

200940029A

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21年度 総括・分担研究報告書

平成22 (2010) 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21年度 総括・分担研究報告書

平成22（2010）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・・・・・・・・・・・・ 15

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

研究分担者：百瀬俊也（日本赤十字社・血液事業本部）

献血制限に関する昆虫媒介性感染症の問題・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

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、感染細胞から産生される異常プリオンを Triton X-100 又は SDS 処理し、感染価を測定したところ、感染性は保持され、両者の間では感染価に著名な差は認められなかった。各々の界面活性剤処理したプリオンを 20nm のポアサイズを有するウイルス除去膜を用いて濾過したところ、Triton X-100 処理した濾液を感染させた細胞から異常プリオンは検出されず、効率良く異常プリオンが除去されることが明らかとなった。シャーガス病キャリアの把握については、210 名の在日日系ブラジル人の検査希望者について *T. cruzi* 抗体検査を行った。在日外国人の本疾患感染状況の把握するためラテンアメリカ人集住地域での健康相談会にて 3 名の抗体陽性者を見出した。一方、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 2008 年の献血申込者数及び献血者数を集計・解析した。ブラジル居住歴を有する者は、献血申込者数 4,572 人、献血者数 3,752 人であり、いずれも全体の約半数を占めた。中南米居住歴者の都道府県別の献血者数では、愛知県の 960 名が最も多かった。重要なアルボウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカは、都市部の公園、墓地、戸建て住宅の庭などで朝方から夕方まで執拗に吸血する。密度が高い場所では、8 分間吸血飛来してきた雌成虫を捕虫網で捕集すると 20-50 頭捕集される環境が存在した。迅速、高感度かつ簡便に感染性ウイルスを検出できる新規フラビウイルス検出方法の開発を目指し、デングウイルスレポーターミニゲノムクローンを作製した。さらに本クローンのマイナス鎖 RNA を導入した細胞よりルシフェラーゼ活性が検出できた。

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科学
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
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。本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。シャーガス病は南米に流行する慢性の感染症である。これまで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が、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する。また、変異型プリオン病に関しては、効果的な血液からのプリオン除去法を開発する。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する。

B. 研究方法

1. 異常プリオン除去法の開発

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。

2. シャーガス病キャリアーの把握

欧米においては、シャーガス病侵淫地である南米からの移民からの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。我が国においても南米出身者からの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住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

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。

（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

感染細胞から産生される異常プリオンを Triton X-100 又は SDS 処理し、感染価を測定したところ、感染性は保持され、両者の間では感染価に著大な差は認められなかった。各々の界面活性剤処理したプリオンを 20nm のポアサイズを有するウイルス除去膜を用いて濾過したところ、Triton X-100 処理した濾液を感染させた細胞から異常プリオンは検出されず、効率良く異常プリオンが除去されることが明らかとなった。一方、SDS 処理した異常プリオンは濾液を感染させた細胞からは異常プリオンが検出され、感染価はウイルス除去膜で濾過する前のものと変わらなかった。

2. 国内外でのシャーガス病キャリアーの把握

210名の在日日系ブラジル人の検査希望者について *T. cruzi* 抗体検査を行った。在日外国人の本疾患感染状況の把握するためラテンアメリカ人集住地域での健康相談会にて3名の抗体陽性者を見出した。迅速キットの開発については既存の検査キットと結果は一致し、なおかつ献血現場で充分判定が可能なキットの試作が出来た。また、献血希望者に対する安全血液提供を呼びかける啓発用パンフレットを作成した。

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、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日本赤十字社 (血液管理センター) に備蓄しており、献血者が最も多い東京都の1ヵ月平均 51,000 人で 1.8 ヵ月間検査可能であると試算された。

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 2008 年の献血申込者数及び献血者数を集計・解析した。その数は 21 カ国・地域で献血申込者数 9,435 人、献血者数 7,709 人であり、献血申込者の 82% が献血していた。その内ブラジル居住歴を有する者は、献血申込者数 4,572 人、献血者数 3,752 人であり、いずれも全体の約半数を占めた。中南米居住歴者の都道府県別の献血者数では、愛知県の 960 名が最も多く、以下、東京都、神奈川県、大阪府、埼玉県、静岡県の順であった。

4. アルボウイルス媒介蚊の分布、飛翔範囲及び蚊体内でのウイルス増殖

インド洋島嶼国、インド、東南アジアで流行しているチクングニヤウイルスは、蚊体内での増殖速度が著しくはやく感染後 2 日目には唾液腺にウイルスが確認されている。その意味で、デング熱や日本脳炎ウイルスと相当ことなるウイルスであることが示された。チクングニヤの媒介蚊は、我が国では青森県以外の東北以南の地域に広く分布するヒトスジシマカである。都市部の公園、墓地、戸建て住宅の庭などで朝方から夕方まで執拗に吸血するヤブカで、密度

が高い場所では、8分間吸血飛来してきた雌成虫を捕虫網で捕集すると20-50頭捕集される環境が存在する。その意味で、チングニヤ熱患者の居住環境によっては、容易にウイルスを取り込み、近隣の住人に感染を起こすことが予想される。

5. フラビウイルス新規検出法開発

迅速、高感度かつ簡便に感染性ウイルスを検出できる新規フラビウイルス検出方法の開発を目指し、デングウイルスレポーターミニゲノムクローンを作製した。さらに本クローンのマイナス鎖RNAを導入した細胞よりルシフェラーゼ活性が検出できたことから、レポーターミニゲノムのマイナス鎖が合成されればルシフェラーゼ活性により検出可能であることが示唆された。レポーターミニゲノムのプラス鎖RNAとデング1型ウイルスレプリコンRNAを共導入しルシフェラーゼ解析を行なったが、活性は検出されなかった。

D. 考察

血漿分画製剤の病原体除去法として広く使用されているウイルス除去膜による異常プリオン除去について界面活性剤の影響を検討した。界面活性剤の種類によって異常プリオンの大きさが異なることが示唆された。感染細胞から産生される異常プリオンの除去には20nmのウイルス除去膜が有効であることが示されたが、製造工程で使用される界面活性剤の種類によっては異常プリオンの除去能に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。

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210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が重要である。

迅速抗体スクリーニングキットは、既存のものと同レベルの感度であり、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の実施体制の準備を進めるうえで、発生時に迅速に対応するためには、4カ所のNATセンターいずれでも実施可能なTaqMan PCR法の試薬の検討も必要であると考えられる。また、WNVの国内での発生について、厚生労働省及び国立感染症研究所と情報共有しておくことが重要であると考えられる。

シャーガス病に関しては、2008年に中南米居住歴を有する献血者が年間7,700人いることが明らかとなった。その約半数がブラジル居住歴を有する献血者であった。その献血者の年齢分布では、感染リスクの低いと考えられる30代以下の若い世代が約2/3を占めていた。愛知県、静岡県など東海地域にブラジル居住歴を有する献血申込者が偏在していることから、これらの地域で、中南米居住歴を有する献血申込者に対して、パイロットスタディとしてシャーガス病に関する事前問診項目、倫理面に配慮した*T. cruzi*抗体検査など具体的な検討を行う必要があると考えられた。

重要なアルボウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカは哺乳動物特に人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。アカイエカの飛翔範囲に関しては、昨年の報告書でまとめ、最低で 1.2km としたが、その後の薬剤防除の効果実験等の結果から数キロは飛翔することが強く示唆された。ヒトスジシマカは 100~150m が行動範囲と言われているが、患者の行動範囲も考慮しつつ、患者宅周辺の狭い範囲に二次、三次の患者が発生する可能性を排除するために、成虫防除対策と適正な献血制限地域の設定を行うことが重要であると考えられる。

E. 結論

異常プリオン除去法の開発については、感染細胞から産生される異常プリオンを Triton X-100 又は SDS 処理し、感染価を測定したところ、感染性は保持され、両者の間では感染価に著名な差は認められなかった。各々の界面活性剤処理したプリオンを 20nm のポアサイズを有するウイルス除去膜を用いて濾過したところ、Triton X-100 処理した濾液を感染させた細胞から異常プリオンは検出されず、効率良く異常プリオンが除去されることが明らかとなった。シャーガス病キャリアーの把握については、210 名の在日日系ブラジル人の検査希望者について *T. cruzi* 抗体検査を行った。在日外国人の本疾患感染状況の把握するためラテンアメリカ人集住地域での健康相談会にて 3 名の抗体陽性者を見出した。一方、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 2008 年の献血申込者数及び献血者数を集計・解析した。ブラジル居住

歴を有する者は、献血申込者数 4,572 人、献血者数 3,752 人であり、いずれも全体の約半数を占めた。重要なアルボウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカは密度が高い場所では、8 分間吸血飛来してきた雌成虫を捕虫網で捕集すると 20-50 頭捕集される環境が存在した。迅速、高感度かつ簡便に感染性ウイルスを検出できる新規フラビウイルス検出方法の開発を目指し、デングウイルスレポーターミニゲノムクローンを作製した。さらに本クローンのマイナス鎖 RNA を導入した細胞よりリンフェラーゼ活性を検出した。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology*. 15;391(1):119-29, 2009

Takasaki, T., Kotaki, A., Lim, C.-K., Tajima, S., Ohmatsu, T., Moi, M.-L., and Kurane, I. Arbovirus infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. *J. Disaster Res.* 4: 322-328, 2009.

竹内勤、三浦左千夫:しのびよるシャーガス病 — 中南米の知られざる感染症。慶應義塾大学出版 2009年

2. 学会等発表

1) 国際学会

なし

2) 国内学会

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3報）、プリオンシンポジウム 2009、蔵王（宮城）、2009 年

岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子：プリオン感染細胞から培養液中に産生される異常プリオンの性状、第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年

三浦 左千夫、竹内 勤：輸入感染症：在日ラテンアメリカ人の慢性シャーガス病キャリアーと 2 次感染予防 58 回日本臨床寄生虫学会東日本学術集会

田島茂、加藤文博、高崎智彦、倉根一郎：ウイルス性状を左右する日本脳炎ウイルス E 蛋白質上のアミノ酸置換。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（平成 21 年 10 月）

田島茂、高崎智彦、倉根一郎：デング 1 型ウイルス非構造蛋白質 NS4A の N 末端側領域の解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（平成 21 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

分担研究報告書

血液からの異常プリオン除去法の開発

研究分担者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 血漿分画製剤の病原体除去法として広く使用されているウイルス除去膜による異常プリオン除去について界面活性剤の影響を検討した。S/D 処理と呼ばれる界面活性剤によるウイルス不活化法は、エンベロープを有するウイルスに対して極めて不活化効果が高いことから血漿分画製剤の製造に用いられている。Triton X-100 と SDS を異常プリオンが存在する培養液に添加後、20nm のウイルス除去膜を用いて濾過し、濾過前後の異常プリオンの感染価を測定した。Triton X-100 処理した異常プリオンはウイルス除去膜によって除去が可能であったが、SDS 処理した異常プリオンは除去膜を通過し、除去できなかった。界面活性剤の種類によって異常プリオンの大きさが異なることが示唆された。感染細胞から産生される異常プリオンの除去には 20nm のウイルス除去膜が有効であることが示されたが、製造工程で使用される界面活性剤の種類によっては異常プリオンの除去能に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。

A. 研究目的

輸血を介した vCJD 感染例が英国において 4 例報告され、血漿分画製剤による感染も危惧されていた。これまでの動物を使用した感染実験から発症前の供血者の血漿中に存在する異常プリオンの量は、極めて微量であると考えられていたが、今年度で英国の血友病患者の脾臓から異常プリオンが検出され、理論的なリスクが現実のものとなった。血漿分画製剤の製造工程にはウイルスの除去・不活化を目的とした工程が 2

つ以上組み込まれており、異常プリオン除去にも効果があることが報告されている。一方で、異常プリオン除去の効率は評価に用いた異常プリオンの由来によって大きく変わることが知られ、現在のところ標準的な除去法は定まっていない。英国での感染例は異常プリオンの除去効率の低い第 8 因子製剤が原因と推定されている。今年度、我々は上記のことを踏まえて、日本の血漿分画製剤メーカーが導入しているウイルス除去膜について異常プリオン除去の効果を

検討した。昨年度の研究によってウイルス除去膜は異常プリオンを除去できることを明らかにしたが、血漿分画製剤のメーカーの多くは、最終工程の段階でウイルス除去膜を導入している。そのため、最終工程に到達するまでに様々な工程によって異常プリオンが修飾され、性状が変化している可能性は否定できない。そこで、ウイルスの不活化工程を含む製造工程を検討し、S/D処理と言われている界面活性剤処理の工程（注：全てのメーカーが導入しているわけではない）に注目した。S/D処理によってウイルス除去膜による異常プリオンの除去効率にどのような影響を与えるのか検討した。用いた界面活性剤は実際の製造工程に用いられている Triton X-100 と一般的な実験に用いられる SDS (sodium dodecyl sulfate) を用いた。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が、我々が作成した異常プリオン持続感染細胞は培養液中に異常プリオンを産生しているために血液に類似した感染系と考えられる。

B. 研究方法

(1) 異常プリオンの検出法

細胞を 0.4 mL の Lysis buffer (150 mM NaCl、0.5% Triton X-100、0.5% sodium deoxycholate、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) 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 で 45 分間反応させた。10 μ L の pefablock 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。0.5 mL 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 2 時間後に 1 mL の新しい培養液を加え培養した。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 3-4 週後に (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) ウイルス除去膜における界面活性剤処理による異常プリオン除去効果の影響

Triton X-100 を用いた処理では、(2) で調整した培養液に最終濃度 1% となるように Triton X-100 を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、処理した培養上清を 2 つに分け、一方は 20nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過し、他方はコントロールとした。ウイルス除去膜は、前処置として異常プリオンを含まない培養液で置換し、非特異的に異常プリオンが吸着しないようにした。濾過前後の培養液は (3) の感染価測定法に従って 10 倍ずつの段階希釈後、細胞に感染させ、3-4 週間継代し感染価を測定した。

SDS 処理では、2 で調整した培養液に最終濃度 2% となるように SDS を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、培養上清を 2 つに分け、一方の培養液は 20nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過し、他方はコントロールとした。ウイルス除去膜は、前処置として異常プリオンを含まない培養液で置換し、非特異的に異常プリオンが吸着しないようにした。濾過前後の培養液は (3) の感染価測定法に従って 10 倍ずつの段階希釈後、細胞に感染させ、

3-4 週間継代し感染価を測定した (図 1)。

また、添加した界面活性剤による細胞への影響と予備的に感染価を検討し、処理した培養液は 10^{-5} 以上に希釈し高感受性細胞に感染させた。

C. 研究結果

感染細胞から産生される異常プリオンを Triton X-100 又は SDS 処理し、感染価を測定したところ、感染性は保持され、両者の間では感染価に著名な差は認められなかった (図 2)。各々の界面活性剤処理したプリオンを 20nm のポアサイズを有するウイルス除去膜を用いて濾過したところ、Triton X-100 処理した濾液を感染させた細胞から異常プリオンは検出されず、効率良く異常プリオンが除去されることが明らかとなった。一方、SDS 処理した異常プリオンは濾液を感染させた細胞からは異常プリオンが検出され、感染価はウイルス除去膜で濾過する前のものと変わらなかった。SDS 処理によって 20nm のウイルス除去膜では異常プリオンはトラップできなかった (図 2)。

D. 考察

輸血を介した vCJD 感染例が英国において 4 例報告され、血漿分画製剤による感染も危惧されていたが、英国での血友病患者の感染例の報告によって現実のものとなった。血漿分画製剤は多くの供血者の血漿を 3000L 前後にプールして製造され、多種類の製剤と多数の製剤が同一の血漿から

作られる。品質的に均一な製剤を供給できるメリットもあるが、一方で、原料血漿に異常プリオンが混入した場合、多くの患者が暴露される危険性もある。ウイルス感染防止のために各血漿分画製剤メーカーは、2工程以上のウイルス除去・不活化が期待できる工程を導入している。これらの工程中には異常プリオンも除去可能なことが報告されている。我々は、昨年度の本研究班の研究により、感染細胞から産生される異常プリオンがウイルス除去膜によって除去されることを成果として報告した。しかし、ウイルス除去膜は最終工程で使用されていることが多く、それまでの製造工程によって異常プリオンが修飾され性状が変化している可能性もある。今回、2種の界面活性剤処理した異常プリオンをさらにウイルス除去膜で濾過し、異常プリオン除去効率に与える影響を検討した。TritonX-100処理では除去膜によって無処理と同等に効率良く除去された。一方、SDSでは素通りし、除去できなかった。これはTritonX-100処理では非特異的に膜に異常プリオンが吸着した可能性も否定できないが、無処理の異常プリオンも除去できることから、感染細胞から産生される異常プリオンは20nmよりも大きく、Triton X-100処理しても大きさの影響を受けなかったためと理解できる。一方、SDS処理では異常プリオンの大きさが20nm以下になったためにウイルス除去膜を通過したと推定できる。このように界面活性剤の種類によ

ってウイルス除去膜による除去効率が著明に変化することが明らかになった。異常プリオン除去の評価検体として用いられるのは、脳乳剤や脳から精製したマイクロフラクションである。検体の調整に界面活性剤を用いる場合、種類によって評価に著しい影響を与えることを考慮に入れて除去の評価を行なう必要がある。血漿分画製剤の評価には血液由来の異常プリオンを使用することが理想的ではあるが、血液中には極微量のプリオンしか存在しないために使用できない。我々の細胞株は培養液中に異常プリオンを大量に産生するために評価材料として優れていると考えられる。現在、マウスに接種し、病原性を調べているが、病原性を有することが判明すれば、血漿分画製剤からの異常プリオン除去の検体として有用なものになると思われる。

E. 結論

Triton X-100 と SDS の 2 種類の界面活性剤を用いて異常プリオンを処理し、20nmのウイルス除去膜による除去効率を検討した。Triton X-100 処理では除去可能であったが、SDS 処理ではウイルス除去膜を通過し、全く除去できなかった。感染細胞から産生される異常プリオンは、界面活性剤の種類によって大きさが変化する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Mizuochi T., Mizusawa S., Nojima K., Okada Y., and Yamaguchi K.: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen(HBsAg) “a”, determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit. Clinica chimica Acta (in press)

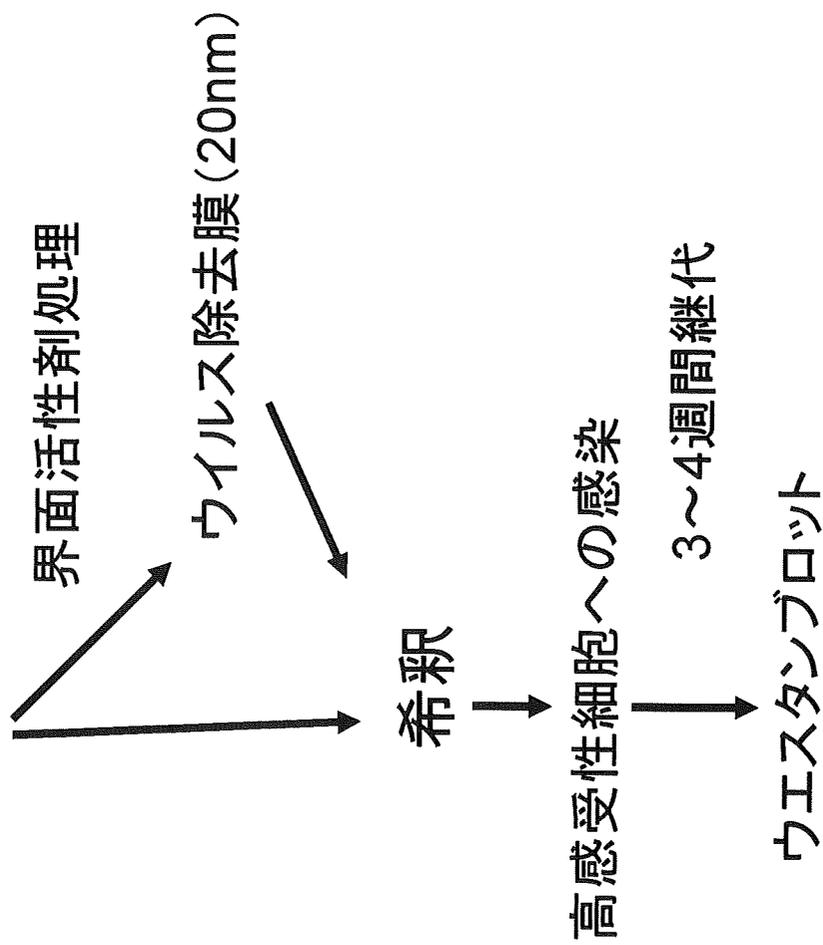
2.学会発表

- 1) 岡田義昭：パルボウイルス感染の解析、第79回日本感染症学会西日本地方会学術集会、福岡、2009年
- 2) 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3報）、プリオンシンポジウム2009、蔵王（宮城）、2009年
- 3) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子：プリオン感染細胞から培養液中に産生される異常プリオンの性状、第57回日本ウイルス学会、東京、2009年

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

感染細胞由来の培養上清



(陽性バンドが確認できるエンドポイントで評価)

図1 異常プリオン感染価の測定法

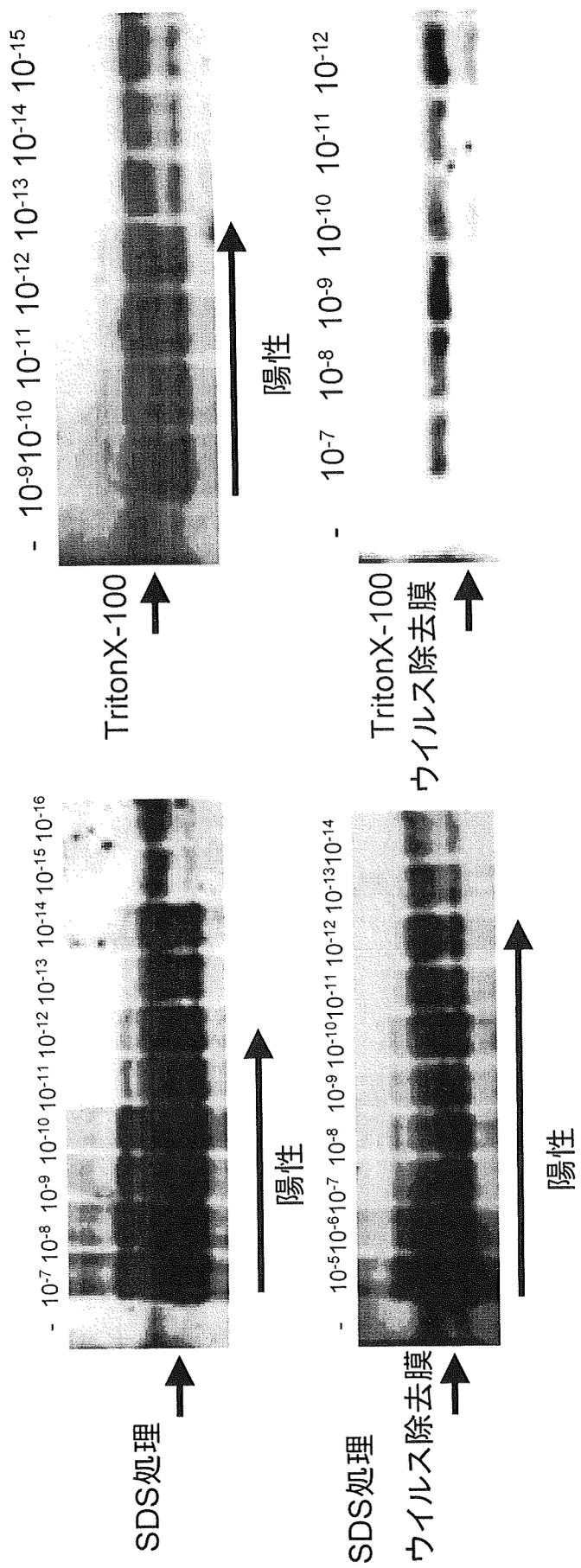


図2 ウイルス除去膜による異常プリオン除去能に
及ぼす界面活性剤処理の影響

Ⅱ. 分担研究報告書

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
分担研究報告書

国内外でのシャーガス病キャリアーの把握と献血対策に関する研究

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シャーガス病感染状況の把握・本疾患を媒介する昆虫が生息しない我が国では輸血感染、臓器移植感染、母子感染以外に感染経路は皆無である。輸血感染防止対策上、医療・献血現場でその *T.cruzi* 抗体についてスクリーニングを行うことの出来る迅速診断キットの検討を行う。今年度は在日外国人の本疾患感染状況の把握するためラテンアメリカ人集住地域での健康相談会にて 3/210 名の抗体陽性者を見出した。安全血液確保のための献血チェックシステム向上の為に検査呼びかけの啓蒙チラシの作成を行った。

A. 研究目的

- ①献血現場での問診内容の改善に向けての啓蒙教育。
- ②在日ラテンアメリカ人の *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) 抗体保有者の検索。
- ③献血現場で対応できる迅速抗体測定キットの開発検討。

B. 研究方法

在日ブラジル領事館領事部の実施する移動領事館業務に支援協力の形で、ブラジル人の集住する地方都市へ同行。調査研究参画への同意書が得られた者を対象に Chagas-Stat-Pack(Chembio) 及び開発途上キット Instant-Chek-Chagas (EY-Labo) を用いて抗体検査を行った。陽性者は更に IHA,IFAELISA 法で精査

した。

慢性シャーガス病患者保存血清(ブラジル・ポリビア)を用いて迅速スクリーニング用検査キットの評価を行った。

C. 結果

表—1

ブラジル人健康相談会におけるシャーガス抗体調査(出身地域) 2009

年齢	男性	女性	サンパウロ	パラナ	南・マトグロソ	パラ	その他
11~20	1	3	4				
21~30	13	1/17	15	10	4	1	
31~40	25	38	38	16	4	3	2
41~50	1/22	23	28	11	3	2	1
51~60	1/17	34	38	8	3		2
61~	11	6	10	5			2
合計	89	121	133	50	14	6	7

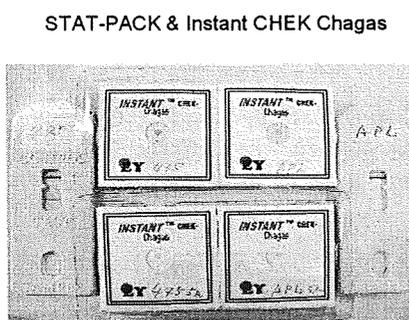
赤字は抗体スクリーニングで陽性 3/210=1.43% 献血年齢抗体陽性率 5.9%

今年度は 210 名の在日日系ブラジル人の検査希望者について *T.cruzi* 抗体検査

を行うことが出来た。その結果は表—12示す。

迅速キットの開発については既存の検査キットと結果は略一致し、なおかつ献血現場で充分判定が可能なキットの試作が出来た図—1。

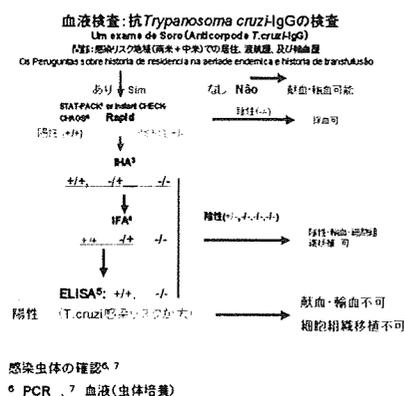
図-1



献血希望者に対する安全血液提供を呼びかけるパンフレットとして、シャーガス病に特化したチラシを印刷中で、22年度当初からラテンアメリカ人が集住する地域の献血ポストに配布する。

更に輸血用血液の *T.cruzi* 抗体スクリーニングマニュアル(図—2)についても提案する。

図—2



D. 考察

群馬県楽郡大泉、太田市、長野県飯田市など
 在日ブラジル人が集住している関東近県で、在日ブラジル大使館が実施する移動領事館健康相談会に同行し支援協力の下にブラジル人医師とともに健康相談に来た成人ブラジル人について、ブラジル在住中の生活環境などについてのアンケートも含めて、広く情報が収集できた。その結果から在日ブラジル人の63.3%がサンパウロ州から来日、23.8%がパラナ州から、6.7%が南マットグロソ州からの来日定住者で、40歳以上の年齢層で抗体陽性を認めた者はいずれもシャーガス病感染リスク地域の日系移住地出身でありパラナ州とサンパウロ州の境界地域、サンパウロ州北西部のミナス州、南マットグロソ州との境界地域からの出身であった。この地域からは既にシャーガス病慢性期の病状を示し、日本で臨床経過観察中の者も複数居ることが明らかとなっている。今回の抗体陽性者については献血、細胞臓器移植には関われないことを説明した。一方ボリビアからの定住者は2%に過ぎないが、ボリビアは現在最もシャーガス病の感染対策が遅れている国で日系移住地もその感染リスク地域に属していることからボリビア日系人が集住している地域を中心に調査を継続すれば、更に潜在感染者が検出されるはずである。

開発途上の迅速抗体検査キットは既に中南米諸国のスクリーニング検査に使