル案の策定:

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

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

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

7. 輸血血液におけるデングウイルスおよびHTLV-2の検出法開発に関する研究: Multiplex qPCRによるHTLV-1/2核酸検出系の検討

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

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



genome内に2コピー存在する領域であることから高感度であることが期待できる。以上のことから、構築した新規マルチプレックスPCR法は、感度・特異性共にシングルプレックスPCRや既報の方法と同等以上の高感度法であり、HTLV-1/2の判別にも簡便で有用な手法であると考えられた。

#### 8. ウイルス感染症媒介蚊の生理・生態学的研究

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

#### D. 考察

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

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

リーシュマニア症は、地中海沿岸やインド、南米に存在することから旅行者や長期滞在者、さらに在日している感染国出身の人から日本に持ち込まれる可能性がある。また、無症候性感染者の場合には献血する可能性があり、地中海沿岸の国々ではこのような感染者からの輸血による感染例が報告されている。昨年度までの研究によって感染細胞は、白血球除去フィルターで効率良く除去できることが明らかになった。しかし、感染細胞から放出される無鞭毛型原虫が同様に白血球除去フィルターで除去できるのか明らかにされていない。そこで今年度は、無鞭毛型の培養系を確立し、白血球除去フィルターの除去効率を評価することとした。マクロファージ様細胞に分化させたTHP-1細胞や肝癌細胞株に鞭毛型*Leishmania*を感染させ無鞭毛型原虫を得た。この培養液をTHP-1細胞や胚細胞癌株に添加し、26℃で培養し鞭毛型原虫の有無で感染性を評価したが、コントロールと比較して有意な感染価は得られなかった。

バベシア症については、組換え抗原を用いた迅速簡便血清法であるイムノクロマト法に確立について検討を行った。Bmn1-17組換え蛋白質を用いたELISAのヒト血清を

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

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

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

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

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

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

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

#### E . 結論

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

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

ヒトバベシア感染の検査法開発のため、イムノクロマト法 (ICT) および簡便で迅速な遺伝子増幅法である LAMP 法について検討を行った。その結果、組換え抗原を用いた ICTA はヒト感染血清中の抗体を検出する事が可能であったが、更なる感度の向上が必要である。また、LAMP においても PCR と同様の検出率が認められたが、反応条件や感度に関して更なる改良が必要である。

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

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

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

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

#### F . 健康危険情報

特になし

#### G . 研究発表

- 1 . 論文発表
- 1 ) 英文論文

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

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

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

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

2) 和文論文  
なし

2. 学会等発表  
1) 国際学会

なし

2) 国内学会

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし  
2. 実用新案登録  
なし  
3. その他  
なし

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28年度は、*B. microti* の組換え Bmn1-17 蛋白質を用いた ELISA とイムノクロマト法（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60例のうち、33例が ELISA と ICT で陽性と判定され、両診断法に高い相関が認められた。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が、サンプル数が少ないため、引き続き検討中である。

**A. 研究目的**

赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立している。しかし、ヒトにも感染し、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。ヒト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、近年キャリアー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、アジア、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ヒト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28年度は、*B. microti* の純度の高い組換え蛋白質を ELISA および ICT の作製を行い、アメリカのヒト血清を用いて評価を行った。

**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) 組換え蛋白質を用いた ELISA と ICT の比較

Bmn1-17組換え蛋白質の ELISA を60検体のヒト血清を100倍希釈で検討を行った。また、Bmn1-17組換え蛋白質で作製した ICT ストリップを60検体のヒト血清を5倍希釈で検討した。

(3) ヒト DNA を用いた LAMP の検討

*B. microti* の LAMP についてプライマー、増幅条件の改良、ヒトサンプル数の増やして LAMP 法の感度並びに特異性を向上させる事を計画した。

(倫理面への配慮)

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

**C. 研究結果**

(1) ヒト感染血清による bmn1-17 組換え抗原を用いた ELISA の検討

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

(2) ヒト感染血清による bmn1-17 組換え抗原を用いた ICT の検討

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

#### (3) ヒトDNAを用いたLAMPの検討

LAMP法の感度並びに特異性向上のため、プライマーの設計、増幅条件の検討をおこなったが、顕著な改善は認められなかった。また、ヒトサンプル数の増加もエール大学の倫理委員会への申請不備のため、実現しなかった。

#### D. 考察

Bmn1-17組換え蛋白質を用いたELISAのヒト血清を用いたELISAでは、アメリカで陰性と診断された結果と高い相関が認められた。しかしながら、アメリカで陽性と診断された血清で、抗体検出ができなかった例が認められた。これは、アメリカでのELISAに用いられた抗原やELISAプレートのへのコーティング量、用いるヒト血清の希釈倍数による試験法の感度の違いによるものと考えられる。

また、bmn1-17組換え蛋白質を用いたICTでもELISAと同様、33例の陽性例が検出可能であった。しかし、アメリカで得られた陽性率もりも低い結果となった。今回血清は、提供された患者血清が少量に限られていたため、5倍希釈で用いた。5倍希釈では、2倍希釈に比較して、テストラインの発色が減弱する事をマウスの血清を用いた検討で経験しており、ICTの低い感染率がヒト血清の希釈倍数に起因する可能性が考えられる。また、ICTストリップの抗原の標識粒子の材質や大きな感度に影響することが報告されており、今後これらに関する検討し、検出感度を向上させることが必要である。

マウスの感染実験例ではLAMP法の感度はPCRに比較して10~100倍高いことがあきらかである。しかしながら、ヒトのDNAサンプルを用いた結果は、LAMP法の優位性は認められなかった。これは、*B. microti* DNAの18S rDNA配列に地域的相違が認められたため、今後改めて、プライマーの新規の設計、増幅条件の検討を行う必要がある。

#### 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。

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Munkhjargal T, Aboge GO, Ueno A, Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. 2016. Identification and characterization of profilin antigen among *Babesia* species as a common vaccine candidate against babesiosis. *Exp Parasitol.* 166:29-36.
- 2) Munkhjargal T, Ishizaki T, Guswanto A, Takemae H, Yokoyama N, Igarashi I. 2016. Molecular and biochemical characterization of methionine aminopeptidase of *Babesia bovis* as a potent drug target. *Vet Parasitol.* 221:14-23.
- 3) Munkhjargal T, Yokoyama N, Igarashi I. 2016. Recombinant methionine aminopeptidase protein of *Babesia microti*: immunobiochemical characterization as a vaccine candidate against human babesiosis. *Parasitol Res.* 15(9):3669-3676.

##### 2 書籍

なし

##### 3 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ウイルス感染症媒介蚊の生理・生態学的研究

研究分担者 沢辺京子 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

**研究要旨**

国内にはデングウイルスや日本脳炎ウイルスを媒介する蚊，ならびにウエストナイルウイルスの潜在的媒介蚊も含めると，国内の広範な地域にそれら媒介蚊が生息し，その生息密度は非常に高い．そのためいったん国内に外来性のウイルスが侵入すれば，国内流行が起きる可能性は高く，日本脳炎においても，今後の環境の変化や生活様式の変化に伴い，大規模な流行に繋がる恐れもある．これらウイルスのヒトへの感染リスクを考える上で，ウイルスを保有した蚊の諸性質を知ることが重要である．蚊の諸性質として，寿命，吸血行動の変化，交尾行動，飛翔能力，休眠性などが考えられるが，本年度は，雌蚊の寿命，幼虫の発育日数に注目し，ウイルス非感染のアカイエカおよびヒトスジシマカを用いて調査した．

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

本年度，ウイルス非感染蚊の成虫および幼虫の寿命に関する基礎的情報が得られた．今後は，それぞれに親和性のあるウイルスを感染させ，種々性質の比較を試みたい．

**A. 研究目的**

わが国には，デングウイルス媒介蚊のヒトスジシマカやウエストナイルウイルスの潜在的媒介蚊であるアカイエカが国内の広範に生息しており，特に首都圏の住宅地では2種を合わせると種構成の95%以上にも上ることが示唆されている．また，日本脳炎は国内に唯一常在している蚊媒介感染症であり，媒介蚊であるコガタアカイエカは

農村部の特に作舎周辺での生育密度は非常に高い．日本脳炎は，近年10名以下の患者数で推移していたが，2016年は1993年以降はじめて10名を超え(11名)，特に長崎県対馬市では短期間のうちに4名の患者の集積が見られた．また，2014年のデング熱国内流行時には，デングウイルスを保有したヒトスジシマカが多数存在する都内の公園が複数存在したことも記憶に新しい．こ

のように国内にはこれらウイルスを媒介する蚊は複数存在しており、その生息密度は想像以上に高い。

これらウイルスのヒトへの感染リスクを考える上で、ウイルスを保有した蚊の諸性質が非感染蚊と異なるのか、感染を有利にする傾向はあるか、などの情報は重要である。蚊の諸性質としては、雌蚊の寿命、吸血行動の変化、交尾行動、飛翔能力、休眠性などが考えられる。これら注目すべき蚊の性質の中で、成虫の寿命および幼虫の発育日数に注目し、各種ウイルス感染が蚊の諸性質に及ぼす影響を評価しようと計画した。生理・生態学的観点から蚊の諸性質を観察、調査した研究は、これまでも多く報告されている。しかし、蚊の性質は種によって大きく異なり、また、同一種であっても生息する地域により変異があることも知られている。さらに、ウイルス感染蚊に関する情報はほとんど得られていない。

そこで本研究では、まずアカイエカとコガタアカイエカの成虫の寿命、およびヒトスジシマカの幼虫の発育日数について、温度との関係を明らかにした。

## B. 研究方法

実験に用いた蚊は、アカイエカ NIID 系統（2008 年新宿区捕集後、25℃ 長日条件下で維持）、コガタアカイエカ出雲系統（2008 年出雲市捕集後、上記条件下で維持）、およびヒトスジシマカ海老名系統（2011 年海老名市捕集後、上記条件下で維持）である。

アカイエカおよびコガタアカイエカの幼虫を高温・長日（25℃、16L:9D）下で維持し、羽化後 4 つの異なる飼育条件（25℃、16L:9D; 20℃、11L:13D; 15℃、11L:13D; 10℃、

10L:14D）下で維持した雌成虫の生存日数を調べた。

ヒトスジシマカの乾燥卵を高温・長日（25℃、16L:9D）下に約 1 ヶ月維持し、その後 4℃、20℃、25℃ の処理区で維持し、羽化までの日数（幼虫発育日数）および羽化率を調査した。

## C. 研究結果

羽化後の成虫を上述した 4 つの処理区で維持した結果、アカイエカはコガタアカイエカに比べ寿命が長く、特に 15℃ 短日条件下では平均 155.5 日、最長で 282 日（コガタアカイエカは平均 80.9 日、最長 174 日）であった（図 1）。また、5℃ 前後の非常に低い温度条件下での平均生存日数はアカイエカは 66.6 日であったが、コガタアカイエカは 22 日であり、アカイエカは有意に長命であり、アカイエカは有意に長命であった（結果は省略）。

ヒトスジシマカの乾燥卵を 4℃ に 1 ヶ月間維持した場合、雄の幼虫期間は 15.3 日・雌は 17 日、2 ヶ月および 3 ヶ月間維持した場合はどちらも雄 17 日・雌 18 日であった（図 2）。20℃ に 1 ヶ月間維持すると雄の幼虫期間は 12 日・雌は 14 日となり、2 ヶ月および 3 ヶ月では雌雄どちらも 17 日であった。25℃ に 1 ヶ月間維持すると雄の幼虫期間は 16 日・雌は 17 日となり、2 ヶ月維持した場合は雄 14 日・雌 16 日、3 ヶ月間維持すると羽化個体は得られなかった。結果は省略するが、羽化率は 1 ヶ月後（25℃ 1 ヶ月を加えると産下後 2 ヶ月）はどの温度条件でもほぼ 100% であったが、4℃ に 2 ヶ月、3 ヶ月（上記同様に産下後 3 ヶ月後と 4 ヶ月後）維持した卵からの羽化率はいずれも 54%、20℃ ではいずれも 41% であった。



しかし、25℃に2ヵ月間維持した卵（上記同様に産下後3ヵ月後）からの羽化率は33.7%に低下し、3ヵ月後（上記同様に4ヵ月後）では全く羽化しなかった。これらのことから、ヒトスジシマカの乾燥卵は、いずれの温度条件下でも3ヵ月は生存し、羽化できること、羽化率は4℃>20℃>25℃の順に高いことが明らかになった。

#### D. 考察

ウイルスのヒトへの感染リスクを考える上で、ウイルスを保有した蚊の諸性質を知ることが重要である。例えば、2014年のデング熱国内流行時の代々木公園において、我々は、蚊からのウイルス検出を主な目的として成虫を捕集し、その一部の雌成虫を実験室内で維持したところ、捕集蚊の平均寿命は32日、最長で54日生存することが確認された。つまり、都内の公園で8月29日に捕集された雌蚊は平均して9月の末までは生存し、最長では10月中旬まで公園内に留まっていた可能性があったことが推察された。この成虫がウイルス保有蚊であったのか否かは確認できなかったが、8月29日に捕集した蚊の6.7%がウイルスを保有していると算出されており、かなりの保有率であったことが明らかになった。この公園では、陽性蚊が検出されなくなって以降も10月30日まで一部閉園の措置が継続されたが、非感染蚊の寿命と比べて感染蚊が長命であるのか、あるいは短命であるのか、これらの結果が蚊対策に影響する可能性もあると思われる。

2014年のデング熱国内流行の翌春の捕集蚊からはウイルスは検出されなかったが、デングウイルスの経卵伝搬は常に関心の的

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

本年度は、ウイルス非感染蚊の寿命・発育日数について調査し、概ね計画通りに遂行でき、情報も蓄積することができた。しかし、事業開始時の予定では、本年度中に各種ウイルス感染蚊の諸性質を調査し、非感染蚊と比較することを目指していたので、計画通りに進められたとは考えていない。本調査と並行して、デングウイルス感染ヒトスジシマカを人工吸血装置を用いて作出していたが、実験に供する数の感染蚊を得ることができず、計画を延期した。本年度までに得られた情報をもとに、今後は、それぞれに親和性のあるウイルスを感染させた感染蚊との比較を試みたい。

#### E. 結論

アカイエカはすべての温度条件でコガタアカイエカよりも有位に長命であった。

ヒトスジシマカの乾燥卵は、4℃および20℃では4ヵ月は生存し、羽化し得ることが明らかになった。羽化率は4℃>20℃>25℃の順に高かったが、25℃では4ヵ月後に羽化成虫は全く得られなかった。

#### E. 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

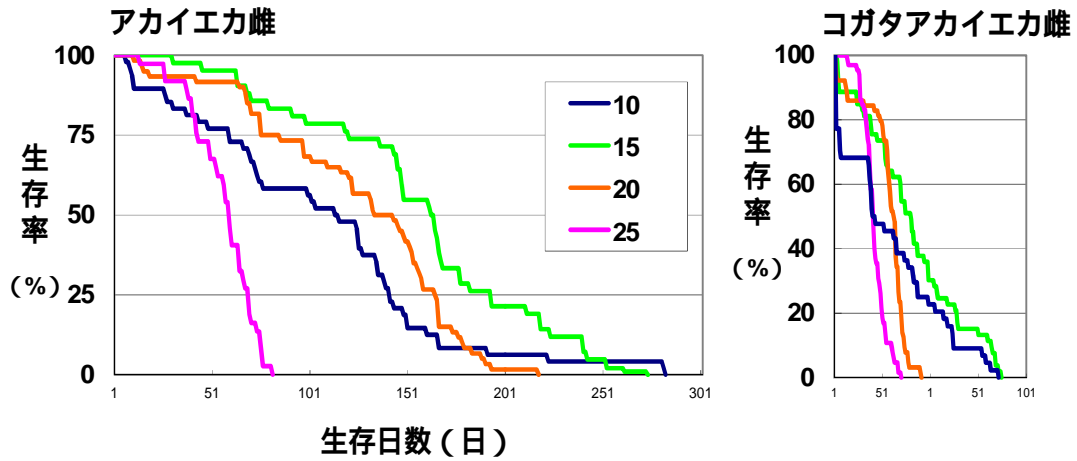


図1 異なる温度下での成虫の生存日数 (左：アカイエカ，右：コガタアカイエカ)

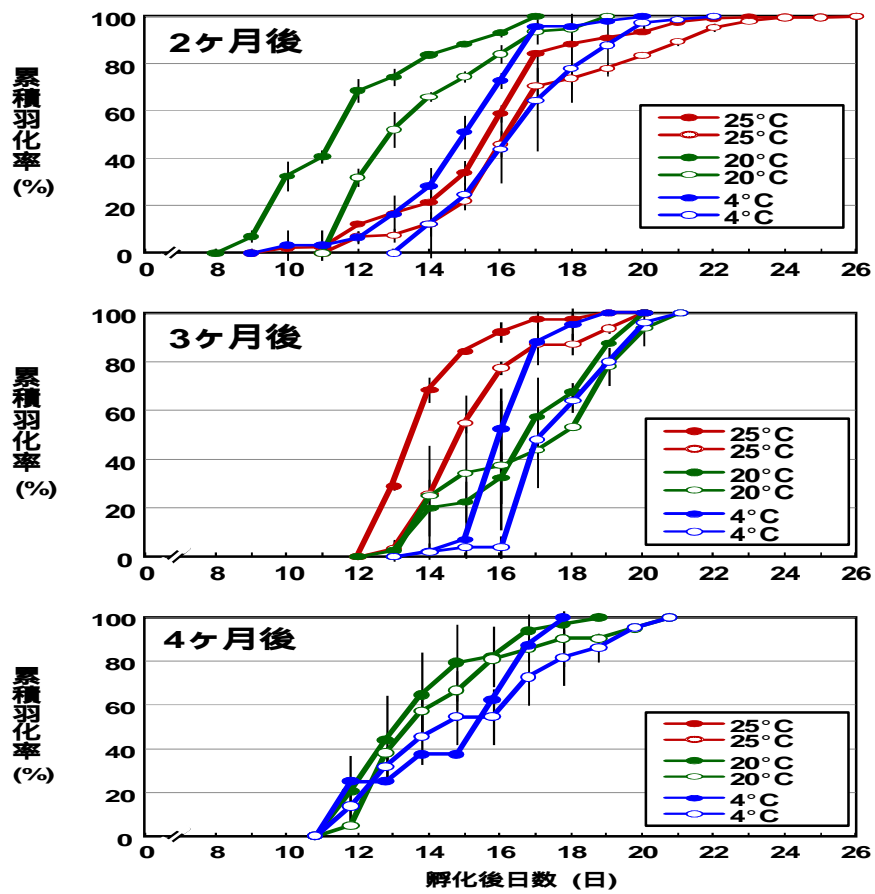


図2 ヒトスジシマカ卵を異なる温度下に維持し孵化させた幼虫の発育日数

## ウエストナイル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

研究分担者 平 力造 （日本赤十字社 血液事業本部）

研究協力者 石野田 正純 （日本赤十字社 血液事業本部）

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

### A.研究目的

ウエストナイル熱国内発生時における輸血用血液製剤の安全性を確保するために、平成 26 年のデング熱の国内発生時の特定地域における献血制限や献血後 14 日以内に急な発熱・発疹等があった場合の対応状況を振り返り問題点等を整理する。更には、ウエストナイルウイルス(WNV)の検査体制について、血液事業情報システムの運用も含めたシミュレーションを行い、対応マニュアル案を策定する。

### B.研究方法

#### （１）デング熱の国内発生時の献血制限等の対応

平成 26 年当時の厚生労働省の通知等、感染症研究所のマニュアルや日本赤十字社の通知等を収集し、その対応の取り進め方等を検討した。その後、ジカウイルス発生時の当該通知類を参照しながらシミュレーションを行い、その実効性を検証した。

#### （２）WNV の検査体制について血液事業情報システムの運用も含めたシミュレーション

### と対応マニュアル案の策定

可能な限り GMP に準じた WNV の検査対応が実施できるように、検体搬送容器の選定や血液事業情報システムの関わり方について検討しながら、WNV の検査体制を整理し、対応マニュアルを策定し検証した。

### C.研究結果

#### （１）デング熱の国内発生時の献血制限等の対応

日本赤十字社では、「デング熱の国内感染症事例について」（平成26年8月27日付薬食血発第0827第1号厚生労働省医薬食品局血液対策課長通知）により、輸血によるデング熱の感染被害の防止対策を策定し平成26年8月27日よりデングウイルスの感染地域（対象地域）とされた東京都、埼玉県内の献血会場に、デング熱に関する周知用ポスターの掲示を開始した。献血の受付時及び問診等における対応として献血希望者に対して発熱等の健康状態の確認を徹底し、必要に応じて非接触型

体温計等を用いて体温測定を実施し、検診医師が献血の適否を判断し、また、献血された血液の品質確保等に資するために献血後14日以内に急な発熱、頭痛又は皮膚の発疹等があった献血者は、採血を行った血液センターに連絡をお願いし、輸血用血液製剤に使用しないこととし、更には保管検体によるデングウイルスのNATを行い安全性の評価を行う遡及調査を開始した。

その後、対象地域の拡大に伴い翌日には、千葉県、神奈川県が追加され、更には9月5日からは全国の都道府県の献血会場が対象となった。

デング熱に関する献血制限の内容は、9月5日より東京・代々木公園などの厚生労働省の発表した感染発生地域に行かれた方は、最後に行かれてから4週間献血をご遠慮いただき、9月11日より新宿中央公園、外堀公園が追加された。8月27日からデング熱対策が解除された11月14日までの間に、輸血によるデング熱の感染被害は確認されなかった。

遡及調査の結果から献血後に発熱したと申告のあった献血者23名の保管検体を調査した結果、デングウイルスに感染した献血者は確認されなかった。

厚生労働省と国立感染症研究所と日本赤十字社の情報共有が円滑になされ、更には日本赤十字社内部の情報伝達についても迅速かつ適切に対応がされていた。

この経験が、平成28年度のジカウイルス感染症への対応時の日本赤十字社内部でのシミュレーションが円滑に行われたことから、ウエストナイル熱国内発生時についても同様な対策を予め準備することができた。

(2) WNV の検査体制について血液事業情報システムの運用も含めたシミュレーションと対応マニュアル案の策定

平成 26 年に個別 NAT (Novartis 社 PANTHER システム) 導入後、WNV-NAT を実施するためには、新たにプール検体を作製する必要がある。そのため、関東甲信越 BBC のプール機を 1 台残すこととしたが、プール検体作製のデータフローが根本的に異なることから、新たにプール検体作製のシ

ステム開発をおこなった。

WNV-NAT は、関東甲信越 BBC で実施することから検体搬送容器(日赤統一仕様)を指定し、そのバリデーション結果(温度推移グラフ)を確認し、検体輸送時に同容器を用いた場合 11 時間は使用可能であることを確認した。

WNV 検査マニュアル(案)については、検査実施部門である関東甲信越 BBC において作成し、その内容は、「検査用検体の処理」、「プール検体の作製」、「WNV 検査の実施」、「検査結果確認・出力」、「検査結果の報告」、及び「作業後の清掃及び次の検査の準備」で構成されている。

#### D. 考察

(1) デング熱の国内発生時の献血制限等の対応

平成 26 年に発生したデング熱の国内感染発生時の対応を振り返ることで、今後発生する可能性のある蚊媒介感染症への迅速な輸血用血液製剤の安全対策を講じるための準備が整った。

(2) WNV の検査体制について血液事業情報システムの運用も含めたシミュレーションと対応マニュアル案の策定

WNV の国内感染が発生し、輸血用血液製剤の安全性を担保するために検査が必要な状況下における検体搬送、プール検体の作製及び検査の実施にかかる WNV 検査マニュアル(案)を策定したことで、安定的な検査実施体制が構築された。

#### E. 結論

本年度の研究によって、WNV の国内感染が発生した場合の、輸血用血液製剤の安全性を担保するために献血受付時、検査及び献血後情報までの一連の対応を準備し、シミュレーションを行うことができた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

**1. 論文発表**

なし

**2. 学会発表**

なし

**H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）**

特許取得 なし

実用新案登録 なし

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

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（埼玉医科大学医学部 准教授）

研究要旨

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

また、vCJD に関する情報を集め、英国において 2016 年にプリオンの codon129 が MV 型の初めての発症者が報告された。MV 型は MM 型に比べて潜伏期が長いことが推定されており今後の発生動向に注意する情報であった。

## 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。白血球除去フィルターが感染細胞の除去に有効であることを昨年度に明らかにしたので今年度は感染細胞から放出される無鞭毛型原虫も感染細胞と同様に除去できるか評価することにした。しかし、無鞭毛型原虫の培養法は検索した範囲ではないため最初に無鞭毛型原虫の培養法の確立を重なった。また、変異型 Creutzfeldt-Jakob (vCJD) の世界的な発生状況も合わせて調査した。

## 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 添加シヨウジョウバエ細胞培養液で 26、炭酸ガス濃度 5% で培養した。この条件では鞭毛型原虫が増殖する。ヒト単球細胞株である THP-1 にホルボールエステルを最終濃度 100nM になるように添加し、24 時間 37 で培養し、マクロファージ様細胞株を誘導した。また、HepG2 (肝癌細胞株)、HuH7 (肝癌細胞株)、A549 (肺癌細胞株)、NJK (絨毛癌細胞株)、VERO、NEC8 (胚細胞株)、N-TERA (胚細胞株) は無刺激で MOI 10 になるように鞭毛型原虫を添加し、37 で培養した。感染 1 日、3 日、5 日後に培養液を用いて洗い、添加した鞭毛型原虫を出来るだけ除去した。感染 7 日後に各細胞株を検鏡して細胞中の無鞭毛型原虫の有無を観察した。また、これらの細胞株の培養上清約 10mL を最初に 15 $\mu$ m、次に 5 $\mu$ m のポアサイズのフィルターで濾過し、1300g で 10 分間遠心してペレットを得た。ペレットは 500 $\mu$ L の培養液で溶解した。これを 96 穴マイクロプレートに 1X から 10<sup>5</sup> まで 10 倍ずつ段階希釈し、26 にて 3 週間培養した。また、THP と NEC8 細胞を 1X10<sup>4</sup>/well ずつ 96 穴マイクロプレートに播き、同様に処理して集めた検体を 1X から 10<sup>5</sup> まで 10 倍ずつ段階希釈し、これらの細胞に添加した。37 で 5 日間培養後、26 にて 3 週間培養し、鞭毛型原虫の増殖の有無を解析した。

### (2) 変異型 CJD 発生動向

vCJD の発生状況を英国の National CJD Research & Surveillance Unit と米国 CDC の CJD サーベイランスから経時的に情報を集めた。2016 年のフランスの発生状況は 2015 年度からの増加数で評価した。

## C. 研究結果

### (1) Leishmania の無鞭毛型原虫の培養法

感染させた各種細胞株を検鏡すると THP-1 の他に HuH7 (肝癌細胞株)、A549 (肺癌細胞株)、NJK (絨毛癌細胞株)、NEC8、N-TERA (胚細胞株) の細胞質

に Leishmania の無鞭毛型原虫を観察できた。これらの上清からフィルターを使用することで感染細胞を除去し、遠心によって無鞭毛型原虫が存在すると考えられる沈殿を得た。3 週間、沈殿を溶解した溶液を 25 で培養したところ、THP-1、A549、NJK、NEC8 から鞭毛型原虫の増殖が確認できたが、いずれも原液からであり、希釈した検体からは鞭毛型原虫の増殖は認められなかった。また、沈殿から得られた検体を THP-1 や NEC8 に 37 で感染させ、その後 25 で培養した場合も原液を感染させたウエルに鞭毛型検体が確認できたが、10 以上に希釈した検体からは原虫の増殖は確認できなかった。

### (2) 変異型 CJD 発生動向

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

## D. 考察

輸血による Leishmania 感染防止に白血球除去フィルターが有用であることを昨年度報告したが、人体内では Leishmania 原虫は、マクロファージに感染し無鞭毛型になる。成書では、サシチョウバエは Leishmania が感染したマクロファージを吸血することで無鞭毛型原虫がサシチョウバエの細胞に感染して鞭毛型原虫になると記載されている。しかし、サシチョウバエが吸血する量程度の中に感染したマクロファージが存在するのか疑問が生じる。また、人体内で原虫の感染が拡大するためには、感染細胞から放出された無鞭毛型原虫が次々にマクロファージに感染することが必要と考えられる。そのため白血球除去フィルターが感染細胞だけでなく無鞭毛原虫も除去できるのか評価することは重要である。感染細胞から放出される無鞭毛型原虫を集め、26 で培養すれば鞭毛型原虫になるものと考え実験を繰り返したが増殖しなかった。そこで THP の実験と同様に無鞭毛型を 1 度細胞に感染させ、それを 26 で培養する方法に変えてみたが有意な感染性は確認できなかった。さらに感染に用いた鞭毛型原虫や感染細胞が培養上清に混入してためし試行錯誤の末、フィルターを組み合わせることによって細胞の混入を少なくすることができた。

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。vCJD の特徴として、これまで vCJD として診断され、プリオンタンパクの codon129 の多型性が解析できた死亡例は全て MM 型であったことである。英国国民の中で MM 型を示す健常人の割合は 44%、MV 型 45%、VV 型 11% であることから MM 型が vCJD に感染し、



発症しやすいと考えられてきた。動物実験から MM 型に比べ MV 型は発症まで長期間を要することが報告されているため、今回の MV 型の報告は、今後 MV 型の発症例が増加する可能性を示すものである。英国での虫垂切除検体を用いた疫学調査において、未発症の MV 型感染者が存在していることが既に分かっており、今後の発症例の動向に注意する必要がある。なお、英国は白血球除去フィルターを導入してから輸血による感染例はない（日本も導入している）。

E. 結論

輸血による Leishmania 感染症を防止するために無鞭毛型原虫の培養系の構築を目指したが目的を達成できなかった。英国の vCJD 死亡例から初めての MV 型症例が報告された。MV 型は発症まで長期間を要することから今後の発生動向に注意する必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kiyoko Nojima, Kazu Okumaa, Masaki Ochiai, Madoka Kuramitsu, Kenta Tezuka, Mieko Ishii, Sadao Ueda, Takashi Miyamoto, Koichiro Kamimura, Enki Koue, Sanae Uchida, Yoshiharu Watanabe, Yoshiaki Okada, Isao Hamaguchi : Establishment of a reference material for

standardization of the anti-complementary activity test in intravenous immunoglobulin products used in Japan: A collaborative study. Biologicals, vol.46. 68-73. 2017

2. 学会発表

- 1) 岡田義昭, 小林清子, 池淵研二: 輸血用血液製剤の保存温度や白血球除去による Leishmania 原虫の不活化及び除去効果に関する研究, 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会, 平成28年4月, 京都
- 2) 玉栄建次, 青木麻衣子, 鈴木雅之, 内野富美子, 山田攻, 松本慎二, 棚沢敬志, 小林清子, 池淵研二, 齊藤妙子, 岡田義昭: 当院における不規則性抗体陽性患者への不規則カード発行と今後の課題, 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会, 平成28年4月, 京都
- 3) 山田攻, 鈴木雅之, 内野富美, 小林清子, 池淵研二, 岡田義昭: Ko 解凍赤血球液輸血を経験した抗 Ku 保有症例, 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会, 平成28年4月, 京都
- 4) 水沢左衛子, 落合雅樹, 草川茂, 内田理恵子, 川村恵理子, 岡田 義昭, 山口照英, 浜口功: HIV-RNA 国内標準品の力価の再評価のための国内共同研究, 第 64 回日本ウイルス学会総会, 平成28年10月, 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

これはこの111人は全く129M/M

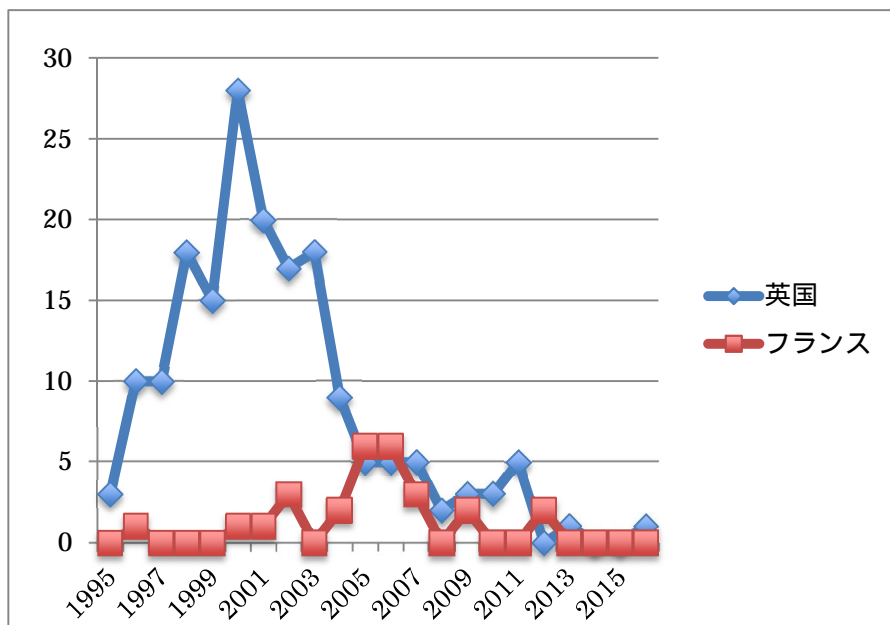


図 1 英国とフランスにおける vCJD 死亡数

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

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

研究分担者 高崎 智彦（神奈川県衛生研究所 所長）  
研究協力者 鈴木 理恵子（神奈川県衛生研究所 微生物部）

研究要旨：2014年夏に69年ぶりに国内流行したデング熱とよく似た臨床症状を呈するジカ熱（Zika fever）が2013年の11月から太平洋島嶼国において流行した。2013年12月に別々にフランス領ポリネシアのボラボラ島を旅行した熱発患者に関して、デングウイルスおよびジカウイルスに関する実験室診断を実施したところ、尿からのウイルス遺伝子検査、特異的IgM抗体検査によりジカ熱と確定診断した。また、2014年の6月にタイからのジカ熱輸入症例を確認した。その後ジカ熱流行は、2015年に太平洋島嶼国から中南米へと拡大した。世界的なデング熱、チクングニア熱流行にジカ熱が加わったことで、血液製剤及び献血血液における蚊媒介性ウイルス感染症のウイルス遺伝子検査が極めて煩雑になった。そこで、ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルスのマルチプレックス遺伝子検出法に関して検討、評価した。

A. 研究目的

ジカウイルス、デングウイルス、チクングニアウイルスはヤブカによって媒介され、その臨床像は類似している。2015年に入りジカウイルス感染症はブラジルなど中南米において流行し、妊婦がジカウイルスに感染すると新生児に障害をきたす先天性ジカ症候群を引き起こすことが明らかとなった。蚊媒介性ウイルス感染症の再興とともに、デングウイルス1型、2型、3型、4型に加えてチクングニアウイルス、ジカウイルスその検査は煩雑になる。2014年8月にデング熱国内流行が発生した我が国において、ジカ熱、チクングニア熱流行の可能性も考慮し、血液製剤及び献血血液にジカウイルス、チクングニアウイルスが混入する可能性を想定しておく必要がある。

B. 研究方法

ジカウイルス、チクングニアウイルス、デングウイルスを同時に検出できる TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)（以下3点の参考文献に基づいて構築されたものであるが詳細は非公表； Dumoulin A, Marti H, Panning M, Hatz C, Hirsch HH. 2008. Pandengue virus detection by PCR for travelers returning from the tropics. *J. Clin. Microbiol.* 46:3104. Yap G, Pok KY, Lai YL, Hapuarachchi HC, Chow A, Leo YS, Evaluation of chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e753.

Alyssa T Pyke, Michelle T Daly, Jane N Cameron, Peter R Moore, Carmel T Taylor, Glen R Hewitson, Jan L Humphreys, Richard Gair Imported zika virus infection from the cook islands into australia, 2014. PLoS Curr: 2014, 6.) を、評価した。それぞれのウイルスおよびインナーコントロールは以下に如く 5 つの蛍光色素で検出される。Zika (FAM), Pan Dengue (VIC), Chikungunya (ABY), & PPIA-endogenous control (JUN) plus 1step RT-PCR component with a passive ref (MP) である。評価の材料としては、デングウイルス感染細胞上清、デング熱患者急性期血清、ジカウイルス感染細胞上清、チクングニアウイルス感染細胞上清から RNA を抽出し、感度および特異性を検討した。

#### C. 研究結果

デングウイルス 1 ~ 4 型 (感染研標準株) は検出された。ジカウイルス (PRVABC59 株; アジア型) は検出されたが、アフリカ株 (MR766 株) は検出できない判定であった。ただしそのリアルタイム PCR の増幅カーブを目視するとなだらかな上昇は存在した。チクングニアウイルスも検出された。

また、デング熱臨床検体での評価は、従来法 RT-PCR あるいはリアルタイム PCR と比べてその感度は同等以上であった。

内在性コントロール (PPIA Cyclophilin 遺伝子) は、検体として血清を用いると内在性コントロールの上昇が低く検出されない場合があった。

#### D. 考 察

評価したキット TaqMan Zika Virus

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

#### E. 結 論

ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス\_マルチ遺伝子検出系は、血液や血液製剤のようなデングウイルスの血清型別が重要ではなくウイルスの有無を判定する場合には、検査は煩雑でなく有用である。また、患者の診断においても治療上は血清型は急いで明らかにする必要はないので、まずこの検査を実施した後、デングウイルス血清型を決定すればよいのであるから、有用な検査法であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

表

	Sample	過去の記載 Data		2016.6 実施					2016.11 実施
		RT - PCR	NS1	RT-PCR	リアルタイム PCR	Multiplex		NS1	Multiplex
						[1回目]	[2回目]		[Triplex]
1	14D011	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
2	14D022	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
3	14D024	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
4	14D025	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
5	14D032	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
6	14D033	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
7	14D036	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
8	14D037	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
9	14D038	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
10	14D039	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
11	14D040	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	+	+
12	14D041	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
13	14D042	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
14	14D043	<b>D2</b>	+	NT	+	-	+	±	+
15	15D001	<b>Dus</b>	+	-	-	-	+	+*	+
16	15D002	<b>D4</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
17	15D003	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
18	15D004	<b>D2</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
19	15D005	<b>D2</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
20	15D006	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
21	15D007	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
22	15D008	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
23	15D009	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
24	15D010	-	-	NT	-	-	NT	NT	-

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HTLV-2については、近年日本で使用されるHTLV-1抗体検査法にも取り入れられ、今後はHTLV-1およびHTLV-2の同時検査が主流となることが予想される。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、HTLV-2の新規高感度検出系を確立し、検出感度について検討した。

研究協力者

倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部  
主任研究官

手塚健太 同上 任期付研究員

浜口 功 同上 部長

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, HTLV-1 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、近年の抗体検査法の発展により HTLV-1 抗体検査に HTLV-2 抗体検査も含むことができるようになり、今後は HTLV-1/2 同時測定となることが期待されている。これまで日本では献血や妊婦のスクリーニング検査、その他 HTLV-1 関連疾患疑い等において、HTLV-2 抗体検査は行われておらず、HTLV-2 の感染が検出される事は極めて稀であった。よって、HTLV-2 抗体陽性例に対して感染を確定するための1つの重要なツールである核酸検査法についても十分に整備されていない。

そこで本研究においては、HTLV-2 核酸検査用の高感度 Primer & Probe を大規模スクリーニングすることにより、新規に高感度 Primer & Probe を多数同定し、同定した HTLV-2 Primer & Probe にこれまで同定した HTLV-1 高感度 Primer & Probe を組み合わせ、HTLV-1/2 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

・HTLV-2 Primer & 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 I PCR Master Mix (Takara) の推奨プロトコルに従い、

Probe (FAM 標識) のスクリーニングには Taqman Fast Advanced master mix qPCR キット (Applied Biosystems) の推奨プロトコルに従って行った。最も効率良く PCR が実施されるオリゴセットを同定した。

・HTLV-2ゲノムDNAの精製

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

C. 研究結果

・HTLV-2特異的高感度Primer及びProbeの同定

Forward および Reverse Primer セットを 183 セット設計した。HTLV-2 感染細胞 MoT 細胞株および Ton1 細胞株より抽出した genomic DNA と pH6neo (HTLV-2 分子クローンプラスミド) を用いて SYBR Green I で qPCR による Primer スクリーニングの結果、52 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、登録配列との相同性を考慮し、Taqman MGB Probe を設計した。その結果 27 セットの Probe の設計が可能であった。MoT 細胞 genomic DNA を用いて Taqman qPCR を行った。その結果、27 セット中 5 セット (008, 026, 071, 088, および 100) が極めて優れた核酸増幅を示した (Figure 1)。同定した 5 セットのそれぞれの HTLV-2 のターゲット遺伝子領域は、008: LTR, 026: gag, 071: pol, 088: pol, 100: env であった。

Figure 1. HTLV-2 高感度核酸検査用 Primer & Probe のスクリーニング

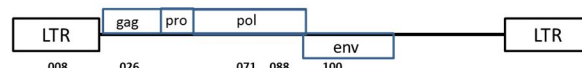
A. HTLV-2 高感度 Primer & Probe スクリーニング結果のフロー

Primer設計	配列チェック (登録株との比較)	SYBR Screening	Probe合成	Probe Screening
183	140	52	27	5

B. HTLV-2 高感度 Primer & Probe セット

- FAM-MGB 3セット : 008, 026, 071
- FAM-TAMRA 2セット : 088, 100

C. HTLV-2 高感度 Primer & Probe セットのターゲット領域



## ・ Multiplex qPCRによるHTLV-1/2核酸検出系の検討

抗体スクリーニング検査では、核酸検査によりHTLV-1およびHTLV-2の判別を行うことが予想されることから、1チューブでHTLV-1/2を判別できるMultiplex化が必要である。そこで、これまでにHTLV-1核酸検査用に同定した高感度Primer & Probeと本研究で同定したHTLV-2核酸高感度Primer & Probeを組み合わせ、Multiplex qPCR系を作製した。HTLV-1は、高い相同性でHTLV-1ゲノムと一致する2セット (pX2, 084)を使用した。HTLV-2については、登録配列数が少ないことから遺伝子多型による取りこぼしを防止するために、同定した5セットの中から3セット (008, 026, 071)を選び、HTLV-1および2を合わせて5-plex qPCRとした。HTLV-1陽性例については、HTLV-1のみが検出され、HTLV-2感染細胞ではHTLV-2のみが検出されることを確認した。また非感染者PBMCから抽出したgenomic DNAでは、HTLV-1/2のどちらも検出されないことを確認した (data not shown)。

5-plex qPCRについて、それぞれのsingle qPCRと既報のHTLV-2核酸検査法と感度比較した。MoT genomic DNAをPBMC genomic DNAで超低濃度に希釈した検体を使用して、HTLV-2核酸の検出を試みたところ、5-plex法の検出限界の濃度は、それぞれのsingle qPCRの検出限界濃度とほぼ同等であり、また既報の2つの方法 (Moens et al. 2009およびQater et al. 2011) と同等以上であることが明らかとなった (Table 1)。特にPrimer & Probe 008は、LTRに設定されており、HTLV-2 genome内に2コピー存在する領域であることから高感度であることが期待できる。

以上のことから、構築した新規マルチプレックスPCR法は、感度・特異性共にシングルプレックスPCRや既報の方法と同等以上の高感度法であり、HTLV-1/2の判別にも簡便で有用な手法であると考えられた。

Table 1. HTLV-2核酸検査法の感度比較結果

MoT / PBMC % (W/W)	HTLV-2 concentrate*	008	026	071	NIID 5-plex	Moens	Water
0.001%	1 copies/ 1.E+05	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
0.0005%	5 copies/ 1.E+06	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
0.000125%	1 copies/ 1.E+06	3/3	3/3	1/3	2/3	3/3	2/3
0.000031%	3 copies/ 1.E+07	4/10	1/10	1/10	6/10	1/10	2/10
human gDNA		-	-	-	-	-	-

\* MoTの細胞あたりのHTLV-2感染コピー数を1コピーとして換算した場合の検体中のHTLV-2コピー数。(1μgは約1.5x10<sup>8</sup>細胞であることから、実際には、MoTの細胞あたりの感染コピー数は1コピー以上と予想される。)

## D. 考察

HTLV-2抗体検査は、近年日本でもHTLV-1抗体検査に含まれるようになったが、陽性時の確定診断

のための核酸検査等の方法の整備が整っていない。現時点では、HTLV-1/2抗体陽性例に対する確認検査用に日本で使用されているWestern Blot法にはHTLV-2抗体の検出が含まれおらず、HTLV-2抗体陽性確定例は、直ちに発見されるとは考えにくい。WB法を改良した高感度なHTLV-1/2検出法も開発されており、近い将来には高感度なHTLV-2核酸検査は必須となると考えられる。

今回の研究で行ったPrimer及びProbeの大規模スクリーニングで同定したSYBR Green I用Primer、およびその後の高感度Taqman qPCR Probeは、極めて優れたPrimerおよびProbeが同定されていると考えられることから、今後のHTLV-1/2抗体スクリーニング検査陽性例の確定診断法の1つとして応用が期待される。

## E. 結論

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

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Kazu Okuma, Isao Hamaguchi, et al. Development of a novel dengue virus serotype-specific multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for blood screening. Transfusion 2016;56:3094-100.

### 2. 学会発表

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



分担研究報告書

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

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 (日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所 所長)  
佐山勇輔 (日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)  
高倉明子 (日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)  
松本千恵子 (日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)  
古居保美 (日本赤十字社血液事業本部)  
平 力造 (日本赤十字社血液事業本部)

**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、主に中南米諸国で流行している。感染者(キャリア)の末梢血や臓器には原虫が存在するため、キャリアからの輸血や移植などにより患者に *T. cruzi* が伝播する可能性がある。これまで、シャーガス病非流行地域であるカナダやスペインでは、中南米諸国出身献血者からの輸血により *T. cruzi* の感染が報告されている。日本国内には中南米諸国出身者や中南米諸国長期滞在者が多数居住しているが、それらの人々の献血血液の *T. cruzi* 抗体陽性率などは不明である。そこで本研究では、シャーガス病のリスクがあると考えられた献血者(中南米諸国出身者や中南米長期滞在者)を対象に抗体検査を実施した。検体は、2002年4月1日から2012年10月14日までは、日本赤十字社の献血者情報データベースに保管されていた中南米滞在歴を有する献血者のうち、血小板製剤の製造履歴がある献血者を対象とした。また、2013年1月8日から2016年8月21日までの期間に上記の有リスク献血者によって献血された血液を検体として用いた。抗体検査法は、ELISA(オーソ社)でスクリーニングを行い、陽性検体は同ELISAで二重試験を行った。ELISAで2/3以上陽性を示した検体は、CLIA(アボット社)を用いて確認試験を行った。確認試験で陽性を示した検体を抗体陽性と判定した。のべ18,487検体を検査し3検体(0.016%)が抗体陽性と判定された。抗体陽性者3名は、全て中南米諸国出身者であった。1名の抗体陽性者は、複数回献血歴があったため遡及調査を行った。検査可能であった5名の受血者は、全て抗体陰性であった。日本での献血血液においては、*T. cruzi* 抗体陽性者は中南米諸国出身者に限られたが、一定の感染者が認められた。しかしながら、これまで日本国内では、輸血を介した *T. cruzi* 感染は確認されていない。

**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り、主に、中南米諸国地域で流行している。

ヒトへの感染は、ベクターであるサシガメによる刺咬および汚染された食品による感染の他、*T. cruzi* 感染者(キャリア)からの垂直感染や輸血および臓器移植による感染が



ある。

シャーガス病非流行地域であるカナダやスペインでは、これまで中南米諸国地域出身献血者由来の血液を介し感染が報告されている。原因となった血液製剤は、主に血小板製剤であった。

日本国内にも、中南米諸国出身者や中南米諸国への長期滞在者が多数居住し、その中には *T. cruzi* 感染者が存在していることがすでに報告されている。また血液センターでは中南米出身者・長期滞在者による献血も多数受け入れている。そのため、シャーガス病にリスクがあると考えられる上記の献血者の血液は、2012年10月15日から血漿分画製剤用の原料血液への使用に制限する安全対策を実施している。しかしながら、シャーガス病にリスクがあると考えられる日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率は不明である。

そこで本研究では、シャーガス病にリスクがあると考えられる日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率を調査した。

## B. 研究方法

### (1) 国際標準品を用いた *T. cruzi* 抗体検査試薬の感度の評価

WHO国際標準品(NIBSC, 11/216, TcIおよびTcII)は、*T. cruzi*抗体陰性血漿を用い段階希釈を行った。段階希釈した標準品を用い、各抗体検査試薬の感度を求めた。抗体検査試薬は、(1)ELISA(オーソ社)、(2)CLIA(アボット社)、(3)ESA(アボット社)、(4)IFA(in-house)、(5)PA(富士レビオ)、(6)ICT-1(Chembio社)、(7)ICT-2(Inbios社)、(8)ICT-3(Inbios社)を用いた(表1)。IFAは、

当施設で培養した *T. cruzi* を抗原として作成した。作成したIFAのカットオフ値は、80倍希釈とした。IFAを除いた検査試薬は、添付文書の方法に準じて行った。

### (2) シャーガス病のリスク因子および献血者検体

2013年1月8日から2016年8月21日に「中南米諸国で生まれた、又は育った」、「母親が、中南米諸国で生まれた、又は育った」、「中南米諸国に通算4週間以上滞在、または居住したことがある」をシャーガス病のリスク因子とし、問診時に献血者に伺い、該当した献血者のうち、調査への同意が得られた献血者の血液を採取した。

(倫理面への配慮)

本研究は、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2012-009)

### (3) 保管検体

2002年4月1日から2012年10月14日に採血され、日本赤十字社の献血者情報データベースに保管されていた献血者のうち、過去に中南米諸国への滞在歴等を申告され、血小板製剤を製造した献血者の保管されていた血液を採取した。

### (4) 抗体検査法および遺伝子検査法

抗体検査法は、ELISAを用いスクリーニングを行った。反応が認められた検体は、同じELISAを用い二重試験を行った。ELISAにより2/3以上陽性を示した検体は、CLIAを用い、確認試験を行った。確認試験で陽性を示した検体を、抗体陽性と判定した。

遺伝子検査法は、まず1mLの血液を用いQIASymphony DNA MIDI Kit(QIAGEN)により

DNA抽出をおこなった。抽出したDNAを用い、TaqMan PCR法(*T. cruzi*サテライトDNAをターゲットとした各プライマー・プローブ)で *T. cruzi* DNAの増幅を試みた。

## C. 研究結果

### (1) 国際標準品による *T. cruzi* 抗体検査試薬の感度評価

段階希釈した各国際標準品を用い、計 8 種類の試薬の感度評価を行った。その結果、TcI 標準品においては、CLIA が最も感度が高く 0.016 IU/mL であった。次いで ELISA および ESA の感度が高かった(表 2)。TcII 標準品においても TcI と概ね同様の結果であった。

### (2) リスク因子に該当した献血者検体における *T. cruzi* 抗体陽性率および遺伝子検査の結果

2013 年 1 月 8 日から 2016 年 8 月 22 日までに該当した献血者検体は 13,709 本、2002 年 4 月 1 日から 2012 年 10 月 14 日に該当した献血者検体は 4,778 本、合計 18,487 検体について抗体検査を行った。その内、ELISA により複数回陽性 (2/3 以上) を示した検体は、12 検体(0.065%)であった。また、ELISA および CLIA で陽性を示し、抗体陽性と判定された検体は、3 検体(0.016%)であった。3 名とも中南米諸国出身者による 2013 年以降の献血であり、その内 2 名は、リスク因子の + に該当し、1 名は のみに該当した。TaqMan PCR 法により 3 名の抗体陽性献血者のうち、1 名から *T. cruzi* DNA の増幅が認められた。あとの 2 名の血液からは *T. cruzi* DNA は検出されなかった。

### (3) 遡及調査

*T. cruzi* 抗体/*T. cruzi* DNA が陽性であった 1 名は、過去に複数回の献血歴があり、11 本の輸血用血液製剤が医療機関に供給されていたため、遡及調査を実施した。その結果、受血者 5 名はすでに多病死していたが、検査可能であった 5 名の受血者は、全て抗体陰性であった。残り 1 名は高齢のため、承諾が得られなかった。

## D. 考察

入手可能であった *T. cruzi* 抗体検査試薬について、国際標準品を用いて感度評価を行った。CLIA および ELISA は、高い感度を有しており、本研究で使用した抗体検査試薬は、適切な検査法であったと判断された。

シャーガス病のリスクがあると考えられた国内の献血者検体を用いて *T. cruzi* 抗体検査を行った。その結果、該当した 18,487 検体中、ELISA のみ陽性は 12 検体、ELISA および CLIA 両検査で陽性を示したのは 3 検体であった。異なるメカニズムの二つの方法を用いることによって高い特異度も実現されていると考えられた。カナダやアメリカなどのシャーガス病スクリーニング検査でも異なる二種類の方法により *T. cruzi* 抗体検査を行い、結果を確定している。今回、シャーガス病に関する安全対策を実施した 2012 年 10 月 15 日以前の献血で、中南米諸国に滞在歴がある献血者から採血され、血小板製剤に使用された血液について抗体検査を行ったが、抗体陽性者は認められなかった。そのため、安全対策以前の輸血を介した *T. cruzi* 感染の可能性は、限りなく低いと考えられた。

*T. cruzi*抗体陽性/DNA陽性の1名には、複数回献血歴があったため、遡及調査を実施した。検査が可能であった受血者5名は、全て抗体陰性であり、当該献血者由来の血液製剤を介した*T. cruzi*感染は、認められなかった。これら5名に使用された血液製剤は、全血採血由来の新鮮凍結血漿および赤血球液であった。これまで非流行地域での輸血を介した*T. cruzi*感染の原因製剤は、主に血小板製剤であり、一部全血製剤が原因であるとされている。昨年度の我々の報告では、全血採血由来の製剤に使用される白血球除去フィルターおよび新鮮凍結血漿、赤血球液の保存条件は、*T. cruzi*の数および細胞への感染能を低下させることを示した。今回、輸血を介した*T. cruzi*感染が認められなかったのは、使用されていた製剤の種類も一因であった可能性もある。

シャーガス病のキャリアを原因とした輸血感染は、非流行地域においては重要な問題の一つである。実際、カナダおよびヨーロッパ諸国などの輸血に関する安全対策では、中南米諸国出身であることおよび滞在歴があることなどをリスク因子として献血者を選択し、スクリーニング検査を実施している。これまで日本国内のシャーガス病にリスクがあると考えられた献血者の*T. cruzi*抗体陽性率は不明であったが、本研究により、リスクのある献血者の0.016%が抗体陽性であった。これは、カナダ(0.089%)やスペイン(0.622%)に比べ低い結果であった。また今回、本人もしくは母親が中南米諸国出身者であった献血者からのみ陽性者が認められた一方、中南米諸国に滞在歴がある人からは抗体

陽性者は認められなかった。日本においては、シャーガス病のリスク因子としては、中南米諸国滞在歴よりも、本人もしくは母親が中南米諸国出身者であることの方が重要であることが示唆された。

以上の結果から、日本の献血者全体での*T. cruzi*抗体の陽性率は極めて低いものの、陽性者は確実に存在することから、有リスク献血者についてはスクリーニングをする必要性が確認された。現在の献血の検診では、「中南米諸国で生まれた、又は育った」、「母親および母方の祖母が、中南米諸国で生まれた、又は育った」、「中南米諸国に連続して4週間以上滞在、または居住したことがある」に該当する献血者を対象に*T. cruzi*抗体スクリーニング検査を実施している。

## E. 結論

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

## 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) Furui Y, Ishinoda M, Sayama Y et al.  
THE RISK OF TRANSFUSION-TRANSMITTED  
CHAGAS' DISEASE IN JAPAN, 33<sup>rd</sup>  
International Congress of the  
International Society of Blood  
Transfusion. Seoul, 2014.

(2) SAYAMA Y, MATSUMOTO C, SOBATA R et  
al. EVALUATION OF SEROLOGICAL AND PCR  
METHODS FOR DIAGNOSIS OF CHAGAS DISEASE  
CAUSED BY *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION.  
33<sup>rd</sup> International Congress of the  
International Society of Blood  
Transfusion. Seoul, 2014.

(3) 古居保美、輸血感染症とその安全対策  
シャーガス病、第 39 回日本血液事業総会、  
大阪府、2015 年

## H.知的財産権の出願・登録状況

なし

**表1 評価した各 *T. cruzi* 抗体検査試薬**

番号	名前	試薬名	メーカー	原理	抗原
1	ELISA	ORTHO® <i>T. cruzi</i> ELISA Test System	Ortho Clinical Diagnostics	ELISA(酵素免疫測定法)	<i>T. cruzi</i> 溶解
2	CLIA	ARCHITECT Chagas Assay	Abbott	CLIA(化学発光免疫測定法)	組み換え抗原(FP10, FP6, FP3, and TcF)
3	ESA	ABBOTT ESA Chagas	Abbott	<i>in vitro</i> enzyme strip assay	組み換え抗原(FP10, FP6, FP3, and TcF)
4	IFA	-	in-house	IFA(間接蛍光抗体法)	<i>T. cruzi</i> 固定
5	PA	SERODIA-Chagas	富士レビオ	凝集法(人工担体凝集法)	非働化 <i>T. cruzi</i> 抗原
6	ICT-1	Chagas STAT-PAK® Rapid Assay*	Chembio	免疫クロマト法	組み換え抗原
7	ICT-2	Chagas Detect™ Rapid Test	Inbios	免疫クロマト法	組み換え抗原
8	ICT-3	Chagas Detect™ Plus Rapid Test	Inbios	免疫クロマト法	組み換え抗原

**表2 国際標準品を用いた *T. cruzi* 抗体検査試薬の感度評価**

IU/mL	Tci									Tcii						
	ELISA	CLIA	ESA	IFA	PA	ICT-1	ICT-2	ICT-3	ELISA	CLIA	ESA	IFA	PA	ICT-1	ICT-2	ICT-3
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
0.125	+	+	+	±	±	+	±	+	+	+	+	+	-	+	-	+
0.063	+	+	+	-	-	±	-	+	+	+	+	±	-	-	-	±
0.031	-	+	+	-	-	-	-	±	-	+	±	-	-	-	-	-
0.016	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.T
0.008	-	-	-	-	-	-	-	N.T	-	-	-	-	-	-	-	N.T

+: 陽性, -: 陰性, ±: 判定保留, N.T: Not Test

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Munkhjargal T, Aboge GO, Ueno A, Aboulaila M, <u>Yokoyama N</u> , Igarashi I.	Identification and characterization of profilin antigen among Babesia species as a common vaccine candidate against babesiosis.	Exp Parasitol	166	29-36	2016
Munkhjargal T, Ishizaki T, Guawanto A, Takamae H, <u>Yokoyama N</u> , Igarashi I.	Molecular and biochemical characterization of methionine aminopeptidase of Babesia bovis as a potential drug target.	Vet Parasitol	221	14-23	2016
Munkhjargal T, <u>Yokoyama N</u> , Igarashi I.	Recombinant methionine aminopeptidases protein of Babesia microti: immunobiochemical characterization as a vaccine candidate against human babesiosis.	Parasitol Res	115(9):	3669-3676	2016
Tezuka K, Kuramitsu M, <u>Okuma K</u> , Nojima K, Araki K, Shienohara N, Matsumoto C, Satake M, <u>Takasaki T</u> , Saijo M, <u>Kurane I</u> , Hamaguchi I.	Development of a novel dengue virus serotype-specific multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for blood screening.	Transfusion.	56(12)	3094-3100	2016