

201034004A

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22年度 総括・分担研究報告書

平成23 (2011) 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22年度 総括・分担研究報告書

平成23 (2011) 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・副所長）

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37

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 副所長）

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。プリオン研究については、マウス白血病ウイルスに感染した細胞株は非感染細胞に比べ、異常プリオンのシグナルが増強していた。レトロウイルスの出芽に関連する宿主由来の複数のタンパク質の発現に明らかな差は確認できなかった。在日ラテンアメリカ人及び南米長期滞在日本人を検査希望者について *T. cruzi* 抗体検査を行った。その結果 9 人が抗体陽性であった。内訳はボリビア人 2 名、ブラジル人 2 名、日系人 4 名、南米滞在歴のある日本人 1 名であった。中南米諸国の居住歴を有する 2009 年及び 2010 年の献血申込者数及び献血者数を集計・解析した。献血申込者の 84-85% が献血していた。東海四県管内における献血申込者のうち同意を得た者に対し、*Trypanosoma cruzi* 抗体検査を実施したが、陽性者は認められなかった。ウエストナイルウイルス (WNV) 感染献血者への対応について、迅速かつ広域的な対応を可能とするために、日本赤十字社の NAT 施設へ導入している WNV-NAT 試薬についての感度、特異性等について検討した。95% 検出感度は 30 コピー / mL であった。ヒトスジシマカの公園内の成虫発生状況と防除効果を評価した。防除を行った公園内では成虫密度が低く抑えられていた。また、ヒトスジシマカの飛翔範囲は 150m 程度あることが推察された。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の作製に成功した。

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輸血の安全性に貢献する。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. 異常プリオン感染に及ぼすマウス白血病ウイルスの影響:

ヒト脳神経由来細胞株と腎由来細胞株、及び肺由来細胞株にマウス白血病ウイルスを感染させた。3ヶ月以上継代し、全ての細胞がウイルスに持続感染している状態にした。これらの感染細胞とコントロールと

して非感染細胞を24穴プレートにまき、それぞれに異常プリオンを含む脳乳剤を同量ずつ添加して感染させた。ウシ胎児血清を最終濃度3%になるように培養液に加え、2日毎に培養液を交換した。細胞の継代は2〜3週間に1回の頻度で行ないWB用のサンプルとした。

2. 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:

ブラジル人の集住する地方都市において、調査研究参画への同意書が得られた者を対象にキットを用いて抗体検査を行った。陽性者は更にIHA, IFELISA法で精査した。開発中の検査キットの評価は慢性シャーガス病患者保存血清を用いて既存の迅速スクリーニング用検査キットとの結果比較を行い評価した。

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は国内に侵入する可能性がある。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、蚊の成虫発生状況を評価し、防除効果を評価した。

(倫理面への配慮)

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

動物を用いる実験においては、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. 異常プリオン感染に及ぼすマウス白血病ウイルスの影響：

異常プリオンが感染した細胞から異常プリオンが培養液中に放出される機序を明らかにするため、マウス白血病ウイルスに感染した細胞株を用いて異常プリオンの感染実験を行なった。神経系細胞株や腎由来細胞株において、マウス白血病ウイルスに感染した細胞株は非感染細胞に比べ、異常プリオンのシグナルが増強していた。レトロウイルスの出芽に関連する宿主由来の複数のタンパク質の発現に明らかな差は確認できなかったが、レトロウイルス感染によって異常プリオンの複製や感染拡大が促進された。

2. 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：

在日ラテンアメリカ人及び南米長期滞在日本人を含む494名の検査希望者について *T. cruzi* 抗体検査を行った。その結果9人（2%）が抗体陽性であった。内訳はボリビア人2名、ブラジル人2名、日系人4名、南米滞在歴のある日本人1名であった。開発した迅速キットは既存の検査キットと結果は一致した。

3. 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：

ウエストナイルウイルス（WNV）感染献血

者への対応について、迅速かつ広域的な対応を可能とするために、日本赤十字社のNAT施設へ導入しているWNV-NAT試薬についての感度、特異性等について検討した。95%検出感度は30コピー/mLであった。特異性・交差反応試験（RNA抽出産物）においては、WNV NY99株は0.01 pfu/mL（91コピー/mL）までが陽性率100%、0.001 pfu/mL（9.1コピー/mL）では陽性率が50%であった。日本脳炎ウイルスは交差反応性が認められたが、デングウイルス1, 2, 3, 4型はすべて陰性であった。

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2009年及び2010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、献血申込（受付）者数10,456人（2009年）、11,594人（2010年）、献血者数8,768人（2009年）、9,805人（2010年）であり、献血申込（受付）者の84-85%が献血していた。献血申込（受付）者数及び献血者数とも2008年から年毎に増加していた。ブラジル居住歴を有する者が最も多く、全体の42-46%を占めた。中南米居住歴のある者の都道府県別の献血者数では、東京都、神奈川県、愛知県が1,000人を超えており、そのうちブラジル居住歴のある者の都道府県別の献血者数では、愛知県が最も多く、以下、東京都、神奈川県、静岡県の順であった。ブラジル居住歴を有する献血者の男女別年代別の分布では、男女比は約3:1と男性の方が多く、年代別では30代が最も多かった。全体では30代以下が約6割、40代以上が約4割であり、シャーガス病の感染リスクの比較的低いと考えられる若い世代が多く献血している状況が窺えた。中南米地域からの定住者が多い東海四

県（愛知県、静岡県、岐阜県、三重県）管内における献血申込（受付）者のうち同意を得た者に対し、*Trypanosoma cruzi* 抗体検査を実施した。陽性者は認められていない

4. 献血制限に関する昆虫媒介性感染症の問題：

ヒトスジシマカの公園内の成虫発生状況を評価し、防除効果を評価する目的で、1) 公園内の雨水マスおよび周辺半径 150m 内に存在する全て雨水マスの幼虫防除および月 1 回の公園内灌木の成虫防除を行った公園 2ヶ所、2) 全く薬剤による媒介蚊防除を行わない公園 9ヶ所を設定し、毎週 1 回 8 分間人囮法による成虫捕集数を、上記 1) および 2) の公園内、1) の公園の中心から 150m 離れた 6ヶ所の捕集地点で行った。その結果、媒介蚊防除を行わなかった公園では 9 月以降 8 分間で平均 4 匹以上の捕集があったが、防除を行った公園内では平均 0.5-0.75 匹と成虫密度を低く抑えていた。また、公園の中心から 150m の周辺での捕集では平均で 0.9-2.8 匹と防除を行った公園より若干捕集数が多い傾向が認められた。これらの結果から、ヒトスジシマカの飛翔範囲は 150m 程度あることが推察され、デング熱、チクングニア熱の患者が発生した場合の献血制限地域は狭い範囲での設定が可能であることが示唆された。

5. 新規フラビウイルス検出法開発のための基盤的研究：

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の作製に成功した。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。次にレポーターミニゲノムのプラス鎖 RNA とデング 1 型ウイルスレポーターレプリコン 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。デングウイルスレプリコンの複製能を調べたところ、非常に低いあるいはほとんど複製していないことが示唆された。よってミニゲノムのレポーター活性が検出されなかった原因は、ミニゲノムの構造上の欠陥よりも複製に関わる蛋白質の供給がうまくいっていないためと考えられる。

D. 考察

昨年までの研究によって 20nm 程度のウイルス除去膜によって効率良く異常プリオンの除去が可能であったことから、異常プリオンは粒子を形成している可能性が考えられていた。マウス白血病ウイルスに感染した細胞に出芽に関連したタンパクの発現が見られなかったと記載したが、脳神経系や腎由来細胞であり血球系の細胞ではない。上皮系細胞株と血球系細胞とは異常プリオンの細胞外への放出システムが異なる可能性もある。予想された生体分子の発現の亢進が確認できれば、これらのリガンドを用いた異常プリオンの除去が可能になる可能性もある。

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。

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ヵ所のNAT施設いずれでも実施可能なTaqMan PCR法の試薬が求められる。今回市販キット試薬の検討を行ったが、限られた材料の中で、WNVスクリーニング試薬としての期待される結果は得られた。交差反応試験ではJEV-1 (Beijing-1株)が陽性となったことから、WNVを特定するための同定検査が必要となるが、スクリーニング試薬として使用できると考えられる。

南米からの定住者が約34万人ともいわれる中で、シャーガス病に関する献血問診上の取り扱いは、海外渡航歴に関連して、中南米諸国の場合、「シャーガス病の既往歴のある者から採血しないこと」としている。しかし、感染者自身も無症候期には自覚していないことから、実際にはシャーガス病の既往歴を申告する者はほとんどいないと考えられる。現状においては、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り、また、中南米の一部地域はマラリア流行地と重なることから、献血申込者のうち約15%は採血不可となっていた。年毎の推移を見てみると、中南米居住歴を有する献血者数は増加傾向である。献血者の約2/3は感染リスクの比較的低いと考えられる30代以下ではあるが、中南米地域からの定住者が多い東海四県の

調査結果を踏まえ、中南米居住地域による献血制限や定住地域偏在を考慮した選択的スクリーニング検査導入などの対策を検討することも考慮する必要がある。

都市部のヒトスジシマカの発生源近くに存在する戸建て住宅の庭の植生にヒトスジシマカが潜んでいることが知られている。庭に空き缶、古タイヤ、プラスチックバケツなどの幼虫発生源が存在しない場合、成虫は近隣の発生源から飛来し、灌木内で潜んで吸血源動物が接近するのを待っていると考えられる。どの程度の距離を飛翔して潜み場所に飛来するのかが詳細に分かっていない。そこで、西宮市の公園を利用し、公園内および周囲 150m 以内の幼虫発生源全てに薬剤を処理し、成虫の発生を抑えた実験区を設定し、調査を行った。公園周辺 150m 以内全ての幼虫防除対策を行った場合、周辺からの成虫の飛来数が著しく減少し、その結果、公園内の人囮法によるヒトスジシマカの捕集数は無処理区と比べて顕著に減少した。一方、公園からの距離 150m 付近で行った人囮法による蚊の捕集では、公園側の半分の発生源には薬剤が処理されているが、その反対側の発生源は無処理のため、平均捕集数は明らかに多い傾向が認められた。これら幼虫および成虫防除実験から、ヒトスジシマカは、約 150m 程度は飛翔することが示唆され、デング熱やチクングニア熱の患者が発生した地域における献血制限地域の設定にある種の科学的根拠を与えたと考えられる。

E. 結論

プリオン研究については、マウス白血病ウイルスに感染した細胞株は非感染細胞に

比べ、異常プリオンのシグナルが増強していた。レトロウイルスの出芽に関連する宿主由来の複数のタンパク質の発現に明らかな差は確認できなかった。

在日ラテンアメリカ人及び南米長期滞在日本人を検査希望者について *T. cruzi* 抗体検査を行った。その結果9人が抗体陽性であった。内訳はボリビア人2名、ブラジル人2名、日系人4名、南米滞在歴のある日本人1名であった。中南米諸国の居住歴を有する2009年及び2010年の献血申込者数及び献血者数を集計・解析した。献血申込者の84-85%が献血していた。東海四県管内における献血申込者のうち同意を得た者に対し、*Trypanosoma cruzi* 抗体検査を実施したが、陽性者は認められなかった。

ウエストナイルウイルス (WNV) 感染献血者への対応について、迅速かつ広域的な対応を可能とするために、日本赤十字社のNAT施設へ導入しているWNV-NAT試薬についての感度、特異性等について検討した。95%検出感度は30コピー/mLであった。ヒトスジシマカの公園内の成虫発生状況と防除効果を評価した。防除を行った公園内では成虫密度が低く抑えられていた。また、ヒトスジシマカの飛翔範囲は150m程度あることが推察された。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の作製に成功した。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

関なおみ, 小林睦生. インターネットリサーチを用いたアタマジラミ症の実態調査. 病原微生物検出情報. 31(12): 350-351 (2010)

2. 学会等発表

1) 国際学会

なし

2) 国内学会

下池 貴志、野島 清子、脇田 隆宇、岡田 義昭：血液製剤におけるC型肝炎ウイルスの不活化の検討、第58回日本ウイルス学会、徳島、2010年

加藤文博、田島茂、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：フラビウイルスレポーターレプリコンの構築 第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11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

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）
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

異常プリオンが感染した細胞から異常プリオンが培養液中に放出される機構を明らかにするため、マウス白血病ウイルスに感染した細胞株を用いて異常プリオンの感染実験を行なった。神経系細胞株や腎由来細胞株において、マウス白血病ウイルスに感染した細胞株は非感染細胞に比べて、明らかに異常プリオンのシグナルが増強していた。レトロウイルスの出芽に関連する宿主由来の複数のタンパク質の発現に明らかな差は確認できなかったが、レトロウイルス感染によって異常プリオンの複製や感染拡大が促進された。

A. 研究目的

昨年度まで異常プリオンの除去法の開発のために室温に放置しても凝集等による感染価の変動等をなくす方法としてキレート剤添加の有効性を明らかにしてきた。さらに血漿分画製剤の病原体の不活化法として広く使用されている界面活性剤処理による異常プリオンの性状の変化について解析した。今年度は、感染細胞からどのような性状で培養液に異常プリオンが産生されるのか解析することにした。これまで英国において輸血を介したvCJD感染例が4例報告され、これらの予防のためには白血球除去が有効であるとの報告から欧米において白血球除去フィルターが導入されている。白血球除去フィルター導入後、輸血による受

血者のvCJD発症例は報告されていないが、70%の感染性は除去されるものの30%の感染性は残存すると推定されている。感染細胞から血液中に産生される異常プリオンがどのような性状を有しているのか明らかにできれば、除去法の開発だけでなく、除去法の適切な評価が可能になると考えられる。異常プリオンに感染した血球細胞が血液に存在した場合、異常プリオンの性質として凝集した不溶性のタンパクとして細胞内に存在していると推定される。細胞は、不要となった細胞成分を生体膜に包み細胞外に放出する機構があることが知られている。一方で、レトロウイルス等に感染した場合にウイルスが感染細胞から効率良く出芽するために宿主細胞の出芽に係るタンパ

クの発現が増加させると報告されている。これらの生体機構を利用して異常プリオンが血中に放出されている可能性がある。そこで、マウス白血病ウイルスに感染したヒト由来細胞株に異常プリオンを感染させ、マウス白血病ウイルス非感染細胞に異常プリオンを感染させた場合との異常プリオンの感染効率の相違を解析した。

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 で 45 分間反応させた。10 μ L の pepablock を加えて PK の反応を止め、9 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) 異常プリオン感染に及ぼすマウス白血病ウイルスの影響

ヒト脳神経由来細胞株と腎由来細胞株、及び肺由来細胞株にマウス白血病ウイル

スを感染させた。3 ヶ月以上継代し、全ての細胞がウイルスに持続感染している状態にした。これらの感染細胞とコントロールとして非感染細胞を 1×10^5 ずつ 24 穴プレートにまき、それぞれに異常プリオンを含む脳乳剤を同量ずつ添加して感染させた。ウシ胎児血清を最終濃度 3% になるように培養液に加え、2 日毎に培養液を交換した。細胞の継代は 2-3 週間に 1 回の頻度で行ない、常時コンフルレントな状態で維持するように培養を行ない継代時の細胞を 10cm のディッシュで増殖させ WB 用のサンプルとした (図 1)。異常プリオンの検出は、(1) に従った。また、細胞から産生される vesicle に関連した EF-1 α や flotillin、tsg101 抗原の発現についても解析した。

C. 研究結果

異常プリオンを感染させ、継代したところ、マウス白血病ウイルスの感染の有無による各細胞株への形態的な差は生じなかった。感染 12 週後の細胞から異常プリオンを WB 法で検出したところ、マウス白血病ウイルスを感染させた細胞は非感染細胞に比べて異常プリオンのシグナルが明らかに増加していた。特に、腎癌細胞株においては、マウス白血病ウイルス非感染細胞では異常プリオンのシグナルは確認できなかったが、マウス白血病ウイルス感染細胞では強い異常プリオンのシグナルが確認できた (図 2)。一方、マウス白血病

ウイルス感染によって EF-1 α や flotillin、tsg101 抗原等のタンパクの発現には明らかな変化は認められなかった。

D. 考察

不溶性の凝集した異常プリオンが感染細胞から細胞外に放出される機構として生体膜に包まれて vesicle として放出される可能性が考えられる。この vesicle は他の細胞と結合することによって膜の内容物を運ぶことができる。一方、レトロウイルス等のウイルス感染によって「出芽」に関連する遺伝子の発現が亢進することが知られており、これらの中に異常プリオンと結合する分子が存在する可能性がある。これを解析するために、異常プリオンをマウス白血病ウイルス細胞株に感染させ、感染効率を検討した。感染によって明らかに異常プリオンの感染効率が上昇したが、vesicle に関連する生体分子の量に著明な差は認められなかった。マウス白血病ウイルスは、既にマウス白血病ウイルスに感染した細胞に感染できないので、ウイルス粒子に異常プリオンが取り込まれて感染する可能性はない。従って、ウイルス感染が宿主細胞内でのプリオン産生を促進させるのか、または、ウイルスが細胞外に放出される機構を利用して、ウイルスと共に細胞外に効率良く放出される可能性もある。

昨年までの本研究班の成果として 20nm 程度のウイルス除去膜によって効率良く異常

プリオンの除去が可能であったことから、異常プリオンは粒子を形成している可能性が考えられていた。マウス白血病ウイルスに感染した細胞に出芽に関連したタンパクの発現が見られなかったと記載したが、脳神経系や腎由来細胞であり血球系の細胞ではない。上皮系細胞株と血球系細胞とは異常プリオンの細胞外への放出システムが異なる可能性もある。予想されたような生体分子の発現の亢進が確認できれば、これらのリガンドを用いた異常プリオンの除去が可能になる可能性もある。

E. 結論

マウス白血病ウイルスに感染したヒト細胞株は、異常プリオンに感染し易くなった。ウイルス感染によって異常プリオンの産生を亢進させる可能性が示唆された。

F. 健康危機管理情報

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*, 2010.vol.411:605-606

2. 学会発表

- 1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、
浜口 功:新規レトロウイルス XM
RVの検出法と性状解析、第58回日本ウイルス学会、徳島、2010年
- 2) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡田
義昭:血液製剤におけるC型肝炎ウイルスの
不活化の検討、第58回日本ウイルス学会、徳
島、2010年

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

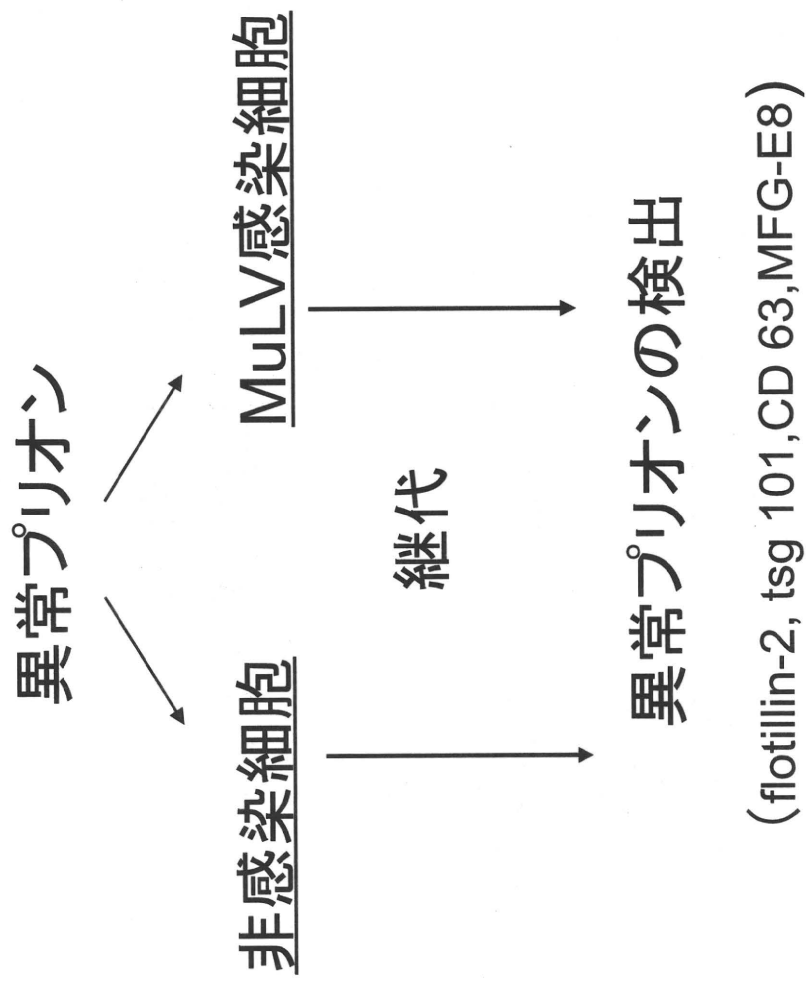


図1. 実験方法

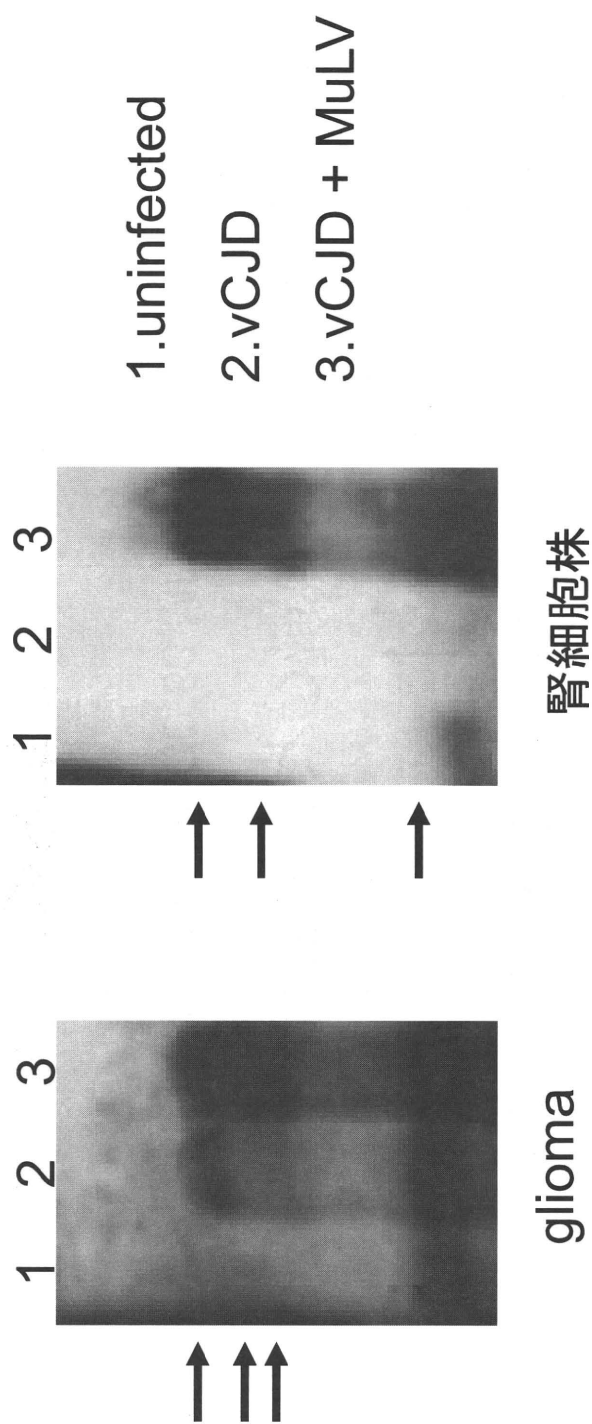


図2.レトロウイルス感染は異常プリオンの感染拡大
に關与している？

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

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9・494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評価。
- ④ *T.cruzi* 抗体スクリーニングマニュアルの作成

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, IFELISA 法で精査した。開発中の検査キットの評価は慢性シャーガス病患者保存血清(ブラジル・ボリビア)を用いて既存の迅速スクリーニング用検査キットとの結果比較を行い評価した。

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及び各地 NPO の行事に支援協力の形で、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)

C. 結果

2010-04-12

494名

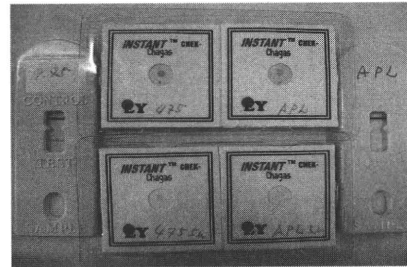
*T. cruzi*抗体陽性(9名)1.8%

ラテンアメリカ人3名

BOLIVIA	2
Nikkei	4
Brazil	2
Japan	1
(擬陽性)	3)

平均年齢41.5
31~61歳

STAT-PACK & Instant CHEK Chagas



今年度は在日ラテンアメリカ人及び南米長期滞在日本人を含む494名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。その結果は上記に示す。

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、検診会場では常に配布注意を喚起している。検診風景写真に注意！

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-1)についても提案する。

ブラジル人集住地域コミュニティでのシヤーガス病啓蒙活動(Expo Buisness 2010 Nagoya)

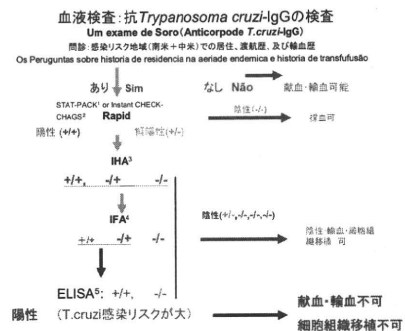


相談件数 120名
問診票により104名について *T. cruzi*
抗体検査実施、陽性 2名
陽性者 ポリミア人 1
日本人 1

懸念していた、南米滞在歴のある日本人の抗体陽性者が検出されたことは、献血・輸血感染予防の観点から非常に重要な注意すべき点が明らかとなった。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。

今回の1048名のうち日本での献血を行ったものは18名に及ぶが幸いに、抗体陽性者は居なかった。しかしブラジル人集団からの献血協力申請があった特例については1名 False-positive が検出され、ELISA 法、PCR 法などでの性差が行われた。

図-1



感染虫体の確認^{6,7}

⁶ PCR、⁷ 血液(虫体培養)

D. 考察

群馬県楽郡大泉、太田市、長野県飯田市、岐阜美濃加茂市、愛知県名古屋、静岡県浜松市、静岡市など、在日ブラジル人が集住している地域で、在日ブラジル大使館領事館(移動領事館健康相談会)NPO-MAIKEN,NPO-SABJA が実施する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家族について、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%がサンパウロ州から来日、24%がパラナ州から、7%が南マットグロッ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、南マットグロッ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らないことを説明した。一方ボリビアからの定住者は在日外国人の2%に過ぎないが、多くは日本国籍を持つ沖縄移住地生まれのボリビア人が多くその感染リスクは高い。現在最もシャーガス病の感染対策が遅れている国のひとつに挙げられる

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と既に中南米諸国のスクリーニング検査に使用されている Stat-Pack(Chembio)と Chagas Detecte(InBios)との結果を比較検討したが、若干の False-Positive ケースが出るものの、False-Negative は無く、献血現場で問診中に結果が出せ、問診を助ける情報を提供するスクリーニング用に使用可能と思われる。中南米諸国での献血輸血現場ではシャーガス病に関しては HIV,HCV,マラリアなどと同様にスクリーニング対象になっている。

E. 結論

ブラジル人集住地区での疫学調査がブラジル領事館

の理解の下に NPO 活動に支援協力する形で行えるようになったことで各地のラテンアメリカ人のシャーガス病感染状況が今後も更に明らかに出来る。また感染者の検査呼びかけ、安全血液供給のための啓蒙活動は在日ブラジル人を支援する NPO,NGO のネットワークを通じ今後も実施可能である。同時に日赤などで行う献血現場で実施する問診票の改訂特に在ブラジルでの居住歴などについてはより詳細に尋ねることが必要であり、感染リスクの高い地域出身者を除外できる。