

200838055A

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

献血血の安全性確保と安定供給のための新興
感染症等に対する検査・スクリーニング法等
の開発と献血制限に関する研究

(H20-医薬-一般-077)

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21 (2009) 年 3 月

研究代表者 倉 根 一 郎

(国立感染症研究所)

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

献血の安全性確保と安定供給のための新興
感染症等に対する検査・スクリーニング法等
の開発と献血制限に関する研究

(H20-医薬-一般-077)

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21（2009）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

献血血の安全性確保と安定供給のための新興感染症等に対する検査・スクリーニング法等の開発と献血制限に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

II. 分担研究報告

血液からの異常プリオン除去法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・7

研究分担者：岡田義昭（国立感染症研究所・血液・安全性研究部）

国内外でのシャーガス病キャリアーの把握と献血対策に関する研究・・・・・・・・・・13

研究分担者：三浦左千夫（慶應義塾大学・医学部）

ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応及び国内献血におけるシャーガス病の感染リスクの把握・・・・・・・・・・・・・・・・・・15

研究分担者：百瀬俊也（日本赤十字社・血液事業本部）

献血制限を実施するための媒介蚊の分布、飛翔範囲、発消長に関する基礎的研究・・19

研究分担者：小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部）

新規フラビウイルス検出法開発のための基盤的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・23

研究分担者：田島茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

献血血の安全性確保と安定供給のための新興感染症等に対する検査・スクリーニング法等
の開発と献血制限に関する研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部・部長）

研究要旨：献血血の安全性確保と安定供給のため、変異型プリオン病、シャーガス病、およびウエストナイルウイルス等のフラビウイルスを対象として検査・スクリーニング法等の開発と献血制限に関する研究を行った。異常プリオン除去法の開発については異常プリオン感染細胞由来の培養上清にキレート剤を添加することによって安定した感染価が得られるようになった。また、異常プリオン感染細胞由来の培養上清に含まれる異常プリオンは 20nm のウイルス除去膜によって効率よく除去することが可能であった。シャーガス病キャリアーの把握については医療現場、ラテンアメリカ人側双方に、シャーガス病に対しての関心が高まり、献血スクリーニングキットに関しても実用は可能であった。ウエストナイルウイルス（WNV）の国内感染が認められた場合の献血者への対応について日赤血液管理センターまたは中央血液研究所にてWNV-NATを実施することを想定し、全国都道府県別のNAT検体搬送シミュレーション案を検討した。フラビウイルス媒介蚊であるアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカの吸血源動物の解析において、アカイエカ種群の2種は野鳥とほ乳動物の両方からほぼ同率で吸血すること、ヒトスジシマカは哺乳動物吸血嗜好性が高いが、一部野鳥からも吸血することが示された。蚊の飛翔範囲に関しては、最も離れた再捕獲地点は1,200mであった。また、臨床検体中の感染性フラビウイルスを簡便、迅速かつ高感度に検出する方法を確立するためのレプリコンプラスミドおよびレポーターミニゲノムプラスミドの構築を行った。

研究分担者：

岡田 義昭（国立感染症研究所・血液・安全性研究部 室長）

小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医学部 部長）

田島 茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部 主任研究官）

三浦左千夫（慶応大学・医学部 熱帯医学寄生虫学教室 助教）

百瀬 俊也（日本赤十字社・血液事業本部 輸血学 安全管理課長）

A. 研究目的

近年、ヒトや物の国際間の頻繁な移動によって感染症が拡大し、これまで日本には存在しなかった病原体が国内に持ち込まれている。特に国内でウエストナイル熱やデング熱等が発生した場合、スクリーニング法の導入の他に早期に適切な献血制限地域を設定し、一方で必要な献血量を確保しなければならない。これらの感染症は蚊が媒介するため、蚊の種類や行動範囲、蚊の体内でのウイルスの越冬の有無などを基に制限地域を設定する必要がある。この班研究ではスクリーニング法の開発や献血制限を科学的知見から検討することによって安全な血液の供給を目指す。また、シャーガス病は南米に流行する慢性の感染症であるが、南米居住歴を有する献血者の抗体保有率等の研究は実施されていなかった。実態を明らかにすることで南米居住歴を有する献血者からの献血制限等を検討し、輸血の安全

性に貢献できる。また、変異型プリオン病の対策として、英国滞在歴等による献血制限を実施してきた。効果的な血液からのプリオン除去法が開発することによって、安全性向上と献血制限の緩和が期待できる。本研究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した。

B. 研究方法

1. 異常プリオン除去法の開発

英国で発生した変異型プリオン病の血液製剤による感染リスクを無くすため、英国滞在歴を有する献血者は献血制限を受けている。国内においても狂牛病と診断された牛が存在するため、全くリスクがないとは言えない。異常プリオンの除去法を開発することによって、血液製剤の安全性の向上と献血制限の緩和を目指す。結果が得られるまで長期間を要する動物実験の代用として *in vitro* 感染系を確立し、さらに、この系を用いて生体膜に存在するプリオンのリガンドの検索を継続し、生体分子を用いた異常プリオン除去法を開発する。

3. シャーガス病キャリアーの把握

南米からの欧米への移民によって欧米では、輸血や臓器移植によるシャーガス病の感染が問題になっている。我が国においても日系の在日ブラジル人が数十万人いることから、献血を介した感染リスクが存在する。在留ラテンアメリカ人の在留登録者の多い地域において輸血による感染リスクを評価する。

3. フラビウイルスに関する研究

地球温暖化とヒトの国際的な移動によって感染地域が拡大し、ウエストナイルウイルス等のフラビウイルスが国内に侵入する危険性がある。媒介する蚊が日本に存在するため、診断がつかないまま感染が拡大し、輸血を介して感染する危険性と献血制限による輸血用血液の不足が危惧される。国内発生に備えて、診断法やスクリーニング法の開発、及びその具体的実施体制を検討する。さらに、適切な献血制限を実施するために、蚊の行動範囲や分布密度を解析する。また、ウイルスが蚊の体内で越冬する可能性についても検索する。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる場合には、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を遂行した。動物を用いる実験の倫理面においては、各研究機関の動物実験委員会において審査し承認を得た上で行なった。

C. 研究結果

1. 血液からの異常プリオン除去法の開発

(1) キレート剤による感染価の評価

凍結されている培養液を溶解後、室温に1時間静置すると感染性が認められなくなった。一方、キレート剤を添加した培養液からは 10^9 希釈まで異常プリオンのバンドが検出された。

(2) ウイルス除去膜による異常プリオンの除去効果

キレート剤を添加した培養液を20nmのポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過したところ濾過前の検体から検出された異常プリオンのバンドはどの希釈検体からも検出されなかった。

2. 国内外でのシャーガス病キャリアーの把握

在日ラテンアメリカ人の多い地域からの医療機関を通じての検査依頼に基づき、血清抗体の有無について検討を行った。さらに、在日ラテンアメリカ人集中地域におけるNPO、NGOが行う地域医療相談会に於いてシャーガス病についての検診啓発活動を行った。また神奈川県内の日系ブラジル人を多く雇用する企業の企業内検診血清について検査企業からの提供をうけ*T. cruzi*抗体の検討を行った。本年度全国の医療機関からは9件のシャーガス病除外診断の依頼があり、1例の抗体陽性者を除き他は陰性であった。

一方、NPO、NGOが実施した、地域医療健康相談会では、77名のうち男性1名が陽性、女性1名が擬陽性であった。潜在中の献血状況は77名中1名が献血協力をしていた。

3. ウエストナイルウイルス及びシャーガス病を対象とした献血対策

ウエストナイルウイルス(WNV)の国内感染が認められた場合の献血者への対応については、感染媒体ごとに献血制限範囲やW

NV-NATの実施有無などが示されている。都道府県単位で1ヵ月間WNV-NATが実施できるよう当該試薬を購入し日本赤十字社(血液管理センター)に備蓄した。血液管理センターまたは中央血液研究所にてWNV-NATを実施することを想定し、全国都道府県別のNAT検体搬送シミュレーション案を検討した。

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴を有する2007年の献血申込者数を集計した。その数は19カ国6,621名であり、その内ブラジル居住者は約半数の3,381名であった。都道府県別では、愛知県の881名が最も多く、神奈川県、東京都、埼玉県と続いた。中南米諸国からの定住者が多い地域に対する検討が必要であると考えられた。

4. フラビウイルス媒介蚊の分布、飛翔範囲、発生消長

フラビウイルス媒介蚊デアルアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカの吸血源動物の解析の結果、アカイエカ種群の2種は野鳥とほ乳動物の両方からほぼ同率で吸血すること、ヒトスジシマカは哺乳動物吸血嗜好性が高いが、一部野鳥からも吸血することが示された。蚊の飛翔範囲に関しては、兵庫県西宮市の西宮浜でアカイエカ約2万匹を放逐し、その後4日間100mから1,200mの同心円状にトラップを設置して再捕獲を行った。その結果、再捕獲された雌成虫は121個体で、放逐された雌成虫10,183個体の約1.2%であった。最も離れ

た再捕獲地点は1,200mであった。この人工島のアカイエカ幼虫の主要な発生源7,000ヶ所に薬剤を処理して、その後、トラップで成虫の捕集を行った。その結果、薬剤処理前のトラップによる平均捕獲数と比較して、顕著な防除効果が認められなかったことから、アカイエカ種群は、相当広範囲に飛翔し、人工島周辺地区から移入して来ることが強く示唆された。

5. フラビウイルス新規検出法開発

臨床検体中の感染性フラビウイルスを簡便、迅速かつ高感度に検出する方法を確立するためのデング1型ウイルスレプリコンプラスミドおよびレポーターミニゲノムプラスミドの構築を試みた。レプリコンプラスミドについては2種類が完成した。各レプリコンプラスミドから合成したレプリコンRNAを培養細胞に導入し、経時的にレポーター活性を測定した。導入RNAに由来するレポーター遺伝子の発現は確認されたものの、細胞内で複製されたRNAに由来するレポーター遺伝子の発現は確認出来なかった。一方、ミニゲノムプラスミドは現在構築中である。

D. 考察

血液からの異常プリオン除去法の開発においては、プリオン淡白が凝集し易い性質に注目して、キレート剤という一般的な試薬の添加でこの欠点を改善した。さらに、キレート剤存在下に20nmのウイルス除去膜を用いて異常プリオンが効果的に除去で

きることも明らかした。このことから培養液中の異常プリオンは、粒子状の構造を呈していることが推定できる。また、キレート剤添加によって培養液中での性状を詳細に検討することが可能となった。

シャーガス病キャリアーの把握においては、各地医療機関からはラテンアメリカ人の心疾患（心拡張症）の場合にシャーガス病除外診断が求められた。医療現場末端でシャーガス病について関心が示され始め二次感染予防にも繋がる。また、各地のラテンアメリカ人支援NPO、NGOの実施するネットワークを通じシャーガス病検診呼びかけ等啓発が必要である。本年度は77名の検査希望者についての*T. cruzi*抗体検査をすることが出来たが、在日外国人対象の活動ではコミュニティーネットワークの重要性が重んじられる。

迅速抗体スクリーニングキット開発は、既存のものとは比べ感度が鋭敏であるように思われる。感染予防を目的の抗体スクリーニングには充分評価できるものと考えられた。

WNV-NAT実施対象の都道府県の検体はMPXと共にWNV-NATを行うこととしている。2008年12月から従来の3NAT実施施設に加え、九州血液センターでも九州7県分のNATを行うこととした。WNV-NATを都道府県単位で実施する場合、九州各県の血液管理センターへの検体搬送などの課題を詰めておく必要がある。また、北海道のWNV-NATの実施につ

いては、その実施施設を何処にするかについて検討を要する。血液センターの集約化の動きを参考にしながら引き続きシミュレーション案を作成し、具体的な検査実施手順など進める必要がある。

我が国は、温帯地域に存在する南北に長い地形を有しており、九州以北に関しては季節の変化が明確である。一方、南西諸島の南側に位置する沖縄本島、石垣島、西表島では、蚊の発生消長は本州と異なっており、越冬する蚊は存在せず、1月から2月に幼虫の発育期間が著しく長期化し、成虫密度が低下することが知られている。アカイエカ種群、ヒトスジシマカなど都市部で夏期に普通に見られる種類は、4月中旬から11月上旬にかけて活動が認められるが、それ以外は卵や成虫の状態越冬している。その意味で献血制限の期間の設定は春から秋にかけての8ヶ月間程度が想定される。また、蚊の種類によって飛翔範囲が相当異なることから、蚊媒介感染症ごとに献血制限範囲の設定が必要となる。しかし、患者の行動に関する聞き取り調査を速やかに行う必要があり、これらの情報を基に総合的に判断しなければならない。都市部に分布するアカイエカ種群やヒトスジシマカの吸血嗜好性も、吸血動物の分子同定のデータが存在することから、種々の角度から検討が可能と思われる。

E. 結論

異常プリオン除去法の開発については

BSE 感染細胞由来の培養上清にキレート剤を添加することによって安定した感染価が得られるようになった。また、BSE 感染細胞由来の培養上清に含まれる異常プリオンは 20nm のウイルス除去膜によって効率よく除去できることが可能であった。

シャーガス病キャリアーの把握については医療現場、ラテンアメリカ人側双方に、シャーガス病に対する関心が高まり、献血スクリーニングキットに関しても実用は可能であった。フラビウイルス媒介蚊であるアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカの吸血源動物の解析において、アカイエカ種群の 2 種は野鳥とほ乳動物の両方からほぼ同率で吸血すること、ヒトスジシマカは哺乳動物吸血嗜好性が高いが、一部野鳥からも吸血することが示された。蚊の飛翔範囲に関しては、最も離れた再捕獲地点は 1,200m であった。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi M, Komagata O, Nihei N. Global warming and vector-borne infectious diseases. *Journal of Disaster Research* 3(2):105-112, 2008.

Kobayashi M, Kasai S., Sawabe K., Tsuda Y. Distribution and ecology of potential

vector mosquitoes of West Nile fever in Japan. *Global Environmental Research*, 12:27-33, 2008.

Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes*, 36: 323-329, 2008.

2. 学会等発表

1) 国際学会

なし

2) 国内学会

田島茂、加藤文博、小滝徹、貫井陽子、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルスゲノム 3' 非翻訳領域上の欠失・挿入変異体の性状解析。第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 20 年 10 月)

貫井陽子、田島茂、池田真紀子、小滝徹、加藤文博、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS4A の 1 アミノ酸変異は IFN β の誘導を低下させることにより病原性を高める。第 5 6 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 20 年 10 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

分担研究報告書

血液からの異常プリオン除去法の開発

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 BSE 牛由来の異常プリオンが感染した細胞は、培養上清中に異常プリオンを産生する。この培養液中には高い感染価の異常プリオンが存在するが、室温に静置すると感染価は変動し、除去効率の評価ができないことが生じた。プリオンタンパクは凝集し易い性質を有することから、培養液にキレート剤を添加することによって、この問題を改善した。添加によって少なくとも1時間静置しても感染価は安定であった。また、キレート剤存在下に20nmのウイルス除去膜を用いて異常プリオンの除去を検討したところ、効果的な異常プリオンの除去が可能であった。

A. 研究目的

プリオン病は感染後、場合によっては数十年後という長い潜伏期を経て発症する。輸血を介した変異型CJDの感染が英国で報告されたため、我が国では感染を防止するためにヨーロッパに一定期間滞在歴を有する供血者からの献血を制限している。血液製剤の安全性確保向上のためには、プリオン病に対するスクリーニング法の開発や除去法の開発が必要であるが、発症前の血液中に存在する異常プリオンは極微量だと推定されている。また、血液中に異常プリオンがどのような性状で存在しているのか明らかになっていない。脳乳剤に存在する異常プリオンの性状が血液中に存在するプリオンと同じであるという保証もない。一方、これまでの異常プリオンの感染性は動物を使用した実験で評価され、結果が得ら

れるまでに長い時間と多くの動物が必要であった。最終的な評価は動物を使用するにしても血液中でのプリオンの性状解析や除去法開発のためには、短時間で結果が得られ、血液に類似した感染系の開発が必要である。我々は、これまでにBSE感染牛由来の異常プリオンを用いて *in vitro* 感染系を作製した。僅か3-4週間で結果が得られたが、抗体処理等で長時間反応する場合に感染価が変動する欠点があった。今年度は、より安定した評価系を作るためにキレート剤を用いて感染価の検討を行った。安定した評価法を確立することによって培養液中に存在する異常プリオンの性状を詳細に解析し、除去法に有用な知見を得ることを目指した。

B. 研究方法

(1) 異常プリオンの検出法

細胞を 0.4mL の Lysis buffer (150mM NaCl、0.5% Triton X-100、0.5% sodium deoxycholate、50mM Tris-HCl (pH7.5)) に溶解後、1 万 g 1 分間の遠心によって核成分を除いた上清を得た。タンパクを定量し、200 μ g/200 μ L に調整後、Proteinase K (PK) を最終濃度 20 μ g/mL になるように添加し、37°C 45 分間反応させた。10 μ L の pepablock を加えて PK の反応を止め、8 倍量のメタノールを添加し、20°C にて 3400 g、30 分の遠心を行った。沈殿は尿素入りのローディングバッファーに溶解し、ウエスタンブロット (以下 WB) を行った。異常プリオンの検出はウサギ抗ヒトプリオン抗体を用いた化学発光法によって行った。

(2) 異常プリオンを含む培養上清の調整

WB にて感染が確認された感染細胞株を牛の脳乳剤の混入を否定するために 6 ヶ月以上継代した。感染細胞株の培養上清を 10000 g、10 分間の遠心にて細胞残屑を除去し、さらに 0.45 μ m のフィルターで濾過した。0.5mL に分注して -80°C で保存した。

(3) In vitro 感染価測定法

感染前日に 24 穴プレートに 1×10^5 個の細胞を播く。培養上清を種々の濃度に PBS を用いて 10 倍づつの段階希釈し、非感染細胞に各 100 μ L ずつ添加した。細胞と異常プリオンとの接触を亢進させるためにポリブレンを最終濃度 5 μ g/mL になるよ

うに添加した。感染 1 日後に培養上清を吸引し、新しい培養液と交換した。コンフルレント状態になった後に 6 穴プレートに移し、2 回/週の頻度で継代した。感染の有無は、感染 3-5 週後の細胞を 10 cm ディッシュで増やし、4 日間培養後、(1) の方法によって検出した (図 1)。異常プリオンのバンドが検出できた最大希釈倍率の逆数を感染価とした。なお、継代によるコンタミネーションを防止するために、全てのチップは綿栓付きのものを使用した。

(4) キレート剤処理による感染価測定に与える影響

プリオンタンパクは凝集し易いことが知られており、異常プリオンを含む培養上清の処理操作中に凝集しないようにすることは、除去効率を正確に評価するためや安定した成績を得るために必要である。そこで安価で細胞に影響が少ないキレート剤を培養液に添加し、感染性を評価した (図 2)。異常プリオンを含む培養上清を 2 つに分け、一方にキレート剤を、他方にコントロールとして PBS を添加し、60 分間室温に静置した。静置した各々の培養液を

(3) の方法に従って希釈後、細胞に感染させ感染価を求めた。なお、添加したキレート剤の濃度では細胞増殖に大きな影響はなかった。

(5) ウイルス除去膜による異常プリオンの除去効果

4 で得られたキレート剤が添加された培養液を 20nm のポアサイズのウイルス除去

膜によって濾過した。濾液は(3)の感染価測定法に従って希釈後、細胞に感染させ、4週間継代し、感染価を測定した。

C. 研究結果

(1) キレート剤による感染価の評価

凍結されている培養液を溶解後、室温に1時間静置すると感染性が認められなくなった。一方、キレート剤を添加した培養液からは 10^9 希釈まで異常プリオンのバンドが検出された(図2)。

(2) ウイルス除去膜による異常プリオンの除去効果

キレート剤を添加した培養液を20nmのポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過したところ図2に示すように濾過前の検体から検出された異常プリオンのバンドはどの希釈検体からも検出されなかった。

D. 考察

輸血を介した感染が英国4例報告され異常プリオンのスクリーニング法や除去法の開発が求められているが、発症前の供血者のプリオンの量は極めて微量なことから検出することは現在の技術を持ってしても困難である。逆に微量なプリオン量であれば吸着フィルター等によって除去することは可能である。受血者の異常プリオンの負荷を減少させることで発症しないで一生を過ごすことも期待できる。除去法開発で明らかにしなければならないこ

とは、血液中の異常プリオンの性状である。プリオン病を発症した感染動物の血液に存在する異常プリオンの量は少なく、性状を解析することは困難であることから高い感染価を有し、血液に類似した性状の検体を得ることが必要である。我々の系は感染細胞から高い感染価の培養上清が得られ、脳乳剤よりも血液中の異常プリオンの性状を反映したプリオンと思われる。3-4週間で結果が得られるメリットがあるが、その一方で、解凍した培養液を直ちに使用する場合は感染価に問題はなかったが、室温等で抗体等と反応させると感染価が安定化しない傾向があった。1時間室温に静置すると感染価が見られなくなり、評価に窮することがあった。今回、プリオン淡白が凝集し易い性質に注目して、キレート剤という一般的な試薬の添加でこの欠点を改善できた。さらに、キレート剤存在下に20nmのウイルス除去膜を用いて異常プリオンが効果的に除去できることも明らかにできた。この現象から培養液中の異常プリオンは、粒子状の構造を呈していることが推定できる。また、キレート剤添加によって培養液中での性状を詳細に検討することが可能になった。

E. 結論

BSE感染細胞由来の培養上清にキレート剤を添加することによって安定した感染価が得られるようになった。また、BSE感染細胞由来の培養上清に含まれる異常プ

リオンは 20nm のウイルス除去膜によって効率よく除去できることが可能であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 岡田義昭：血小板製剤の病原体不活化、第 15 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、大阪、2008 年

2) 岡田義昭：血液製剤の現状と今後の課題、第 22 回エイズ学会ランチョンセミナー、大阪、2008 年

3) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE 由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用（第 2 報）、プリオンシンポジウム 2008、新得（北海道）、2008 年

4) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、山口一成：BSE 由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用、第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2008 年

5) 梅森 清子、岡田 義昭、水沢 左衛子、嶋崎 典子、米山 徹夫、山口一成：血液製剤の安全性向上をめざした新規ウイルス不活化法の開発、第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2008 年

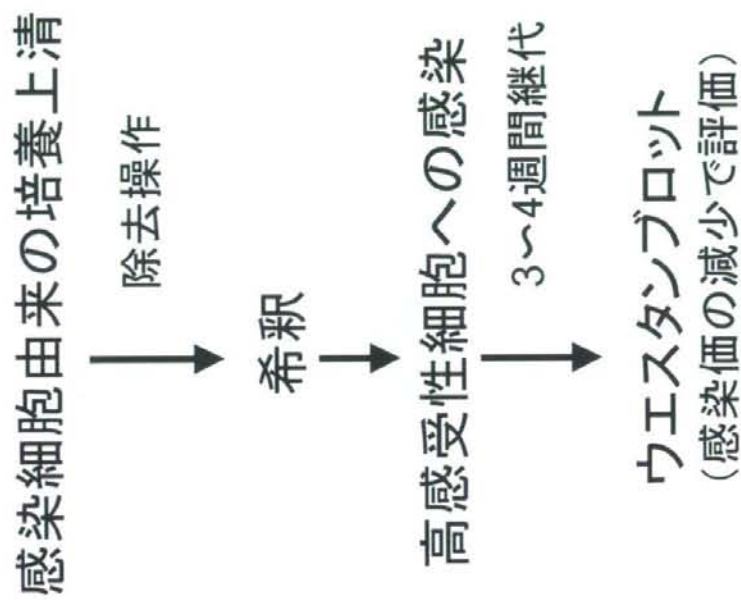


図1 異常プリオン感染価の測定法

1. Negative

2. X1

3. 10^{-1}

4. 10^{-2}

5. 10^{-3}

6. 10^{-4}

7. 10^{-5}

8. 10^{-6}

9. 10^{-7}

10. 10^{-8}

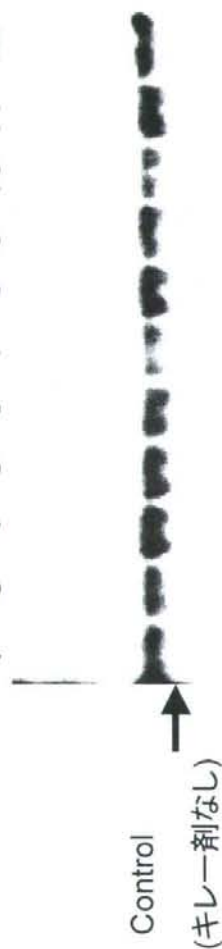
11. 10^{-9}

12. 10^{-10}

13. 10^{-11}

14. 10^{-12}

1 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



1 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



図2 キレート剤添加による感染価測定法の改良とウイルス除去膜による異常プリオンの除去

国内外でのシャーガス病キャリアーの把握と献血対策に関する研究

研究分担者 三浦 左千夫 慶應義塾大学医学部・助教

研究要旨：在日ラテンアメリカ人の定住化に伴い、地域に密着した献血協力活動に参加するものも少なくない。そうしたかれらの中に、南米特有のシャーガス病キャリアーの存在が明らかになってきた以上、在日ラテンアメリカ人についてその感染率を把握すること、献血現場でその抗体スクリーニングを行うことの出来る迅速診断キット開発の検討を行う。

A. 研究目的

- ① 在日ラテンアメリカ人の *T. cruzi* 抗体保有者の検索。慢性感染キャリアーの把握。
- ② 献血現場・輸血センターなどで対応できる簡便迅速抗体測定キットの開発。

B. 研究方法

- ① 在日ラテンアメリカ人の多い地域からの医療機関を通じての検査依頼に基づき、血清抗体の有無について検討を行った。
- ② 在日ラテンアメリカ人集中地域におけるNPO、NGOが行う地域医療相談会に於いてシャーガス病についての検診啓発活動を行った。国内（三重県、滋賀県、長野県、神奈川県など）。また神奈川県内の日系ブラジル人を多く雇用する企業の企業内検診血清について検査企業からの提供をうけ *T. cruzi* 抗体の検討を行った。
- ③ 開発中の迅速キットについて、本疾患流行地の患者血清について、既存の迅速診断キットと比較検討をいった。（ブラジル日系移住地巡回診療など）

C. 研究結果

本年度全国の医療機関からは9件のシャーガス病除外診断の依頼があり、1例の抗体陽性者を除き他は陰性であった。一方、NPO、NGOが実施した、地域医療健康相談会では、77名のうち男性1名が陽性、女性1名が擬陽性であった。滞在中の献血状況は77名中1名が献血協力をしていた。

D. 考察

各地医療機関からはラテンアメリカ人の心疾患（心拡張症）の場合にシャーガス病除外診断が求められた。医療現場末端でシャーガス病について関心が示され始め二次感染予防にも繋がる。

各地のラテンアメリカ人支援NPO、NGOの実施するネットワークを通じシャー

ガス病検診呼びかけ啓発講演を行い、77名の検査希望者についての *T. cruzi* 抗体検査をすることが出来、在日外国人を対象の活動ではコミュニティーネットワークの重要性が重んじられる。

迅速抗体スクリーニングキット開発は、既存のものとは比べ感度が鋭敏であるように思われる。感染予防を目的の抗体スクリーニングには充分評価できるものと考えられる。

E. 結論：

医療現場、ラテンアメリカ人側双方に、シャーガス病に対しての関心が高まり、献血スクリーニングキットに関しても実用は可能であり、医療現場、献血現場でのシャーガス病病原体についての抗体スクリーニング検査は早期実施に移すべきである。

F: 在日ラテンアメリカ人集団には慢性シャーガス病キャリアーの存在が強く示唆された。

G: 研究発表

1. 論文：

Chagas病に対する臨床医の対応と、日系人、非日系人との意識の差
日本臨床寄生虫学会誌 19巻65-68頁
(2008)

2. 学会発表

第17回国際熱帯病学会
「日本におけるラテンアメリカ人の慢性トリパノソーマクルーズ感染について」
2008-9月29~10月3日（済州島）

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

迅速抗体スクリーニングキットが実用化される際には十分に考慮する点が生じる。

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
平成 20 年度研究報告書

「献血の安全性確保と安定供給のための新興感染症等に対する
検査・スクリーニング法等の開発と献血制限に関する研究」
(H20-医薬一般-077)

分担研究報告書

ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応及び
国内献血におけるシャーガス病の感染リスクの把握

研究分担者 百瀬俊也 日本赤十字社血液事業本部 安全管理課長

研究要旨：

ウエストナイルウイルス（以下、WNVという）の国内感染が認められた場合の献血者への対応については、感染媒体ごとに献血制限範囲やWNV-NATの実施有無などが示されている（平成 17 年度第 1 回血液事業部会安全技術調査会）（表 1）。都道府県単位で 1 ヶ月間WNV-NATが実施できるよう当該試薬を購入し日本赤十字社（血液管理センター）に備蓄した。血液管理センターまたは中央血液研究所にてWNV-NATを実施することを想定し、全国都道府県別のNAT検体搬送シミュレーション案を検討した。

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴を有する 2007 年の献血申込者数を集計した。その数は 19 カ国 6,621 名であり、その内ブラジル居住者は約半数の 3,381 名であった。都道府県別では、愛知県の 881 名が最も多く、神奈川県、東京都、埼玉県と続いた。中南米諸国からの定住者が多い地域に対する検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応には、感染媒体及び感染源により献血制限の範囲、制限期間及びNATの実施の有無などが示されている。3～11月の期間に都道府県単位でWNV-NATを実施することを想定したシミュレーションを検討することは、献血血液の安全性確保と安定供給に一定の担保を得ることができる。

国内献血におけるシャーガス病の感染リ

スクを把握することは、南米からの定住者が 40 万人ともいわれる日本において、献血血液の重要な安全対策上の課題と言える。献血申込者の居住歴の問診事項から措置を講ずる必要性のある対象の絞り込みを行い、具体的な調査の基礎資料とする。

B. 研究方法

都道府県単位で 1 ヶ月間実施可能なWNV-NAT試薬を血液管理センターに

備蓄し、各都道府県単位でNAT検体を送付可能な集荷搬送時刻等を検討した。

中南米諸国の居住歴を有する2007年の献血申込者数を血液事業統一コンピュータシステムより抽出し集計した。

C. 研究結果

WNV-NAT試薬(Procleix® WNV Assay)を5000テスト分血液管理センターに備蓄した。これは20プールで検査を実施した場合、約10万検体の検査が実施可能である。2007年の都道府県別の献血者数で最も多いのは東京都の550,489人であり、1ヵ月平均が約46,000人なので約2ヶ月間実施可能な量である。

本試薬はTMA法の試薬であり、現在のところ測定可能な機器を保有しているのは京都府福知山市の血液管理センター及び東京都江東区の中央血液研究所である。

東北、関東甲信越及び沖縄の検体については、中央血液研究所で現行のHBV、HCV及びHIV-1、-2のTaqScreen MPXに加えWNV-NATを実施し、中部、近畿、中・四国及び九州(沖縄を除く)の検体については、血液管理センターで同様に実施することとした。検査結果を翌朝9時までに確定するようさせることを目標に、各地域の集荷時刻とNAT実施施設への到着時刻を表2に示す。

北海道については、3ウイルスのTaqScreen MPXに加えてHEV-NATを実施していることから、WNV-NATの実実施施設を何処にするかについては検討を要す。

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴を有する2007年の献血申込者数を集計した。その数は19カ国6,621名であり、その内ブラジル居住者が最も多く約半数の3,381名であった(表3)。都道府県別では、愛知県の881名が最も多く、神奈川県633名、東京都617名、埼玉県538名、静岡県437名、大阪府434名と続いた(図1)。都道府県別献血者申込者数1万人当たりの中南米諸国居住歴者の占める割合は、静岡県の26.61及び愛知県の25.27人が高かった。

D. 考察

WNV-NAT実施対象の都道府県の検

体はMPXと共にWNV-NATを行うこととしている。2008年12月から従来の3NAT実施施設に加え、九州血液センターでも九州7県分のNATを行うこととした。WNV-NATを都道府県単位で実施する場合、九州各県の血液管理センターへの検体搬送などの課題を詰めておく必要がある。また、北海道のWNV-NATの実施については、その実施施設を何処にするかについて検討を要す。

血液センターの集約化の動きを参考にしながら引き続きシミュレーション案を作成し、具体的な検査実施手順など進める予定である。

このようにWNV-NATの実施体制の準備を進めているが、発生時に迅速に対応するためにはWNVの国内での発生状況について、厚生労働省及び国立感染症研究所などと情報共有しておくことが重要である。

シャーガス病は、サシガメが媒介して感染する*Trypanosoma cruzi*感染症である。日本での感染は、感染者からの輸血などのほか新たなリスクはないといっている。しかし、南米からの定住者が40万人ともいわれる中から献血する方たちが少なからずいることが予想されるので、今後、定住者が多い地域での抗体検査も検討しておく必要がある。

現状においては、数々の問診項目に回答する必要があるため、日本語を十分に理解していない外国人は献血に協力することは困難なことから一定のバリアとなっている可能性がある。

中南米居住歴の献血申込者が実際にはどの程度献血に進んでいるかを今後調査する予定である。また、定住者が多い地域の血液センターでの、シャーガス病の理解を深めるための研修も必要と考える。

E. 研究発表

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし