

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26年度～平成28年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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. パベシア感染の検査法に関する研究・・10
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・・14
研究分担者：沢辺京子（国立感染症研究所 昆虫医科学部）
3. ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
研究分担者：平 力造・五十嵐 滋（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・・22
研究分担者：岡田義昭（埼玉医科大学 医学部）
5. 蚊媒介ウイルス高感度検出法の開発と評価（ジカウイルス遺伝子高感度検出法、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、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）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26
研究分担者：高崎智彦（神奈川県衛生研究所 所長・国立感染症研究所 ウイルス第一部）
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29
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. 日本国内におけるシャーガス病疑い例の検査経験、輸血用血液製剤製造・保存中における *Trypanosoma
cruzi* 原虫の動態および日本の献血者における *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性率の調査・・・・・・・・・・33
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））

総合研究報告書

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、バ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、シャーガス病に関する検査法の評価をしつつキャリアの状態を把握した。輸血用血液製剤製造工程および各輸血用血液製剤保存条件下中における *T. cruzi* 原虫の動態、及び、日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率を把握した。リーシュマニア症については、リーシュマニアの生存率を解析した。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。白血球除去フィルターは、ヒト血中に存在するリーシュマニア感染細胞を除去するために非常に有効であることが示された。バベシア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。イムノクロマト法（ICT）により、日本およびアメリカの流行地の患者血清から抗体検出が可能であった。また、LAMP 法も、ヒト DNA サンプルを用いた研究で 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関して、PANTHER システムによる WNV 用検査試薬は、感度、特異性ともに、e-SAS システム（以前の導入システム）と比較して同等以上であり、同システムを活用した WNV-NAT 検査体制を構築した。蚊媒介性ウイルス検査法については、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。また、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として、マルチプレックス PCR 法を用いたデングウイルスおよび HTLV-2 の新規高感度検出系を確立したウイルス媒介蚊について、アカイエカは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。また、ヒトスジシマカの飛翔能力を明らかにした。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：

五十嵐滋（日本赤十字社血液事業本部 副本部長）（平成 26 年度）
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）（平成 27 - 28 年度）
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）
系川健太郎（国立感染症研究所昆虫医科学部）
倉光 球（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員）
小川浩平（国立感染症研究所昆虫医科学部）
橘川 薫（日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター）
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）
鈴木雅治（日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター）
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）
田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）

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）

前川芳秀（国立感染症研究所昆虫医科学部）

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．輸血血液におけるトリパノゾーマクルーシ検出に関する研究：

中南米諸国出身者を含めた日本でシャーガス病と疑われた方から血液を提供いただき、抗体検査法、遺伝子検査法、そして原虫培養法を実施して各検査法の評価をしつつキャリアの状態を把握した。輸血用血液製剤へ *T. cruzi* を接種し、白血球除去(白除)フィルターおよび各輸血用血液製剤保存条件下における *T. cruzi* の動態を解析した。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。

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：

日本の現行の輸血用血液製剤の製造工程や保存条件がリーシュマニア感染症を予防するのにどの程度有効なのか解析した。リーシュマニア原虫はヒトの体内では、無鞭毛型原虫となるためマクロファージ様細胞に分化させたTPH細胞株にリーシュマニアを感染させ、無鞭毛型原虫として使用した。

3．変異型 CJD 発生動向調査：

変異型 CJD の発生状況を英国の NCJDRSU や米国の CDC から疫学情報を収集し、血液製剤に与える影響を評価した。フランスの発生状況は 2013 年度から経時的にその年度毎の発生件数を加算して発症者数の推移を評価した。

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開発し、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た。そのために、簡便で迅速な血清診断法のイムノクロマト法と遺伝子診断法である LAMP 法について検討を行った。

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：

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、その対応の取り組み方等を検討した。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輸血用血液製剤の安全性確保のために、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対応について、PANTHER を活用したウエストナイルウイルス (WNV) 用試薬 (PANTHER システム) の精度を検証し、更には、デング熱の国内感染発生時の献血者への安全対策を検証し、今後の新たな蚊媒介感染症対策への取り組みの手順を再整理すると共に WNV 検査マニュアル(案)を策定した。

6．蚊媒介ウイルス高感度検出法の開発と評価：

日本脳炎・ウエストナイルウイルスを同時に検出できる検査系を確立した。また、デングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルスの血液および血液製剤からの遺伝子検出法に関し、ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルスを同時に検出できる市販キットを、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：

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 法の確立においては、DENV 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。また、HTLV-1/2 同時検出が可能な新規マルチプレックス PCR 法の確立においては、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. 輸血血液におけるトリパノゾーマクルーシ検出に関する研究：

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：

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2Log感染価が低下した。一方、-20℃では、生存は確認できなかった。2)リーシュマニア原虫を感染させたTHP細胞をアルブミン液、ヒト血漿、全血に添加し、白血球除去フィルターを用いて除去効率を評価した。アルブミン液では5Log、血漿では4Log、全血では3.6Logの除去が認められた。白血球除去フィルターは、ヒト血中に存在するリーシュマニアに感染した感染細胞を除去するために非常に有効であることが示された。

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。英国で2016年に1名の死亡例が報告されたが、codon129がMV型の初めての死亡例であった。

4. バベシア感染の検査法に関する研究

B. microti の組換え Bmn1-17 蛋白質を用いて作製したイムノクロマト法 (ICT) により、日本およびアメリカの流行地の患者血清から抗体検出が可能であった。また、PCR より簡便で迅速な遺伝子増幅法である LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法も、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。

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：

PANTHER システムによる WNV 用検査試薬は、感度、特異性ともに、e-SAS システム (以前の導入システム) と比較して同等以上であり、同システムを活用した WNV-NAT 検査体制を構築した。同システムは、全国の検査実施施設に整備されており、危機管理上広域的な対応についても可能となった。更には、平成26年のデング熱の国内感染事例を受け、その対策を振り返ることで、蚊媒介性感染症対策として最初の安全対策は、発熱等への献血制限等の対応であり、その対応手順等について再検証し整理することができた。

6. 蚊媒介ウイルス高感度検出法の開発と

評価

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検査系を確立した。

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、感度がやや低かった。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、アフリカ型 (MR766 株) は検出できなかった。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。

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：

DENV 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 法を確立した。また、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 法を確立した。

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 ヶ月生存し、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 ヶ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。日本に滞在する中南米諸国出身者に *T. cruzi* 感染者が認められ、その中に血中に原虫が確認される感染者も見いだされた。国内でも医療関係者におけるシャーガス病の認知度を上げる必要がある。

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。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が明らかになり、新鮮凍結血漿や血漿分画製剤の感染性

は低いと考えられた。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、リーシュマニア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。

バベシア症については、最初に、7組換え蛋白質を用いたELISAの検討を行ったところ、*B. microti*感染と非感染のマウス血清で、明確なOD値の差が認められた。次に、アメリカの流行地で採集されたヒト血清を用いた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、米国での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。

ウエストナイル熱については、PANTHERシステムを有効に活用するために、同システムに搭載されるWNV用試薬の感度や特異性について、同試薬の添付文書で確認した結果、充分の感度を有しており、更には、非感染性WNV液及びヒト血漿を使用した感度試験、再現性試験及び特異性試験においても十分な精度を確認した。また、検査用検体の搬送容器のバリデーション、血液事業情報システムを利用した検体搬送の管理、検査指示等を行うこと効率な体制を構築し、WNV検査マニュアル(案)を策定した。本マニュアルの策定によって、WNV熱国内感

染が発生した場合の検査体制の充実が図られた。

蚊媒介性ウイルス検出に関し、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ろう。

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。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。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。

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。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。

リーシュマニア症については、現行の輸血用血液製剤の製造工程と保存条件によるリーシュマニア原虫の除去・不活化効率を評価したところ、白血球除去フィルターによるリーシュマニア原虫の除去は非常に効果的であることが明らかになった。また、-20 に凍結したヒト血漿からは感染性が検出できなかった。

バベシア症について、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 ICT はヒト感染血清中の抗体を迅速に検出可能である事が示唆された。また、新規の遺伝子診断法である LAMP 法は、実験モデルでは、特異性と感度が高かった。しかし、ヒト DNA を用いた LAMP 法は地域により感度に差が認められ、更なる検討が必要である。

ウエストナイルウイルス感染について、P ANTHES システムによる WNV-NAT については、感度、特異性ともに、以前のシステムと比較して同等以上であり、同システムを活用

した検査体制を構築した。同システムは、全国の検査実施施設に整備されており、危機管理上広域的な対策が可能となった。

日本脳炎ウイルス用 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。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、輸血や血液製剤における安全性確保おける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。

デングウイルス 4 血清型および HTLV-1/2 に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 および HTLV-1/2 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、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

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, BatturB,

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. 64:527-532.2015

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

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

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

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 Dengue 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

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

発明の名称： Dengue ウイルス検出用プライマー対、 Dengue ウイルス検出用プローブ及び Dengue ウイルス検出用キット、出願番号：特願2015-215906、出願年月日：平成27年11月2日、発明者：手塚 健太、倉光 球、大隈 和、浜口 功、高崎 智彦

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いるが、近年ではさらに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。その結果、*B. microti* の組換え Bmn1-17 蛋白質を用いて作製したイムノクロマト法（ICT）により、日本およびアメリカの流行地の患者血清から抗体検出が可能であった。また、PCR より簡便で迅速な遺伝子増幅法である LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法も、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。しかしながら、今後実用化するためには、感度および特異性をさらに改善することが必要である。

A. 研究目的

赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立しているが、ヒトにも感染し、人獣共通感染症としても重要である。アメリカ北東部の沿岸地帯やナンタケット島では地方病として知られている。さらに最近では、米国では東海岸から西海岸の感染拡大、新種のバベシアの発見、ヨーロッパから中近東、モンゴル、中国や台湾などアジアなど世界的な感染地域の拡大が認められている。ヒトへの感染は主として感染ダニによる刺咬によるが、米国ではキャリアーからの輸血により感染する例が 2000年代から急激に増加しており、その対策が急がれている。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、人バベシア症に対する迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発し、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た。そのために、簡便で迅速な血清診断法のイムノクロマト法と遺伝子診断法である LAMP 法について検討を行った。

B. 研究方法

(1) 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 pGEX 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、この融合蛋白質を Pre-Scission Protease で処理し、GST を除去した。更に、限外濾過フィルターを用いることにより、バッファー交換及び蛋白質の濃縮を行った。また、*B. microti* 抗グレイ株に感染したハムスターおよびミュンヘン株に感染したマウス感染血清を用いてウエスタンブロットを行い、その反応性について検討した。また、ミュンヘン株に感染したマウス血清を用いた ELISA によっても、抗原性について検討した。

(2) 組換え蛋白質を用いた ELISA の検討

96 穴プレートの 1 ウエル当たり Bmn1-17 組換え蛋白質 0.2 µg を一晩 4℃ でコーティングした。その後、3% スキムミルク-PBS でブロック後、100 倍希釈した人血清 100 µl と 37℃ 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄後、抗ヒト IgG 抗体で 37℃ 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄後、DAB 基質と室温で反応させ、15 分後に OD₄₁₅ 値を測定した。

(3) 組換え蛋白質を用いたイムノクロマト法 (ICT) の検討

Bmn1-17 組換え蛋白質を金コロイド粒子に標識するために、蛋白質濃度と pH の条件を変えて検討した。また、Bmn1-17 組換え蛋白質に対する抗体をウサギで作製した。これらの

条件に基づいて得られた金コロイド標識 Bmn1-17組換え蛋白質をサンプルパットに、抗体をニトロセルロース膜に塗布し、吸収パットと共に1枚のシートとして組み立て、カットし、ICTストリップを作製した。ハムスターの陽性、陰性コントロール、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いてICTストリップの特異性について検討を行った。

(4) ヒト血液試料

兵庫医療大学の斎藤あつ子教授より、日本人の患者血清とDNA、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、ELISAおよびICTの検討に用いた。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。

(5) *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。*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、人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、兵庫医療大学、エール大学の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) ヒト感染血清による 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) LAMP の特異性と感度の検討

B. microti 18S rDNA を標的とした LAMP は、マダニが媒介する *Anaplasma*, *Ehrlichia* 形態が *B. microti* と類似し類症鑑別が必要な *Plasmodium falciparum* の DNA を用いた特異性の検討でも、バベシアのみに増幅が認められた。また、LAMP は PCR に比較して 10~100 倍程度の高い感度が認められた。しかし、*B. microti* グレイ株とミュンヘン株から3種類の DNA 量を用いて 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。

マウスの *B. microti* 実験感染では、血液塗沫上では検出することのできない感染急性期と慢性期の血液からも、real-time LAMP により感染検出が可能であった。

国内の発症者の DNA を用いた LAMP でも増幅が認められています。さらに、米国の16例のヒト患者 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。

D. 考察

イムノクロマト法 (ICT) は、ニトロセルロースなどの毛細管現象を利用した免疫学的測定法の1つである。この方法は頻用されているELISAと比較し、血清試料などを滴下するだけで操作が簡便であり、判定時間も約15分と短い。また判定は目視で可能であり、コスト面でも利点がある。

本研究では、輸血用血液の*B. microti* 感染の有無を評価する血清診断法として ICT の開発を試みた。ICT の作製には、*B. microti* の高純度に精製した bmn1-17 組換え蛋白質を用いた。最初に、Bmn1-17 組換え蛋白質を用いた ELISA の検討を行ったところ、*B. microti* 感染と非感染のマウス血清で、明確な OD 値の差が認められた。次に、アメリカの流行地で採集されたヒト血清を用いた 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、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。

LAMP 法は、約 60 度の等温で短時間(1 時間以内)に標的遺伝子を増幅することが可能で、結果も目視で判定することが可能である。これらの特徴は、多数の検体を短時間で検定する必要のある輸血の安全性を評価する方法として非常に適していると考えられる。

本研究では、輸血用血液の *B. microti* 感染の有無を評価する遺伝子診断法として LAMP 法の開発を試みた。*B. microti* の 18S rDNA 遺伝子配列に基づいて設計した LAMP 法は、ダニによって媒介される *Anaplasma*, *Ehrlichia*, 及び形態や臨床症状が類似しているため類症鑑別が必要となるマラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の遺伝子を増幅せず、この LAMP 法が *B. microti* に対して高い特異性を有することが明らかとなった。

更に、マウス感染モデル系を用いて、感染経過に伴う遺伝子検出の検討を行った。その

結果、血液塗抹標本による原虫検出に長時間を有する赤血球感染率が 1.0% 未満の感染初期や、原虫がほとんど血液中に認められない慢性期においても長期間 *B. microti* の 18S rDNA 遺伝子の増幅が認められた。また、この LAMP 法は、遺伝子診断法として最も広く普及している PCR 法と比較して約 10~100 倍高い感度を有していることが明らかになった。

日本の発症者の血液からも LAMP 法により *B. microti* の遺伝子増幅が確認された。しかしながら、米国のヒト患者 DNA を用いて LAMP では、半分以下の検出率であった。この原因として、*B. microti* の地域的な DNA 配列の変異が示唆される。今後、遺伝子疫学調査に基づいた地域特異的な LAMP プライマーの設計が重要と考えられる。

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 ICT はヒト感染血清中の抗体を迅速に検出可能である事が示唆された。また、新規の遺伝子診断法である LAMP 法は、実験モデルでは、特異性と感度が高かった。しかし、ヒト DNA を用いた LAMP 法は地域により感度に差が認められ、更なる検討が必要である。また、輸血による *B. microti* の感染をより確実に防止するためには、血清診断法と遺伝子診断法を組み合わせるスクリーニングする事も考慮することが重要である。

G. 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.15:3669-3676.

2. 書籍

- 1) 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

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
研究協力者	津田良夫	国立感染症研究所
	前川芳秀	国立感染症研究所
	小川浩平	国立感染症研究所
	糸川健太郎	国立感染症研究所

研究要旨

蚊媒介性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の知見を得ることは重要である。そこで本研究では、蚊の寿命・発育日数と飛翔能力に注目し、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。まず、ウイルス非感染のアカイエカの成虫の寿命と飛翔能力、ならびにヒトスジシマカの幼虫の発育日数と飛翔能力についてそれぞれ調査した。

ヒトスジシマカ(301 個体)およびオオクロヤブカ(336 個体)の胸部背面にマークし、調査区画内における蚊の移動分散の様子を調査した。放した後4日間でヒトスジシマカ84 個体(27.9%)、オオクロヤブカ62 個体(18.5%)が再捕獲された。ほとんどが放した地点周辺で再捕獲されたが、別の地点で捕獲された個体のうち、ヒトスジシマカ2 個体(2.4%)の最長移動距離は95 m、オオクロヤブカ13 個体(17.8%)は167 m だった。ヒトスジシマカの乾燥卵は、4 および20 日では4 ヶ月は生存し、羽化できることが示唆された。羽化率は4 > 20 > 25 日の順に高く、25 日で4 ヶ月間維持された卵からは羽化成虫は得られなかった。

アカイエカが産卵場所とする雨水マスは調査地域内で集中分布(集中度指数は2.2)しており、アカイエカ幼虫の分布はランダム分布(集中度指数は1.04)であった。産卵期のアカイエカ成虫は遭遇する雨水マスをランダムに選び産卵すると推測された。フライトミルによりアカイエカおよびコガタアカイエカの雌成虫を飛翔させたところ、コガタアカイエカは最長25 時間の連続飛翔が観察された(アカイエカは10 時間程度)。アカイエカに長距離移動性はなく、15 日では約4.5 km は飛翔可能と推測された。羽化後のアカイエカはすべての温度・日朝条件でコガタアカイエカに比べ寿命が長く、特に15 日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。

今後は、それぞれの蚊種のウイルス感染蚊を作出し、これら非感染蚊の結果と比較することで、ヒトへの感染リスクを評価することを目指す。

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な地域に生息しており、特に首都圏の住

宅地では、この2 種の全体の種構成における割合は95%以上も占めている。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畜舎周辺に多く生育して

いる。日本脳炎は、近年 10 名以下の患者数を推移していたが、2016 年は 1993 年以降はじめて 10 名を超え（11 名）、特に長崎県対馬市内で短期間のうちに 4 名の患者の集積が見られた。デング熱の国内流行が 2014 年に発生し、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明らかになった。このように、国内にはデングやウエストナイルウイルスを媒介する蚊は存在しており、いったん国内にウイルスが侵入すれば、国内流行が起きる可能性は高い。また、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。などの知見は重要である。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。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、これまでも多くの報告があるが、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、これらの蚊の性質の中で、特に蚊の寿命と飛翔能力に注目し、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。まず、ウイルス非感染のヒトスジシマカ成虫の行動範囲と乾燥卵から孵化した幼虫の発育日数ならびに羽化率、アカイエカの成虫の寿命と飛翔能力をそれぞれ調査した。

B. 研究方法

1. ヒトスジシマカ飛翔範囲の推定

1) 調査地

石垣島の住宅街（住宅・商店・公共のビ

ル・博物館・大小 3 つの緑地がある約 300 m × 250 m の区画）を調査地を選び、その中に 5 ヶ所の採集場所を設けた。採集場所「庭」にはヤブカ類の発生源となる人口容器があった。採集場所「大緑地」は全体が樹冠で覆われ灌木や下草が茂っていた。採集場所「小緑地」は大緑地から南東に約 92 m 離れた小規模な緑地で、大きな木が茂り、灌木や下草が茂っていた。採集場所「博物館」は大緑地の採集場所の北西 230 m に位置する周囲を植込みで囲まれた建物であり、建物の周囲にある排水溝が幼虫発生源となっていた。採集場所「小茂み」は駐車場の境界にある茂みで大きな樹木の木陰に低木が茂り、蚊の潜伏場所となっていた。

2) マーキング法

調査の前半 3 日間は、各採集場所で人おとり法により調査者に飛来するヤブカ類を捕獲した。捕集蚊の多くがヒトスジシマカとオオクロヤブカであったため、これら 2 種をマーキングの対象とした。生かして持ち帰った捕集蚊は麻酔し、胸部背面の 1 あるいは 2 ヶ所に 4 色の塗料で各採集場所を区別できるようにマークした。マーク虫は放すまで飼育ケージで砂糖水を与えて維持した。3 日目の夕方、マークしたヒトスジシマカ（合計 301 個体）およびオオクロヤブカ（合計 336 個体）を各採集場所から放した。

放した蚊の再捕獲は翌日から毎日午前（9:00 頃）と午後（14:00 頃）の 2 回、8 分間人おとり法により実施し、マークを確認し個体数とともに記録した。再捕獲は 4 日間継続して実施した。

2. アカイエカの行動範囲および飛翔能力の推定

1) 成虫産卵期の行動範囲の野外調査

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、この範囲にある雨水マス 195 個における蚊幼虫の発生状況を調べた。25 m 四方の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。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) フライトミルによる飛翔実験

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。実験に用いた雌成虫は、アカイエカ NIID 系統(2008 年新宿区で捕集後、25 長日条件下で飼育・維持)、コガタアカイエカ出雲系統(2008 年出雲市捕集後、上記同様に飼育・維持)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 長日および 25 長日の温度条件下で飛翔させ、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。

3. 異なる温度条件下でのアカイエカ雌成虫寿命およびヒトスジシマカ幼虫の発育日数と羽化率

実験に用いた蚊は、アカイエカ NIID 系統(前出)、コガタアカイエカ出雲系統(前出)、およびヒトスジシマカ海老名系統(2011 年海老名市捕集後、25 長日条件下で飼育・維持)である。

幼虫期を高温・長日(25℃, 16L:9D)の条件下で維持した羽化成虫を 4 つの異なる飼育条件(25℃, 16L:9D; 20℃, 11L:13D; 15℃, 11L:13D; 10℃, 10L:14D)下で飼育し、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)条件下に 1 ヶ月間維持し、その後 4℃, 20℃, 25℃ の温度条件で維持し、孵化した幼虫の発育日数および羽化率を調査した。

C. 研究結果

1. ヒトスジシマカ飛翔範囲の推定

5 ヶ所の採集場所から合計 301 個体のヒトスジシマカを放し、その 27.9%(84 個体)が再捕獲された。それぞれの採集場所について求めた再捕獲率は、「民宿の庭」が最も低く 13.3%、「博物館」は最も高い 41.1%(23/56)であった。オオクロヤブカの再捕獲率は 18.5%で、ヒトスジシマカよりも低かった。再捕獲されたヒトスジシマカ(84 個体)の 97.6%(82 個体)が放された場所と同じ場所で捕獲されたが、別の場所で捕獲された 2 個体の移動距離は 92 m と 95 m であった。オオクロヤブカは 82.3%が同じ場所で捕獲されたが、別の場所で捕獲された 13 個体の中で「博物館」から「小茂み」に移動した 167m の移動距離が最長であった。

2. アカイエカの行動範囲および飛翔能力の推定

アカイエカの産卵場所である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。

フライトミル法により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、その飛翔パターンを観察すると、非常に速いスピードで羽ばたくが、短時間で頻りに休止する特徴が確認された。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ており、両種の差異は顕著であった。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）。

3. 異なる温度条件下でのアカイエカ雌成虫およびヒトスジシマカ幼虫の発育

羽化後の成虫を上述した 4 つの条件下で飼育した結果、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。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 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。

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は重要な知見となる。また、ヒトスジシマカのウイルス非感染蚊の野外での移動距離は、本研究ではおおよそ 100 m 以内と推定されたが、ウイルス感染蚊の行動範囲がこれと同等なのかは議論しなければならない。

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ため、(2)(3)の生理状態の雌蚊についても検討する必要がある。また、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。これまでの知見では、アカイエカの飛翔能力は約 2 km と主に野外調査から推定されているが、さらに長距離を移動

可能となれば、対策範囲を拡大する必要があり、また、この距離が異なる生理状態ではどうなるのか、ウイルス感染蚊ではどうなのかなど、検討しなければならない課題は多い。これらの結果は、蚊対策に影響を及ぼすであろうことは容易に想像できる。

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。

事業開始時の予定では、最終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が、この点では計画通りに進められなかった。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。しかし、研究期間内に得られた情報をもとに、今後は、それぞれの蚊種に親和性のあるウイルスを感染させた感染蚊を作出し、非感染蚊での結果との比較を試みたい。

E. 結論

1. 実験期間中の平均気温が19.2とやや低い天候であったが、ヒトスジシマカとオオクロヤブカの2種を用いて実験した結果、前種では放逐場所から少なくとも95m、後

種では少なくとも167mを移動した個体が確認された。

2. 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。

3. アカイエカ幼虫が発生している雨水マスの集中度指数は1.04となり、調査範囲内にランダムに分布することが示唆された。産卵期のアカイエカの行動範囲は、少なくとも450m×350mであると推測された。

4. アカイエカは25では連続して0.2時間、約100m、15では5時間、4.5km飛翔可能であると推察された。アカイエカは、吸血源を探して約4.5km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な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
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

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）
研究分担者 五十嵐滋 （日本赤十字社血液事業本部）
研究協力者 鈴木雅治 （関東甲信越ブロック血液センター）
研究協力者 橘川 薫 （関東甲信越ブロック血液センター）

研究要旨

本研究によって、PANTHERシステムによるWNV用検査試薬は、感度、特異性ともに、e-SASシステム（以前の導入システム）と比較して同等以上であり、同システムを活用したWNV-NAT検査体制を構築した。同システムは、全国の検査実施施設に整備されており、危機管理上広域的な対応についても可能となった。更には、平成26年のデング熱の国内感染事例を受け、その対策を振り返ることで、蚊媒介性感染症対策として最初の安全対策は、発熱等への献血制限等の対応であり、その対応手順等について再検証し整理することができた。

A. 研究目的

輸血用血液製剤の安全性確保のために、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対応について、PANTHER を活用したウエストナイルウイルス（WNV）用試薬（PANTHER システム）の精度を検証し、更には、デング熱の国内感染発生時の献血者への安全対策を検証し、今後の新たな蚊媒介感染症対策への取り組みの手順を再整理すると共に WNV 検査マニュアル（案）を策定し、ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の安全対策に資することとする。

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

本研究における献血者検体の使用については、「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」により対応した。

（1）検査システム別の WNV 用検査試薬の精度比較

（2）PANTHER システム（現行システム）の非感染性 WNV 液の感度試験とヒト血漿を使用した特異性試験

（3）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

（4）デング熱の国内発生時の献血制限等の対応

C. 研究結果

（1）検査システム別の WNV 用検査試薬の精度比較

ア. 感度試験

Health Canada WNV Reference Standard を使用した PANTHER システム、e-SAS システム、TAIGRIS システムの 50%LOD、95%LOD を比較したところ PANTHER システムは従来と同等以上の感度を有していた。

イ. 遺伝子型別検出状況

組織培養した各 WNV を使用し 4 重測定による検出率で比較し結果、PANTHER システムは、TAIGRIS システムより同等以上であった。

（2）PANTHER システム（現行システム）の非感染性 WNV 液の感度試験とヒト血漿を使用した特異性試験

ア. 現行システムによる非感染性 WNV 液の感度試験と再現性試験

50%LOD は 4.9copies/mL、95%LOD は 23.9copies/mL であった。95%以上の LOD を示した 3 濃度（100、50、

25copies/mL)各3回の8重測定、測定日毎の測定結果は全て陽性であった。

イ．ヒト血漿を使用した特異性試験

ALT検査不適献血者検体500本を、現行システムでHEV-NATを行った結果、全て陰性と判定された。

(3)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WNV検査マニュアル(案)の策定

現行の献血血液のスクリーニング検査体制に準じて、検査用検体の送付、血液事業情報システムを利用した検査体制を構築し、WNV検査マニュアル(案)については、「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」で作成した。

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台残すこととしプール検体作成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。

(4) Dengue熱の国内発生時の献血制限等の対応

日本赤十字社では、「Dengue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Dengue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Dengue熱の感染地域(対象地域)とされた東京都、埼玉県内の献血会場に、Dengue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状況の確認を徹底し、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た。更には保管検体によるDengue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。

Dengue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Dengue熱対策が解除された11月14日までの間に、輸血によるDengue熱の感染被害は確認されなかった。

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、Dengueウイルスに感染した献血者は確認されなかった。

D. 考察

PANTHERシステムを有効に活用するために、同システムに搭載されるWNV用試薬の感度や特異性について、同試薬の添付文書で確認した結果、充分の感度を有しており、更には、非感染性WNV液及びヒト血漿を使用した感度試験、再現性試験及び特異性試験においても充分な精度を確認した。

また、検査用検体の搬送容器のバリデーション、血液事業情報システムを利用した検体搬送の管理、検査指示等を行うこと効率的な体制を構築し、WNV検査マニュアル（案）を策定した。本マニュアルの策定によって、WNV熱国内感染が発生した場合の検査体制の充実が図られた。

更には、平成26年に発生したデング熱の国内感染事例時献血制限及び遡及調査の対応について振り返り、今後の蚊媒介性感染症への安全対策に結びつけるために手順を策定した。同感染症の多くは、発熱、発疹等が主訴であることが多いことから、まずは、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状況の確認を徹底し、国内感染地域の特定による献血制限や遡及調査について予め準備しておくことは、検査法の導入前の安全対策の基本であり、厚生労働省、国立感染症研究所を連携のうえ輸血用血液製剤の安全性確保に努めたい。

E. 結論

PANTHERシステムによるWNV-NATについては、感度、特異性ともに、以前のシステムと比較して同等以上であり、同システムを活用した検査体制を構築した。同システムは、全国の検査実施施設に整備されており、危機管理上広域的な対策が可能となり更には、蚊媒介性感染症対策として最初の安全対策は、献血制限等の対応であり、その実施手順等について予め検証できたことから、迅速な安全対策を講じることが重要である。

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

なし

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、アフリカ、地中海沿岸、南アジア、南米など世界に広く分布し、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、海外で感染した献血者を介して輸血用血液製剤に混入する可能性がある。日本の現行の輸血用血液製剤の製造工程や保存条件が Leishmania 感染症を予防するのにどの程度有効なのか解析した。

Leishmania 原虫はヒトの体内では、無鞭毛型原虫となるためマクロファージ様細胞に分化させた TPH 細胞株に Leishmania を感染させ、無鞭毛型原虫として使用した。

1) 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。

2) Leishmania 原虫を感染させた THP 細胞をアルブミン液、ヒト血漿、全血に添加し、白血球除去フィルターを用いて除去効率を評価した。アルブミン液では 5Log、血漿では 4Log、全血では 3.6Log の除去が認められた。白血球除去フィルターは、ヒト血中に存在する Leishmania に感染した感染細胞を除去するために非常に有効であることが示された。

3) 変異型 Creutzfeldt-Jakob Disease(vCJD)の疫学情報を集め、評価した。vCJD 発症者は激減したが、2016 年に codon129 が MV 型の初めての発症例が報告された。MV 型はプリオン病の発症に長期間を要すると推定されており、今後 MV 型の発症例が増加する可能性がある。

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も知られており、これまで海外では、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)は、どの程度 Leishmania 原虫の感染予防効果が期待できるのか評価した。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、実験で証明した報告はごく少数しかない。

また、vCJD の発症例は 2000 年をピークに激減したが、少数ながら認められている。その一方で、未発症の vCJD 感染者の存在が予想されているため英国の National CJD Research & Surveillance Unit (N CJD-RSU) や米国の CDC から疫学情報を収集し、血液製剤に与える影響を評価した。

B. 研究方法

(1) Leishmania 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、

5% アルブミン液とヒト血漿 200mL にそれぞれ添加した。3 mL 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 を遠心した。それぞれのペレットを 1mL に溶解して 10 倍ずつの段階希釈を行い、96 穴プレートにまいて 25 で 4 週間培養し、鞭毛型原虫の増殖の有無によって感染価としての TCID₅₀ を計算した。それぞれ 3 つの検体で感染価を評価した。また、全血は 200mL に感染後 5 日目の THP-1 と cell free 無鞭毛型原虫を遠心で集め添加した。4.5mL 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処理後の血液は、4.5mL の血液を溶血させ 300G X 10 分の遠心し、上清はさらに 1,300g X 10 分の遠心を行い 2 つの沈殿を 1 つにまとめてアルブミンや血漿と同様に感染価を測定した。

(4) Leishmania 原虫の PCR による検出

文献から Leishmania 原虫の PCR による検出法を検索し、マルチコピー存在する遺伝子を標的としたプライマーを作成した。リボソーマル遺伝子 (Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis. vol. 30. 209-218, 2011) と kinetoplast DNA (Clin. Infect. Dis. vol. 37. 149-153. 2003) を増幅するプライマーを作成し、PCR を実施した。核酸は、2 種の Leishmania 原虫をそれぞれ 10⁴、10³、10²、10、3 個に調整し、DNA を抽出した。溶出した 1/3 の核酸を PCR に添加し 32 サイクルの増幅を行なった。検出はゲルを用いた電気泳動で増幅産物の有無で行なった。

(5) 変異型 CJD 発生動向

変異型 CJD の発生状況を英国の NCJDRSU や米国の CDC から疫学情報を収集し、血液製剤に与える影響を評価した。フランスの発生状況は 2013 年度から経時的にその年度毎の発生件数を加算して発症者数の推移を評価した。

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 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 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。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

ヒト血漿を用いた評価では、白血球除去フィルター濾過前の総感染価は 1.7X10⁷ と 2.0X10⁷ あったが、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。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 、2 回目は濃縮後も検出限界以下であった。白血球除去フィルターによる除去効率はそれぞれ約 10^4 と 10^5 以上であった。また、全血からの白血球除去効率は 3.6Log であった。

(3) Leishmania 原虫の PCR による検出

文献から 3 組 (2 組はリボゾーム遺伝子を検出) のプライマーを選択肢、2 種の *L. donovani* と *L. amazonensis* の検出を行なった。ribosomal DNA に比べて kinetoplast DNA の方が高感度であり、原虫 3 匹からでも陽性となった。

(4) 変異型 vCJD 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。英国で 2016 年に 1 名の死亡例が報告されたが、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

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。現行の我が国で実施されている輸血用血液の製造工程や保存条件によって Leishmania 原虫の感染リスクがどの程度減少するのか評価した。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期間で死滅することが明らかになり、新鮮凍結血漿や血漿分画製剤の感染性は低いと考えられた。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。

変異型 vCJD 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 型を示す健康人の割合は 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。2016 年に英国で報告された 1 例は MV 型であり、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

現行の輸血用血液製剤の製造工程と保存条件による Leishmania 原虫の除去・不活化効率を評価したところ、白血球除去フィルターによる Leishmania 原虫の除去は非常に効果的であることが明らかになった。また、-20℃ に凍結したヒト血漿からは感染性が検出できなかった。

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、発症例が増加することも考えられるため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) 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) 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) 鈴木雅之、青木麻衣子、加藤光洋、玉栄建次、内野富美子、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭: 同種骨移植のための骨保管支援業務の現状、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良

2) 岡田義昭、小林清子、池淵研二: リアルタイム RT-PCR を用いた B19-RNA 定量による B19 感染評価系の開発、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良

3) 山田攻、加藤光洋、鈴木雅之、内野富美子、小林清子、池淵研二、岡田義昭

: 当院における産婦人科緊急輸血症例の分析とその対策、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26

年5月、奈良

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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、斉藤妙子、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

11) 山田攻、鈴木雅之、内野富美子、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

12) 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

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

蚊媒介ウイルス高感度検出法の開発と評価

（ジカウイルス遺伝子高感度検出法、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、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（神奈川県衛生研究所、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）

鈴木 理恵子（神奈川県衛生研究所微生物部）

研究要旨：蚊媒介ウイルス感染症が世界的に問題になっている。2014年に国内流行したデング熱、関節炎を引き起こすチクングニア熱、妊婦が感染すると先天性ジカ症候群を引き起こすジカ熱（ジカウイルス病）は臨床的によく似た症状をきたす。鑑別のためには高感度なウイルス遺伝子検出法は重要である。そこでブラジルでのジカ熱流行に先駆けてリアルタイム RT-PCR 法（TaqMan 法）を確立した。ただし、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。日本国内で夏季にはウイルスが活動している日本脳炎ウイルスについては、2009年に中国で、2010年に韓国で日本脳炎ウイルス遺伝子 V 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。またジカウイルス、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 Trio-plex real-time RT-PCR assay を評価した。

A. 研究目的

近年、蚊が媒介するウイルス感染症が再興し流行を拡大している。ヤブカが媒介するデングウイルス、チクングニアウイルスそしてジカウイルスである。これらのウイルスの血液および血液製剤からの遺伝子検出法を検討した。また日本脳炎ウイルスに関しても、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、ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス

を同時に検出できる系を検討した。

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鑄型には、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。

ジカウイルスに関しては H26 年度にリアルタイム RT-PCR 系を GenBank からジカウイルスの塩基配列を収集し、アライメントした後、塩基配列 835 - 911 と 1086 - 1162 の位置にプライマーおよびプローブセット (ZIKV860 Set, ZIKV1107 Set) 構築した。H28 年度には TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) の簡便性、感度および特異性を評価した。

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。

ジカウイルスのリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) ZIKV860 Set, ZIKV1107 Set とともに ZIKV 遺伝子を増幅した。11 人の Dengue 熱患者血清を検査した結果、どちらのセット (Set) とも非特異的な反応を示さなかった。また、TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) の評価では、Dengue 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。チクングニアウイルスも検出された。また、Dengue 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

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。

一方、ジカウイルス、デングウイルス、チクングニアウイルスの効率的な検査法として解析した 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。

E. 結 論

新たに設計した日本脳炎ウイルス用 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、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である。

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. 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

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およびHTLV-2の新規高感度検出系を確立した。

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
高崎智彦 元国立感染症研究所 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, 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、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。

また、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、DENV 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となる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。また、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 同時検出が可能となる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 RNAtocT 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、QIASymphony DSP virus/pathogen 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。

・DENV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)。

・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

・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)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PT-RCRによるDENV4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。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。

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。

・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、登録配列との同一性を考慮し、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。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。

・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、高い同一性で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。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。

D. 考察

DENV は約 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。

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が

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。

これらの新規手法は、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 および HTLV-1/2 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 や HTLV-1/2 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全血清型およびHTLV-1/2に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およびHTLV-1/2の検出に有用であり、献血血液などのスクリーニング（確認検査）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

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 Dengue 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

発明の名称: Dengue ウイルス検出用プライマー対、Dengue ウイルス検出用プローブ及び Dengue ウイルス検出用キット、出願番号: 特願2015-215906、出願年月日: 平成27年11月2日、発明者: 手塚 健太, 倉光 球, 大隈 和, 浜口 功, 高崎 智彦

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

分担研究報告書

日本国内におけるシャーガス病疑い例の検査経験、
輸血用血液製剤製造・保存中における *Trypanosoma cruzi* 原虫の動態および
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。*T. cruzi* 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。また、近年の人々の往来のグローバル化によりシャーガス病は、流行地域だけでなく非流行地域でも注視すべき疾患の一つとなった。特に中南米諸国出身献血者由来の血液を介した *T. cruzi* 感染が非流行地域でも多数報告され、問題となっている。そこで下記の実験を通して、主に輸血用血液製剤および献血者検体を用いたシャーガス病に関する研究を行った。

日本国内におけるシャーガス病疑い例の検査経験

シャーガス病の可能性のある中南米諸国出身者と日本人から検体を得て、シャーガス病に関する検査法の評価をしつつキャリアの状態を把握した。期間中に中南米諸国出身者 10 名、日本人 10 名から検体が提供された。抗体検査法により、中南米諸国出身者 7 名が抗体陽性、その内 6 名が PCR 陽性、3 名から *T. cruzi* が分離された。サシガメとの接触歴が不明な人からも *T. cruzi* 感染者が認められた。日本人からの陽性者は確認されなかった。日本国内でも医療関係者におけるシャーガス病の認知度を上げる必要がある。さらに検査機関を含めて、診断・治療が可能な体制の整備が必要であると考えられた。

輸血用血液製剤製造工程および各輸血用血液製剤保存条件下中における *T. cruzi* 原虫の動態

上記 で分離した *T. cruzi* 原虫を用い、輸血用血液製剤製造工程および各輸血用血液製剤保存環境下での *T. cruzi* の動態を評価した。さらに低温環境下中での *T. cruzi* の増殖能および感染能を解析した。白血球除去フィルターにより、増殖可能な *T. cruzi* は 4 log 程度の減少が認められた。濃厚血小板中では、増殖可能な *T. cruzi* は接種 2 日目以降から減少

し、平均 3 log 程度の減少を示したが、濃厚血小板の有効期間を通じて増殖可能な *T. cruzi* は認められた。新鮮凍結血漿は一度の凍結融解により、平均して 5 log 以上減少し、検出限界以下となった。赤血球液中では、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 1~4 log の減少が認められたが、減少幅に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 日目から細胞内 *T. cruzi* の形態である amastigotes の減少が認められ 14 日目では検出限界以下となり、感染能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血球除去フィルターには、*T. cruzi* を低減化させる効果があることが認められた。濃厚血小板は、有効期間中に再増殖可能な *T. cruzi* が検出されたことから、濃厚血小板を介した感染が少なからず示唆された。新鮮凍結血漿は、検出限界以下にまで減少した。赤血球液は、その保存環境下により *T. cruzi* の増殖能および感染能が低下したことから新鮮凍結血漿および赤血球液による *T. cruzi* 感染のリスクは低いことが示唆された。

日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率の調査

シャーガス病にリスクがあると考えられる献血者を対象に抗体検査を実施した。検体は期間中 18,487 検体が採取され、抗体検査を実施した。18,487 検体中、3 検体(0.016%)が抗体陽性であった。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を介した感染経路が主であり、感染すると一時的な急性期症状を呈するが、ほとんどの場合一過性の経過を辿り、その後慢性期に至り、キャリアとなる。

近年の人々の往来のグローバル化により、日本国内にも中南米諸国出身者が約 25 万人滞在中であり、その内、3,000 ~ 4,000 人が *T. cruzi* のキャリアであると言われている。また、中南米諸国に長期滞在歴のある日本人も増加している。しかしながら、日本国内ではシャ

ーガス病は稀な疾患であるため、的確な診断や検査が困難であり、調査用検体の確保も難しい。

輸血による *T. cruzi* 感染は、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。その原因となった主な輸血用血液製剤は血小板製剤であり、全血製剤も可能性が危惧されている。一方、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、各輸血用血液製剤の製造、保存方法・期間などは、各国で異なっており日本国内で製造・保存されている条件下における *T. cruzi* の動態については不明である。

また日本国内にも、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られている。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、下記3項目の研究を行った。

日本国内におけるシャーガス病疑い例の検査経験

検査経験:中南米諸国出身者を含めた日本でシャーガス病と疑われた方から血液を提供いただき、抗体検査法、遺伝子検査法、そして原虫培養法を実施して各検査法の評価をしつつキャリアの状態を把握した。

輸血用血液製剤製造・保存中における *T. cruzi* 原虫の動態

輸血用血液製剤製造・保存中における *T. cruzi* 原虫の動態:輸血用血液製剤へ *T. cruzi* を接種し、白血球除去(白除)フィルターおよび各輸血用血液製剤保存条件下における *T. cruzi* の動態を解析した。

日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率の調査

日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率の調査: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

(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2012-007,2012-009)。

(1) シャーガス病疑い例の検査

2012年10月から2014年8月の間に医療機関およびNGOなどから連絡のあった提供者から血液を採取した。提供者は、1)中南米諸国出身者、2)サシガメとの暴露歴、3)中南米諸国に滞在歴のある方を対象とした。提供者は、検体採取時に主治医などを介し、十分に本研究の概要を説明後、同意書に署名をいただいた。さらに、提供者にアンケート調査を行い、サシガメとの接触歴などを調査した。提供された検体は、抗体検査法、遺伝子検査法および血液培養を用いた。抗体検査法は、ELISA(オーソ社)およびイムノクロマト法(Chembio社)を用いた。遺伝子検査法は、TaqMan PCR法(*T. cruzi* Satellite repeat領域をターゲットとした各プライマー・プローブ)により *T. cruzi* DNAの増幅を試みた。血液培養は、N.N.N.(Novy-MacNeal-Nicolle)培地を用いた。*T. cruzi*が分離・培養された際は、DNAを抽出後、*T. cruzi*ミトコンドリア領域をターゲットとしたプライマーを用いたPCR法を行った。増幅産物からダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定後、系統樹解析による *T. cruzi* 遺伝子型(DTUs; Discrete Typing Units)の同定を行った。

(2) *T. cruzi*原虫

*T. cruzi*は、(1)で中南米諸国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。

(3) 白除フィルターによる *T. cruzi*の低減化能の解析

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、定量(q)PCR法(*T. cruzi* Satellite repeat領域をターゲットとした各プライマー・プローブ)により、*T. cruzi*量を測定した。また、*T. cruzi*混入による白血球除去能への影響をみるため、同様にqPCR法(ヒトCD81 DNAをターゲットとしたプライマー・プローブ)により白血球数を計測した。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。

(4) 輸血用血液製剤保存環境下中における*T. cruzi*の動態

輸血用血液製剤は異なる3~4名の献血者由来の濃厚血小板(PC; Platelet Concentrate)、新鮮凍結血漿(FFP; Fresh Frozen Plasma)、赤血球液(RBC)を用いた。培養した*T. cruzi*(10^8 parasites/Bag)を各製剤へ接種後、PCは20 ~ 24、60 rpm、FFPは-20以下、RBCは4にそれぞれ保存した。PCは接種後0, 2, 3, 4, 7日経過時、FFPは凍結融解前後、RBCは接種後0, 4, 7, 14, 21, 28, 42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、(3)と同様の方法を行った。

(5) 低温環境下における*T. cruzi*の増殖能および感染能の評価

培地に*T. cruzi*(10,000 parasites)を接種し、25および4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法による*T. cruzi*量の測定および感染能を評価した。感染能の評価は、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にて共培養を行った。7日後に細胞を固定後、間接蛍光抗体法により細胞内*T. cruzi*の形態であるamastigotesの観察により感染能の評価を行った。

(6) 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。

(7) 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。

(8) 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。

(9) 献血者検体による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) シャーガス病疑い例における検査結果

期間中、中南米諸国出身者10名、日本人10名から検体が得られた(表1)。中南米諸国地域出身者は、NGOの健康診断などにより、心疾患や消化器疾患が疑われ医療機関を受診した方や、親類にシャーガス病診断歴がある方などであった。日本人は中南米諸国地域への渡航歴またはサシガメとの暴露歴がある方であり、1名は心疾患を患っていた。各検査法により、中南米諸国出身者のうち7名から抗体が陽性と認められた。抗体陽性者7名中6名がTaqMan PCR法により*T. cruzi* DNA陽性、3名から*T. cruzi*

が分離された。サシガメとの接触歴が不明であった提供者からも*T. cruzi*感染者が認められた。抗体検査法に用いた2法の結果に差異は認められなかった。分離された*T. cruzi*のDTUsを同定したところ、1株がDTUs TcV(JRC Tc-1)、残り2株がDTUs TcII(JRC Tc-2, JRC Tc-3)であった(図1(A))。DTUsの分布には地域性があるが、各提供者からの出身地域と分離された*T. cruzi*のDTUsはほぼ一致していた(図1(B))(Zingares et al. Infection, Genetics and Evolution, 12, 2012による)。日本人10人はいずれも全ての検査法で陰性であった。

(2) 白除フィルターによる*T. cruzi*の除去能
qPCR法による*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2(A))。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2(B))。

(3) 輸血用血液製剤中における*T. cruzi*の動態

PC中における再増殖可能な*T. cruzi*数は2日目以降から減少し、平均3 log程度の減少が確認された(図3)。しかし、異なる献血者由来のPCにおいて、*T. cruzi*の減少の程度が大きく異なっていた。特に、JRC Tc-2 Bag#7では、検出限界以下にまで減少していた。JRC Tc-2 Bag#7を除いたPCでは、PCの有効期間以降も増殖可能な*T. cruzi*が確認された。一方、FFPは一回の凍結融解により、平均5 log以上減少し、検出限界以下となった(図4)。異なる献血者由来のFFPにおいてもほぼ同様の結果であ

った。RBC 中での再増殖可能な *T. cruzi* 数は、JRC Tc-2 Bag#6 を除き 7 日目から減少が認められ、21 日目には 1~4 log 程度の減少が確認された(図 5)。RBC の有効期間内である 21 日では、いずれの RBC においても増殖可能な *T. cruzi* が確認された。株による大きな差は 3 製剤とも認められなかった。

(4) 低温環境下での *T. cruzi* の増殖能および感染能

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 6(A))。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(図 6(B))。両株とも同様の結果であった。

(5) 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 0.016IU/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。

(6) 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。

(7) 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

本研究期間中に、*T. cruzi* の感染を疑われた中南米諸国出身者 10 名中 7 名が抗体陽性であり、その 6/7(85.7%)が PCR も陽性であり、*T. cruzi* が分離された提供者も確認された。これまで日本在住の中南米諸国出身者の一部に、*T. cruzi* 感染者がいることが知られていたが、本研究においてもキャリアが認められた。しかし、日本在住の中南米諸国出身者のキャリア中に、どのくらいの割合で *T. cruzi* の原虫血症が認められ、さらにシャーガス病の症状を有するキャリアが存在するかについては不明であり、今後規模を大きくした調査が必要と思われる。さらに今回、感染は否定されたが、中南米諸国

地域の滞在歴やサシガメに暴露歴がある日本人からも検体の提供があった。近年の人々の往來のグローバル化などにより、流行地出身者だけでなく、日本人による流行地への渡航などによって、シャーガス病などの日本では稀な疾患に罹患する可能性も大きくなっている。日本においては、シャーガス病は稀な疾患であることから、医療機関などにおいても認識しづらく、今後シャーガス病をはじめとした疾患に対しては、国内でも医療関係者における認知度をより上げる必要がある。さらに、検査機関などの充実を図り、診断・治療できる体制の整備も必要と思われる。

シャーガス病疑い提供者検体を用いた各検査方法の評価では、抗体検査法に用いたELISAおよびイムノクロマト法の両試験で結果に差異は認められず、PCR法および血液培養からも*T. cruzi* DNA および *T. cruzi* の検出が確認された。従って、シャーガス病疑い患者に対し、これら検査方法は有効な方法であることが示唆された。さらに、今回、*T. cruzi* のDTUsを解析したところ、各提供者からの出身地域と分離された*T. cruzi* のDTUsの地域との間には相関があることが示された。従って、*T. cruzi* のDTUsを同定することにより、その*T. cruzi*の地域性を推察するには有効な方法であることが示唆された。

また日本国内での輸血用血液製剤製造および保存条件下に準じて*T. cruzi*の動態解析を行った。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。

PC中では、製剤の有効期間を越える7日までの全観察期間にわたって増殖可能な*T. cruzi*が認められたことから、PC輸血による*T. cruzi*の感染リスクが示された。また、異なる献血者由来するPCでは、*T. cruzi*の生存率が異なることも示された。近年、熱帯熱マラリア原虫に対し、血小板に抗原虫活性が存在することが見出されているが、*T. cruzi*に対しても同様の抗原虫活性があるのか、また、その活性が宿主によって異なるのかは、今後の研究課題である。一方、FFPでは、すべての献血者由来の製剤において検出限界以下にまで減少することが示された。FFPは冷凍状態で保存し、使用時に融解させることから、使用するまでに一サイクルの凍結融解が発生する。この凍結融解により、*T. cruzi*の感染リスクが大幅に減少することが示された。また、RBCは低温(2~6℃)に保存されているため、今回RBC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*の増殖能および感染能を評価した。その結果、RBC中での*T. cruzi*は、製剤有効期限である21日目においても1~4 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能が低下することが示された。これまで非流行地域において、血漿製剤および赤血球製剤を介した*T. cruzi*感染の報告はない。その原因として、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、さらには血漿製剤および赤血球製剤の各製剤保存環境下による*T. cruzi*の増殖能および感染能を低下させることが両製剤を介した*T. cruzi*感染

が確認されない一因であることが示唆された。従って、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、限りなく低いことが考えられた。

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FFPおよびRBC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FFP、RBC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

本研究において、日本に滞在する中南米諸国出身者に *T. cruzi* 感染者が認められ、その中に血中に原虫が確認される感染者も見いだされた。また、日本人からもサシガメとの暴露歴などにより、本研究に検体が提供された。国内でも医療関係者におけるシャーガス病の認知度を上げる必要がある。さらに検査機関を含めて、診断・治療が可能な体制の整備が必要であると考えられた。

本邦で行っている輸血用血液製剤製造・保存条件下における *T. cruzi* は、各条件下により減少することが認められた。特に、白除フィルターにより *T. cruzi* の低減化能が認められた。PC 中では、*T. cruzi* は保存期間中に増殖可能な *T. cruzi* が認められたことから、PC 輸血による感染リスクが示された。一方、FFP は一度の凍結融解により、検出限界以下にまで減少が認められ、FFP 輸血による *T. cruzi* の感染リスクは低いことが示された。RBC 中では、*T. cruzi* は保存期間中に増殖可能な *T. cruzi* が認められたが、低温環境下に保存することで、*T. cruzi* の増殖能および感染能が減少したことから RBC による *T. cruzi* の感染リスクは低いことが示唆された。

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. 33rd 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. 33rd International Congress of the International Society of Blood Transfusion. Seoul, 2014.

(3) 佐山勇輔、三浦左千夫、松本千恵子、内田茂治、佐竹正博、田所憲治：日本国内におけるシャーガス病疑い例の検査経験、第 89 回日本感染症学会学術講演会、京都市、2015 年

(4) 佐山勇輔、松本千恵子、三浦左千夫、内田茂治、佐竹正博、田所憲治：輸血用血液製剤中における *Trypanosoma cruzi* の動態、第 84 回日本寄生虫学会大会、東京、2015 年

(5) 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．東京都、2015 年

(6) 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

(7) 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、京都市、2016 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 シャーガス病疑い者における検査結果およびアンケート調査結果

No.	性別	年齢	出身地	検査方法		1 幼少時代に住んでいた家の在室構造	2 子供の頃に一番長く過ごした地域は	3 サングラといふ虫を しっていますか 1: はい 2: いいえ	4 サングラに刺された ことはありますか 1: はい 2: いいえ 3: わからない	5 輸血を受けたことが ありますか 1: はい 2: いいえ 3: わからない	6 日本で献血をしたこ とはありますか 1: はい 2: いいえ 3: わからない	7 シャーガス病をしっ ていいますか 1: はい 2: いいえ	8 シャーガス病の検査 を受けたことがありますか 1: はい 2: いいえ 3: わからない	9 誰が家族でシャーガ ス病と診断された人 はいいますか 1: はい 2: いいえ	10 心疾患、消化器疾 患を指摘されたこと はありますか 1: はい 2: いいえ
				抗体	TaqMan PCR										
1	F	N.D.	Bolivia	陽性	陽性				N.D.						
2	M	15	Japan (Bolivia)	陽性	陽性	日本国内	日本	2	2	2	1	1	1	1	1、消化器疾患
3	N.D.	N.D.	Japan	陰性	陰性				N.D.						
4	F	N.D.	Brazil	陰性	陰性				N.D.						
5	F	N.D.	Brazil	陰性	陰性				N.D.						
6	F	81	Brazil	陰性	陰性	木造一階建	Brazil	1	2	2	2	2	2	2	1
7	M	49	Brazil	陽性	陽性				N.D.						
8	M	59	Brazil	陽性	陽性	木造	Brazil	2	2	2	2	2	1	2	2
9	M	N.D.	Japan	陰性	陰性				N.D.						
10	M	N.D.	Japan	陰性	陰性				N.D.						
11	M	66	Japan	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	2	2	2	1	2	2	2
12	F	63	Brazil	陽性	陽性	土壁	Brazil	1	2	2	2	1	1	1	1、母、妹、従姉妹
13	M	65	Japan	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	2	2	2	1	2	2	1、心疾患
14	M	71	Japan	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	2	2	2	1	2	2	2
15	M	38	Brazil	陰性	陰性	Casa de comcoto	Brazil	1	3	2	2	1	2	2	2
16	M	37	Japan	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	2	2	1	1	2	2	2
17	M	34	Bolivia	陰性	陰性	Casa de comcoto	Bolivia	1	3	2	2	3	3	3	3
18	F	38	Japan	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	2	2	2	1	2	2	1、幼少期に過敏性腸症候群
19	F		Brazil	陰性	陰性	農場	Brazil	2	2	2	3	2	2	2	2
20	M	60	Brazil	陰性	陰性	レンガ	Brazil	1	3	2	2	1	2	2	1、心疾患

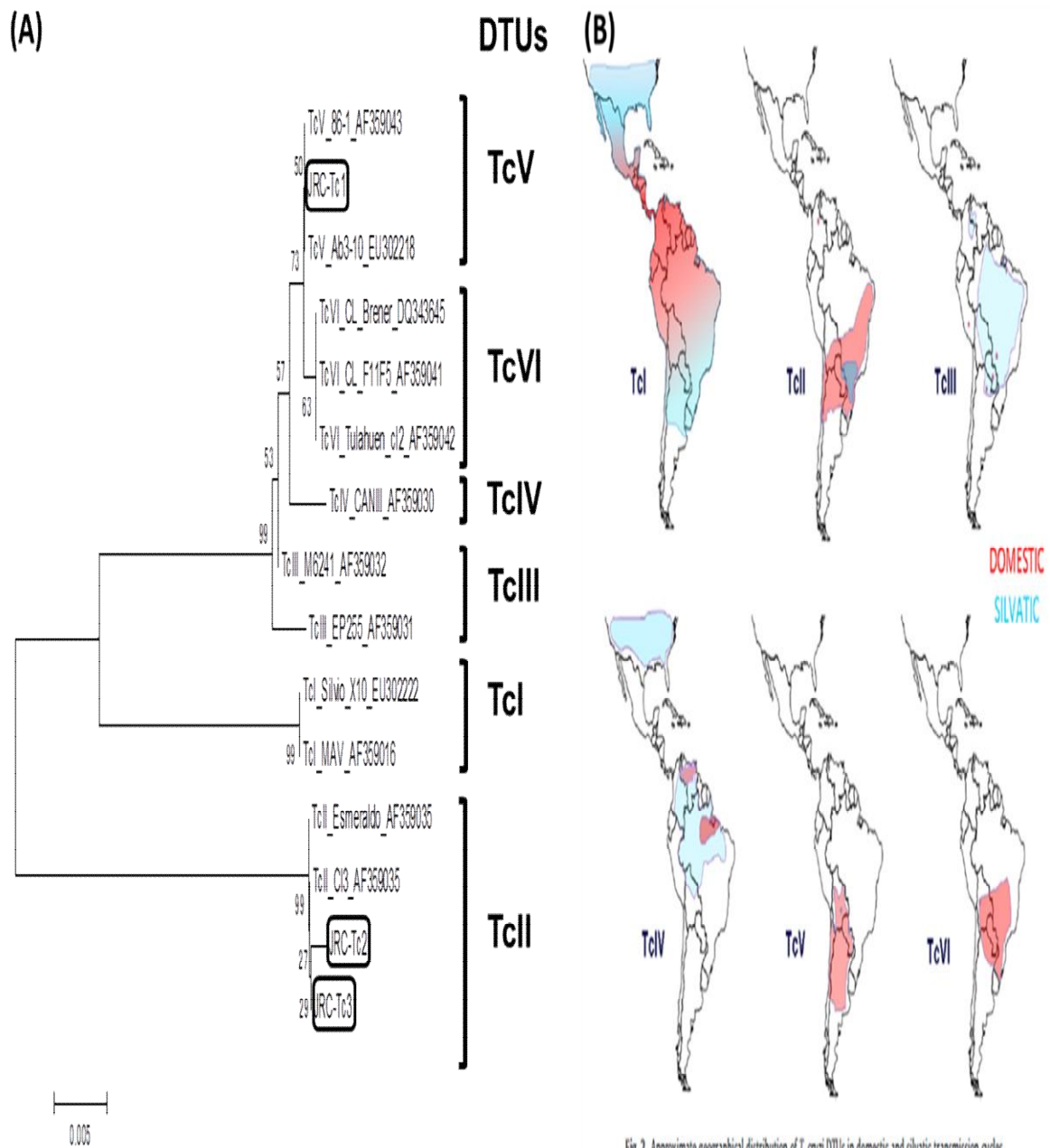


Fig. 2. Approximate geographical distribution of *T. cruzi* DTUs in domestic and silvatic transmission cycles.

図1 (A) *T. cruzi* ミトコンドリア遺伝子における分子系統樹解析、(B)中南米地域における遺伝子型の分布域 (Zingares et al. Infection, Genetics and Evolution, 12, 2012)

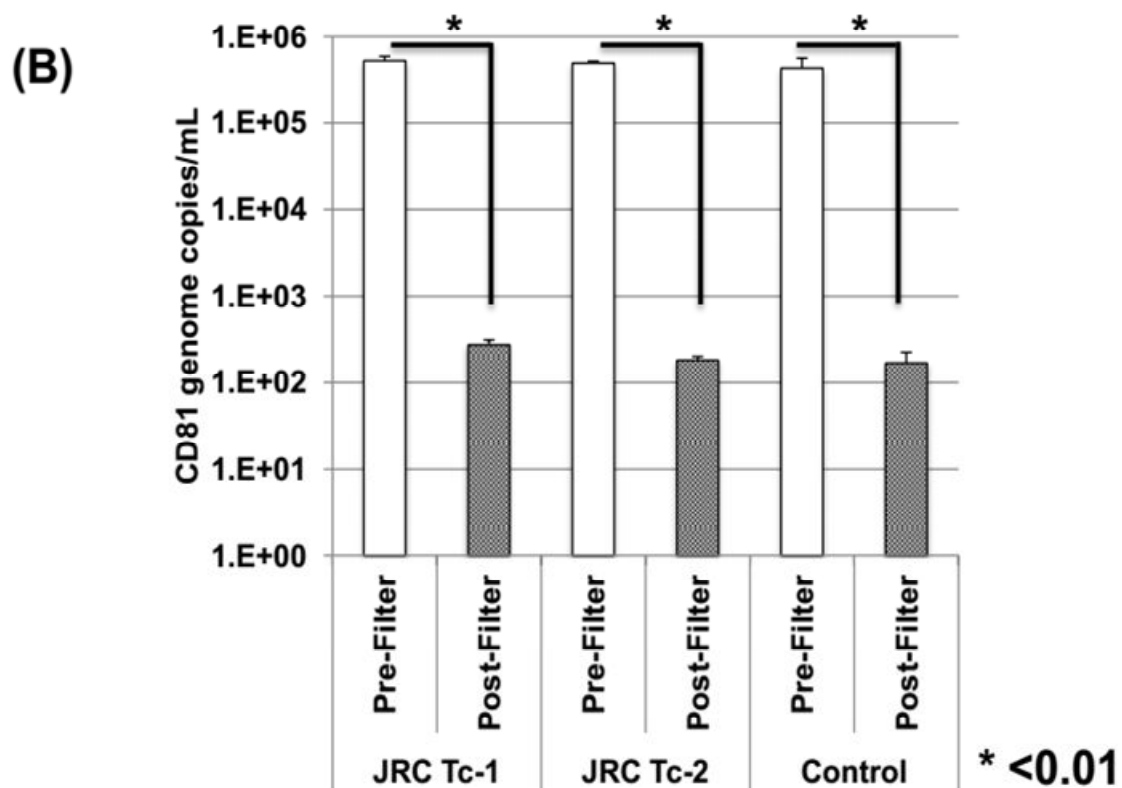
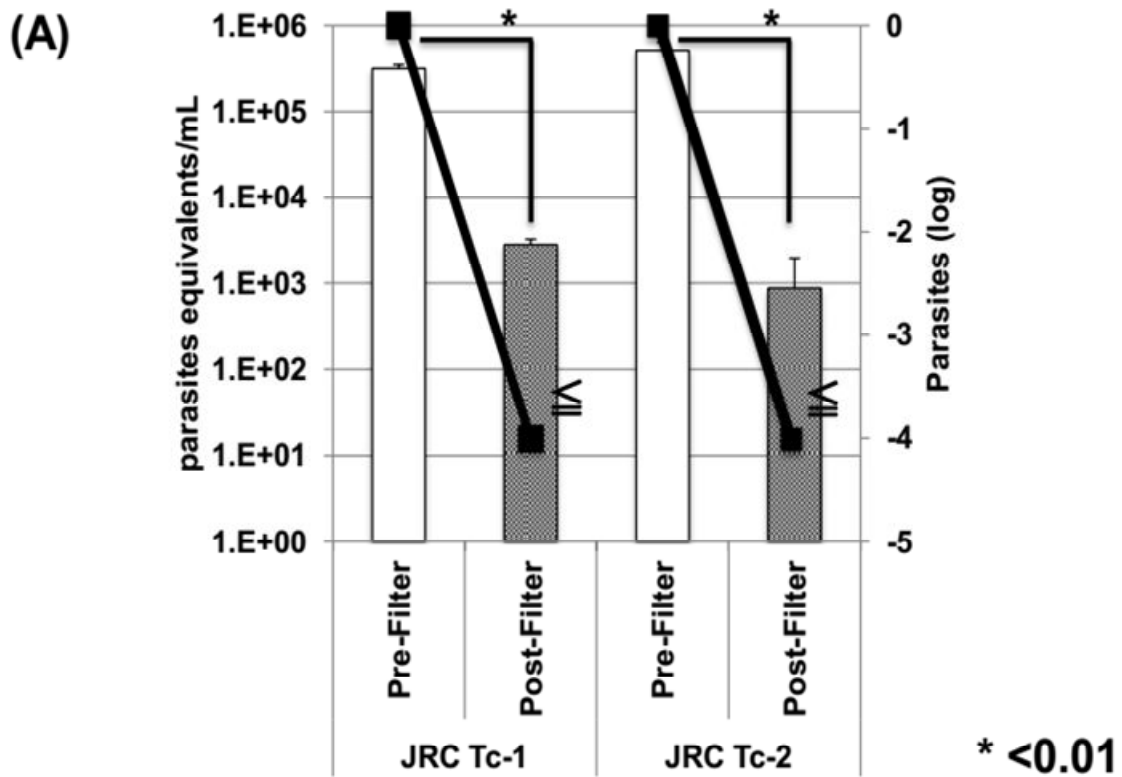


図2 白除フィルターによる(A) *T. cruzi* 量および (B) ヒトCD81による白血球数の推移

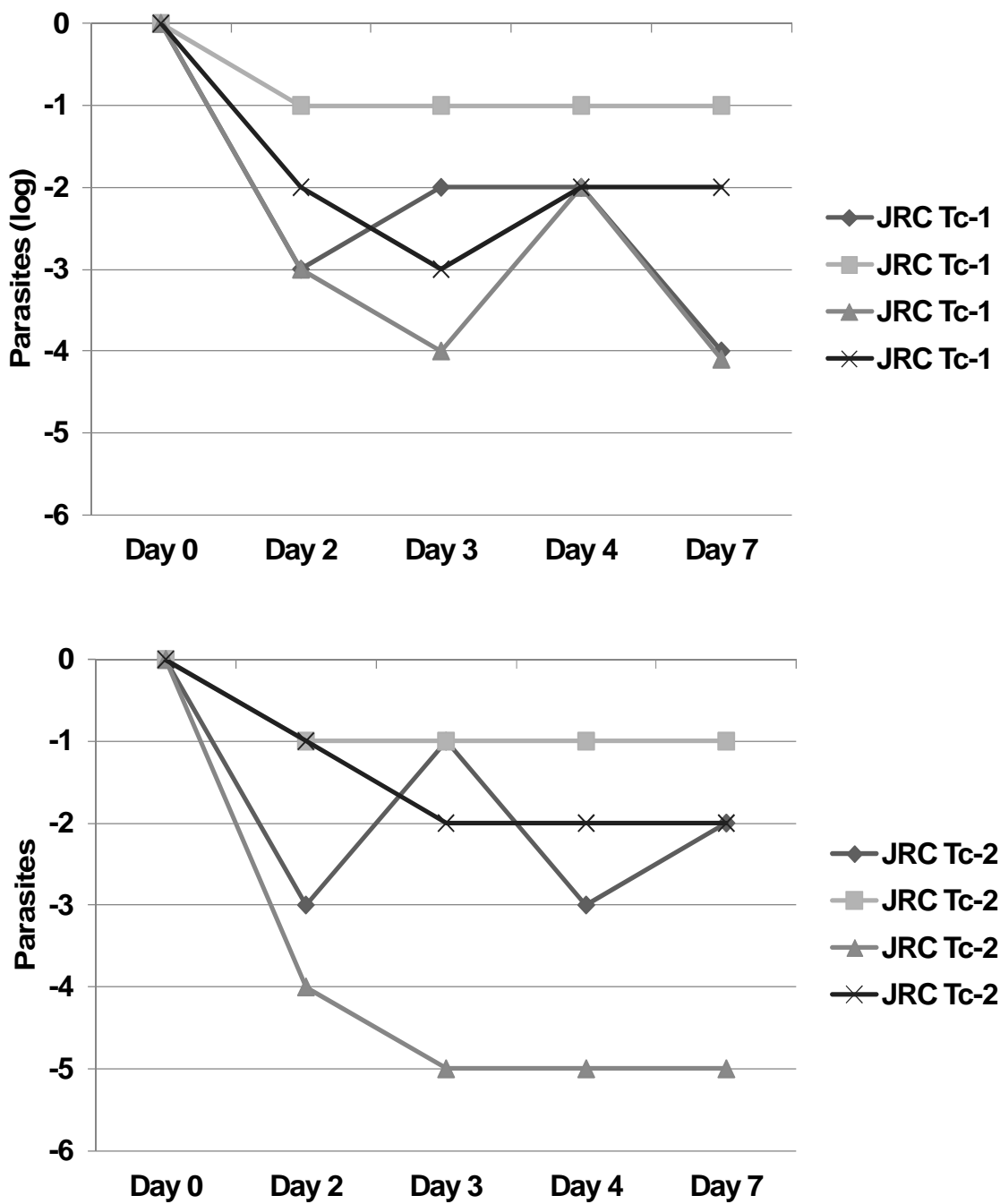


図3 PC中における *T. cruzi* の動態

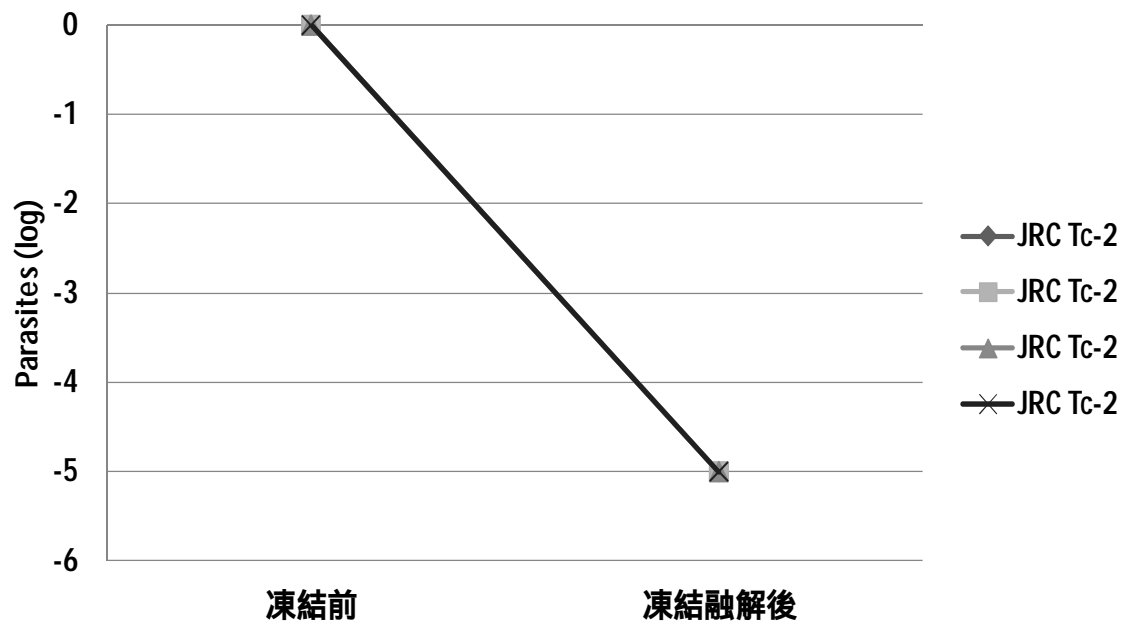
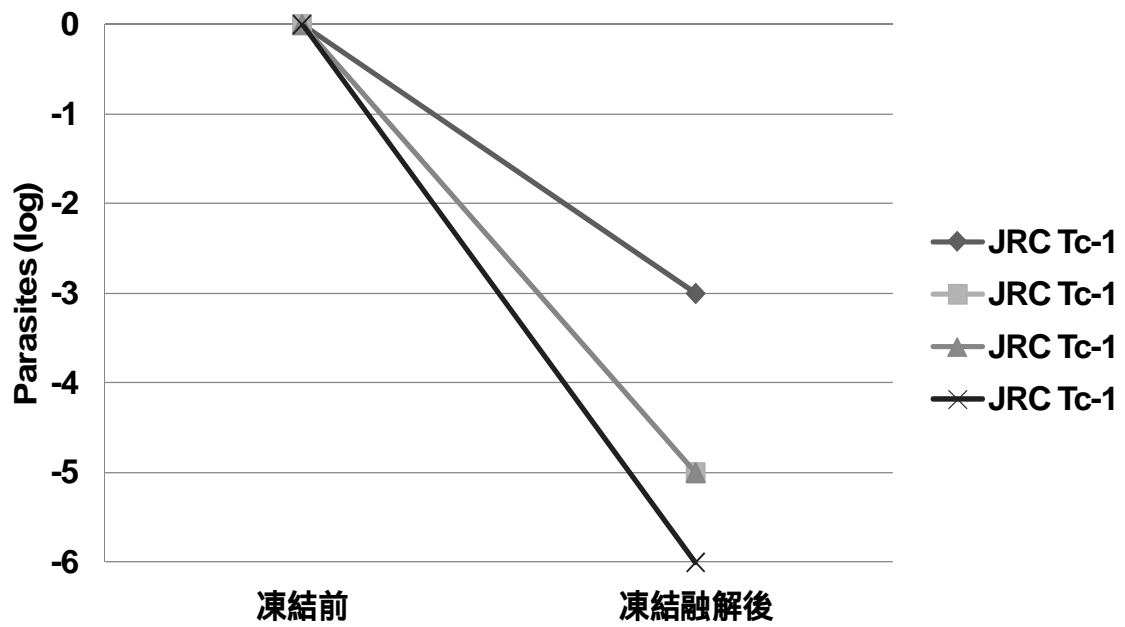


図4 FFP中における *T. cruzi* の動態

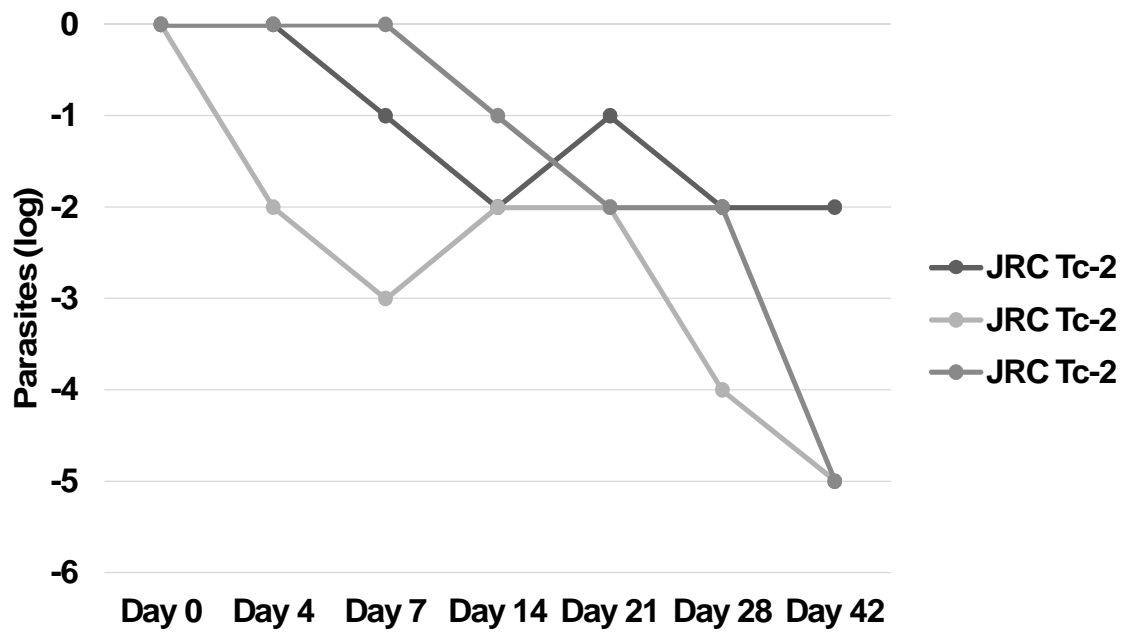
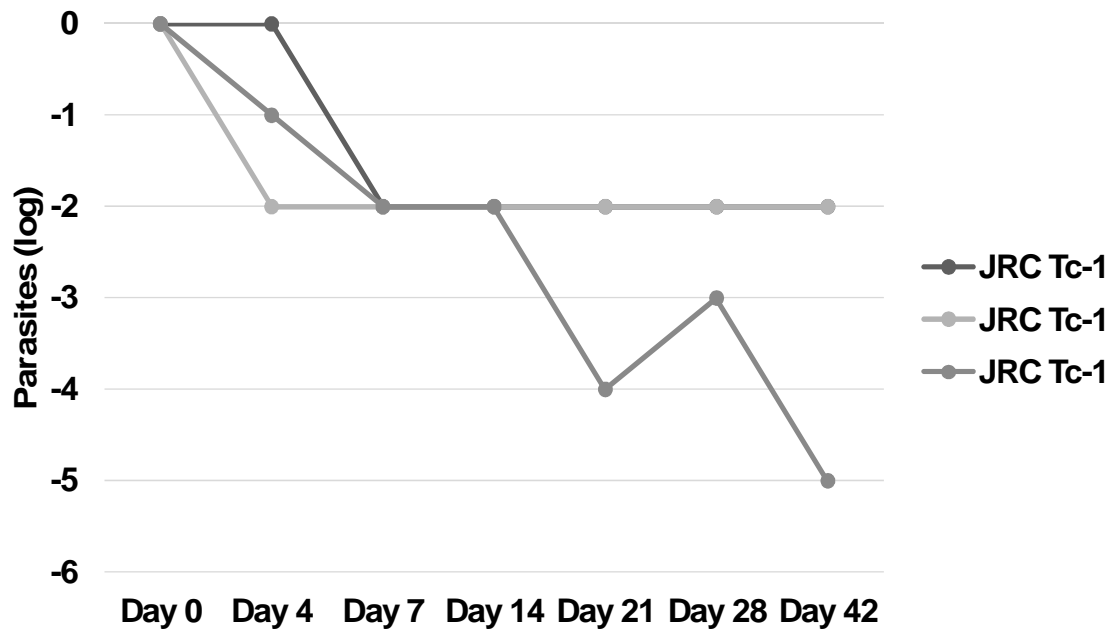


図5 RBC中における *T. cruzi* の動態

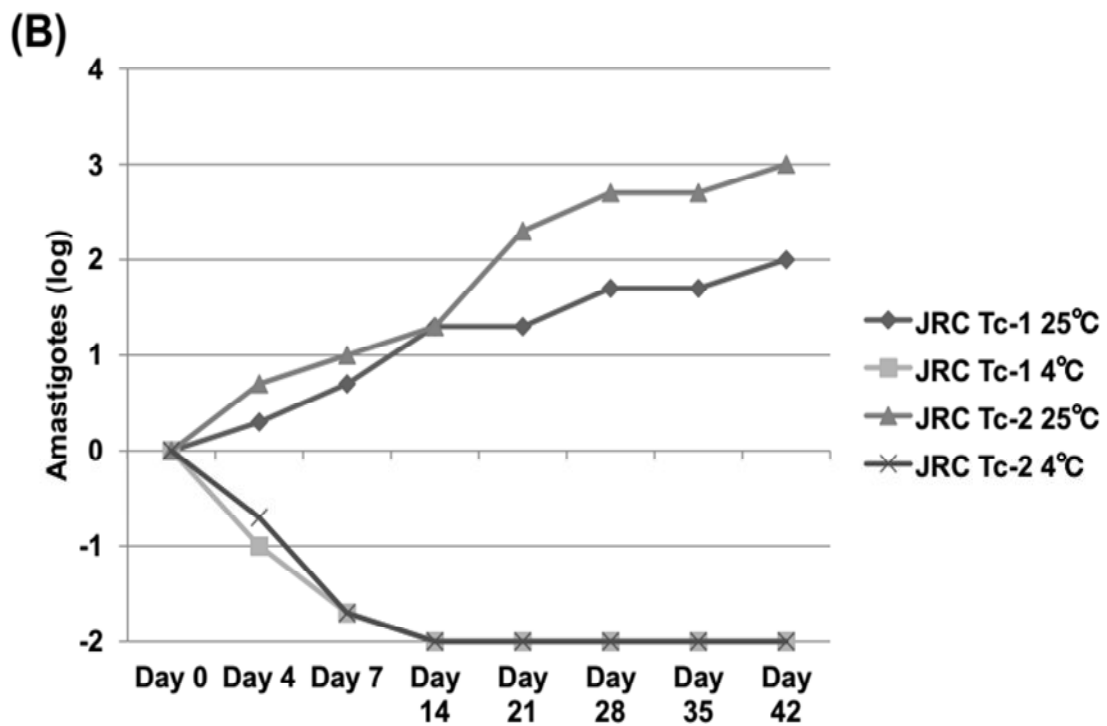
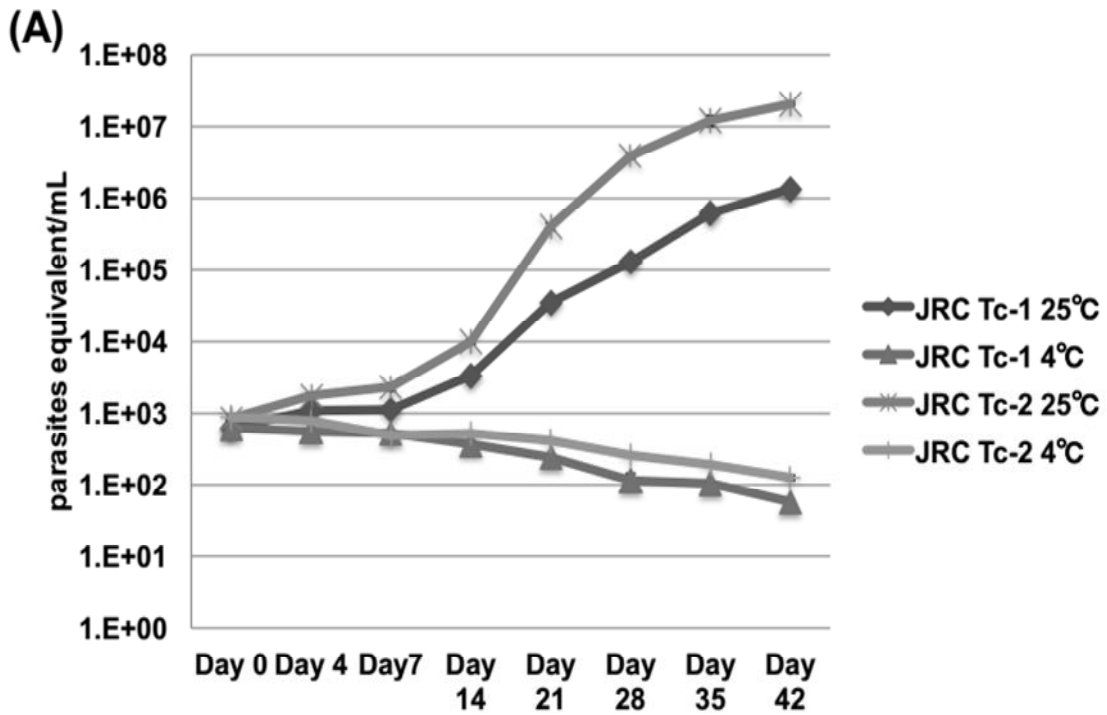


図6 低温環境下における *T. cruzi* の (A) 増殖能および (B) 感染能の評価

表2 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	富士レボオ	凝集法(人工担体凝集法)	非糖化 <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3 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									Tcl						
	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（参考）

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, <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
Munkhjargal T, Ishizaki T, Guo, swanto A, Takei, mae 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, Aboge GO, Uemura 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
Tezuka K, Kuramitsu M, <u>Okuma K</u> , Nojima K, Araki K, Shinozaki N, Matsunohara N, Matsumoto C, Satake M, Takasaki T, 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

<p>Tuvshintulga B, Sivakumar T, Battsetseg B, Narantsatsaral Sia, O, Enkhtaivan B, Battur B, Hayashida K, Okubo K, Ishizaki T, Inoue N, Igarashi I, <u>Yokoyama N.</u></p>	<p>The PCR detection and phylogenetic characterization of Babesia microti in questing ticks in Mongolia.</p>	<p>Parasitol Int</p>	<p>64(6):</p>	<p>527-532</p>	<p>2015</p>
<p>Terkawi MA, Cao S, Herbas M, S, Nishimura M1, Li Y, Mouni PF, Pyarokhil AH, Kondoh D, Kitamura N, Nishikawa Y, Kato K, <u>Yokoyama N</u>, Zhou J, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X.</p>	<p>Macrophages are the determinant of resistance to and outcome of nonlethal Babesia microti infection in mice.</p>	<p>Infect Immun</p>	<p>83(1)</p>	<p>8-16</p>	<p>2015</p>