

201132053A

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

# 血液製剤の安全性確保と安定供給のための 新興・再興感染症の研究

(H23-医薬-一般-003)

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24 (2012) 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

# 血液製剤の安全性確保と安定供給のための 新興・再興感染症の研究

(H23-医薬-一般-003)

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24 (2012) 年 3 月

研究代表者 倉 根 一 郎

(国立感染症研究所)

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究 . . . . . 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

1. 血液からの異常プリオン除去法の開発 . . . . . 9  
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）
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（慢性期シャーガス病の調査研究） . . . . . 15  
研究分担者：三浦左千夫（慶應義塾大学・医学部）
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 . . . . . 21  
研究分担者：百瀬俊也（日本赤十字社・血液事業本部）
4. ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発 . . . . . 33  
研究分担者：横山直明（帯広畜産大学・原虫病研究センター）
5. 献血制限に関わる昆虫学的研究：疾病媒介蚊の吸血時期と移動分散範囲に関する基礎研究 . . . . . 37  
研究分担者：津田良夫（国立感染症研究所・昆虫医科学部）
6. デングウイルス感染による宿主側応答の解析 . . . . . 43  
研究分担者：田島茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 53

# I. 総括研究報告書

総括研究報告書

血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究

（H23－医薬－一般－003）

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、バベシア症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法・スクリーニング法等の開発、媒介蚊に関する研究を行った。

プリオン研究については、白血球除去フィルターによって異常プリオンは除去できたが、タンパクの存在によって除去効率は阻害された。また、異常プリオンは exosome と同じ挙動を取ることが示唆された。シャーガス病に関しては、先天性感染シャーガス病の調査により、日系ボリビア人男児が *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性であり母子共にシャーガス病キャリアーであった。中南米地域からの定住者が多い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。44 人すべて陰性であった。バベシア症については、*Babesia microti* の 18s rDNA 遺伝子を標的とした LAMP 法が確立された。この方法は、PCR 法より高い感度を示し、患者の血液から抽出した DNA サンプルからも標的遺伝子の増幅が認められた。ウエストナイルウイルス媒介蚊であるアカイエカの吸血蚊を用いて吸血源動物を同定し、吸血源動物の飼育場所と吸血蚊の採集場所の距離に基づいて吸血後のアカイエカの移動分散距離を推定した。アカイエカは吸血後産卵するまでの 3-4 日間に少なくとも、350m 移動すると推定された。DNA マイクロアレイ解析により、フラビウイルス間において日本脳炎ウイルス感染よりもデングウイルス感染の方がより顕著に誘導される遺伝子を抽出した。

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）

田島茂（国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官）

津田良夫（国立感染症研究所昆虫医科学部 室長）

三浦左千夫（慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室 非常勤講師）

百瀬俊也（日本赤十字社血液事業本部 課長）

横山直明（帯広畜産大学原虫病研究センター 准教授）

#### 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る可能性がある。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、蚊の生態などを基盤に献血制限地域を設定する必要も出てくる。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。また、バベシア症については検査法の確立を進める。本研究は検査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. 血液からの異常プリオン除去法の開発：

マウス白血病ウイルスと異常プリオンが重感染したヒト腎癌細胞株の培養液を10mL取り、3000gで15分遠心し、上清からexosome沈殿を得た。この沈殿をlysis液に溶解後ProteinaseK(PK)を最終濃度10 $\mu$ g/mLになるように添加し、37°Cで30分間反応させた。

白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去は以下の方法で行った。ウシ海綿状脳症を発症したウシの脳乳剤を用いて異常プリオンを感染させたヒト glioma 細胞株の培養上清にキレート剤を添加後、それぞれ0.5mLずつ生食200mLと5%アルブミン200mLに加えた。これを白血球除去フィルターのバッグに注入しよく混合した。1部を除去前の検体として採取した。仕様書に従って白血球除去フィルターで濾過した。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. 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：

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）における献血申込者のうち中南米滞在歴を有する献血希望者に対し、予め献血会場に用意された本調査研究の説明書及び同意書を渡し、その内容を理解し同意書に署名した者を対象とした。併せて出身地、シャーガス病に関する認知度等に関し回答を得た。別に検体を採血し、愛知県赤十字血液センターにてイムノクロマト法（STAT-PAK®）迅速検査を実施した。ELISA法（ORTHO® *T. cruzi* ELISA TEST System）及びイムノクロマト法（*Trypanosoma Detect*®）迅速検査による *T. cruzi* 抗体検査を実施した。

また、在日ラテンアメリカ人集住地域においてNPO、ブラジル領事館などの協力の基で調査研究参画への同意書が得られた人たちを対象に抗体検査を行った。病原体 *T. cruzi* に対するIgG抗体の有無をクロマト法、IHA、IFA、ELISA法で調べた。さらに、既存の抗体検出キット（試験研究用）を用

いて、それぞれの利便性、信頼性について検討した。

### 3. バベシア症に関する研究：

バベシア症が疑われる患者の血液、および輸血用血液の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発するため、*Babesia microti* 遺伝子増幅用の LAMP プライマーの設計、LAMP 法の特異性と感度の検討、実験感染マウスの試料を用いた評価、を行った。

### 4. フラビウイルスおよび媒介蚊に関する研究：

動物園で採集されたアカイエカの吸血蚊を用いて、吸血源動物の同定を行った。131 個体のサンプルを分析し、DNA の塩基配列の類似性によって吸血源を推定した。これらの吸血源動物の中で飼育場所が特定できるものについて、飼育場所と吸血個体が採集された場所の距離を測定して、吸血後のアカイエカの移動分散距離を求めた。

#### (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. 血液からの異常プリオン除去法の開発：

異常プリオンの感染が確認できなかった細胞株とマウス白血病ウイルスと異常プリオンが重感染したヒト細胞株、異常プリオン非感染細胞株からそれぞれ exosome を精

製し、PK 処理後ウエスタンブロットにて異常プリオンの検出を行った。マウス白血病ウイルスと異常プリオンが重感染したヒト細胞株から精製した exosome に異常プリオンが検出された。

感染後 30 日の細胞を PK 処理し、異常プリオンのバンドの有無を検討した。異常プリオンを生食に添加し、白血球除去フィルターを通した検体からは、原液で感染させた細胞からも異常プリオンは検出されなかった。一方、濾過前の検体からは  $10^6$  倍希釈した検体を感染させた細胞からも異常プリオンが検出された。

### 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：

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴又は滞在歴を有する 2011 年の献血申込（受付）者数及び献血者数を解析した。平成 23 年 1～3 月の中南米居住歴のある献血申込者数 3,184 人（月平均 1,061 人）、献血者数 2,683 人（同 894 人）に対し、同年 4 月の問診票改訂以降の 4～12 月（9 ヶ月間）の中南米滞在歴のある献血申込（受付）者数 4,471 人（同 497 人）、献血者数 3,581 人（同 398 人）と半減した。国別で分類した場合、従来最も多かったブラジルは献血申込（受付）者数の月平均 448 人、献血者数の月平均 376 人からそれぞれ 116 人、93 人と約 1/4 に減少していた。

中南米地域からの定住者が多い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。平成 23 年 4 月～12 月現在、44 人（男性 31 人、女性 13 人）すべて陰性であった。



ラテンアメリカ人定住者コミュニティーのある地域にて *T. cruzi* 抗体の有無について Chagas-Stat-Pack (Chembio) および、Trypanosoma-Detect (In-Bios) キットを用いて検討した。55名の検査希望者にとどまった。しかしそのうち在日19年のボリビア日系家族において、13歳の男児が *T. cruzi* 抗体陽性、母子ともにシャーガス病キャリアーであることが示された。この出産に関して関係した医療従事者複数についての二次感染は抗体検査の結果否定された。

### 3. ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発：

迅速遺伝子診断法として最近注目を浴びている LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法について、*B. microti* の Ribosomal DNA を標的遺伝子として検討を行った。その結果、デザインした LAMP プライマーは、*B. microti* ribosomal DNA 遺伝子を特異的に増幅し、既存の PCR 法よりも高い検出感度を示した。また、マウスを用いた感染実験では、赤血球寄生率が低い感染初期及び慢性期においても、LAMP 法により感染の検出が可能であった。更に、神戸の人感染血液を用いた LAMP 法においても、増幅が認められた。

### 4. 献血制限に関わる昆虫学的研究：疾病媒介蚊の吸血時期と移動分散範囲に関する基礎研究：

動物園で採集されたアカイエカの吸血蚊を用いて、吸血源動物の同定を行った。131個体のサンプルを分析し、鳥類17種と哺乳類5種が吸血源となつてゐるとが推定された。これらの吸血源動物の中で飼育場所が

特定できるものについて、吸血後のアカイエカの移動分散距離を求めた。新鮮な血液を持った個体の平均移動分散距離は30.6m および66.7m で40m以内の個体が多かつた。これに対して完成卵を持った個体は350mを移動しており、血液を消化中の個体は10mから350mの範囲の様々な距離を移動していた。これらの結果から、アカイエカは吸血後数日間に少なくとも350mを移動すると結論した。市街地の大規模公園で行つたアカイエカの吸血源動物の調査では、99%以上の個体が野鳥を吸血していた。公園で採集されたアカイエカの吸血蚊が採集場所を中心とする半径350mの範囲から移動してきたと仮定して推定飛来範囲を描いたところ、この公園の89%が含まれてゐり、得られたサンプルの吸血源動物同定結果と矛盾はなかつた。

### 5. 新規フラビウイルス検出法開発のための基盤的研究：

日本脳炎ウイルスとデングウイルス感染における病態の相違のウイルス学的基盤を明らかにするため、日本脳炎ウイルス感染よりもデング1型ウイルス感染でより顕著に発現上昇が観察された遺伝子を抽出した。PLAT (tissue plasminogen activator; tPA) はすでにデングウイルス感染ヒト上皮細胞から分泌されることが明らかとなつており、さらにデング感染症の重症化過程で血清中の PLAT 量の明らかな増加が観察されている。補体因子 C1s についてはリアルタイム RT-PCR 法により確かに RNA レベルで発現量の上昇がみられた。C1s の誘導が今回用いたデング1型ウイルス株に特異的でないことを示すため、他の血清型のデングウイル



スについてもリアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により調べた。先のデング 1 型ウイルスでの結果と同様に C1s の RNA レベル、蛋白質レベルでの発現誘導が確認された。

#### D. 考察

白血球除去フィルターによって異常プリオンが除去できることを示された。しかし、著しい効果が期待できるのはタンパクの含量が低い条件であった。輸血の場合、発症している供血者から採血することは考えられず、発症前の潜伏期の献血者からの採血であるからである。従って、極微量の異常プリオンに感染している白血球の除去と血漿中に存在する cell free の異常プリオンが除去できれば、完全とは言えないまでも受血者の発症までの期間を延長することが期待できる。白血球除去フィルターでは、タンパク存在下では除去効率が激減したがプラスミノージェンを加えることによって効果的な除去が可能になると考えられる。

一方、血液中での異常プリオンの存在様式に関し、exosome と同じ挙動を取ることが明らかになった。今後 exosome と異常プリオンがどのように存在しているのか解析が必要となる。

シャーガス病の非流行地域の日本では、中南米からの定住者や中南米に長期滞在歴のある日本人の感染リスクを考慮する必要がある。献血時の問診上の取り扱いは、「シャーガス病の既往歴のある者から採血しないこと」としているが、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が困難であること、中南米の一部地域はマラリア流行地と重なることなどから一定のバリアになっていると考えられる。平成 23 年 4 月以降の中南米滞在歴のある献血者数の減少は、東日本大震災の影響により中南米出身定住者の減少が考えられるが、問診票の外国滞在歴に関する質問が、マラリアの感染リスクを想定した、滞在期間を限定した質問になっていることから、中南米出身定住者の中には問診項目に該当せず中南米滞在歴を拾えなくなった可能性もある。現在までのところ *T. cruzi* 抗体陽性者は認められていないが、評価できる数には至っておらず、引き続き中南米からの定住者が多い地域を中心とした疫学調査を継続して注視したい。今後、調査結果を踏まえ、中南米滞在歴による献血制限や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。

全国に居住するラテンアメリカ人の心臓疾患患者でシャーガス病慢性期を示すケースは 16 名におよび、そのうち 7 名については PCR で *T. cruzi*-DNA が検出され病原体キャリアーであることが示唆されている。ブラジル、ボリビアの日系移住地での *Trypanosoma cruzi* 感染状況は 10-15% とほぼ一致している。現在ボリビアは世界的に最も *Trypanosoma cruzi* 感染リスクが高く、慢性シャーガス病妊婦の約 5% に先天性感染児の出産が報告されている。そのうち在日 19 年を経過するボリビア日系家族に先天性 *Trypanosoma cruzi* 感染者が検出された。今後もラテンアメリカからの定住者におけるシャーガス病慢性感染者を見出すために、種々の機会を利用して情報提供や医

療相談を推進していく必要がある。

LAMP 法は、約 60 度の等温で短時間に標的遺伝子を増幅することが可能である。また、特別の機器を必要とせず増幅の結果を目視で判定することも可能である。また、4 種類のプライマーを使用するため、特異性も高いとされている。これらの特徴は、多数の検体を短時間で検定する必要が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。

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 4 種類のプライマーは、ダニによって媒介される *Anaplasma*, *Ehrlichia*, 及び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から遺伝子を増幅せず、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。また、制限酵素によって切断される遺伝子配列を挿入することにより、後に増幅遺伝子の塩基配列の確認も可能となった。また 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 100 倍高い感度を有していることが明らかになった。今後、より多くの人の血液試料を用いて、実用化に向けた評価が必要である。

ウイルスアカイエカは吸血後 3-4 日で卵を成熟させ産卵する。この期間中にはまったく吸血せず、水分や糖分の補給を行う以外は潜伏に適した場所に留まっていると考えられている。実際には卵巣を發育させながら、あちこちの潜伏場所を転々と動き回っていると思われる。完成卵を保持している個体は 350m 離れた場所から移動した個体しか得られていないが、これは技術的な制約のためと思われる。公園で採集された

アカイエカの吸血蚊が採集場所を中心とする半径 350m の範囲から移動してきたという推測は、この公園で得られたサンプルの吸血源動物同定結果から考えて、妥当であると思われる。過去に推定された吸血のために飛来するアカイエカの移動範囲 1.2km と本研究で推定された吸血後の移動距離 350m をどのように評価するかという問題については、今後の生態学的な検討を要する。これらの推定値を単純に合計した 1.55km という移動分散範囲は、もっとも単純な考えであり、献血制限範囲に関するひとつの科学的根拠となりうる。

#### E. 結論

プリオン研究については、白血球除去フィルターによって異常プリオンは除去できたが、タンパクの存在によって除去効率は阻害され、有意な除去効率は確認できなかった。また、異常プリオンは exosome と同じ挙動を取ることが示唆された。

シャーガス病に関しては、先天性感染シャーガス病の調査により、日系ボリビア人男児が *T. cruzi* 抗体陽性、母子共に *T. cruzi* キャリアーであることが示唆された。中南米地域からの定住者が多い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、*T. cruzi* 抗体検査を実施した。44 人すべて陰性であった。

バベシア症については、*Babesia microti* の 18s rDNA 遺伝子を標的とした LAMP 法が確立された。この方法は、PCR 法より高い感度を示し、人患者の血液から抽出した DNA サンプルからも標的遺伝子の増幅が認められた。

ウエストナイルウイルス媒介蚊であるア

カイエカの吸血蚊を用いて吸血源動物を同定し、吸血源動物の飼育場所と吸血蚊の採集場所の距離に基づいて、吸血後のアカイエカの移動分散距離を推定した。アカイエカは吸血後産卵するまでの3-4日間に少なくとも、350mは移動すると推定された。DNAマイクロアレイ解析により、フラビウイルス間において日本脳炎ウイルス感染よりもデングウイルス感染での方がより顕著に誘導される遺伝子を抽出した。

#### F. 健康危機管理情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kato, F., Kotaki, A., Yamaguchi, Y., Shiba, H., Hosono, K., Harada, S., Saijo, M., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S.: Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR. *Virus Genes* 44:191-197, 2012

##### 2. 学会等発表

###### 1) 国際学会

なし

###### 2) 国内学会

三浦 左千夫：在日ラテンアメリカ人の慢性シャーガス病とWHO-WPROのシャーガス病非流行国対策について。60回日本感染症学会東日本学術集会；2011年10月26-28日、山形市

鍬田龍星、星野啓太、伊澤晴彦、田島茂、高崎智彦、佐々木年則、小林睦生、沢辺京

子：イエカ属蚊の初代培養 第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 東京  
2011年11月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 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）

「血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」

（H23－医薬－一般－003）

## 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

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と異常プリオンが重感染した細胞株の培養上清から exosome を沈殿・精製したところ、異常プリオンが検出できた。異常プリオンが exosome と共存している可能性が示唆された。また、異常プリオンが持続感染している細胞株の培養上清を生理食塩水に添加し、白血球除去フィルターで濾過したところ異常プリオンは除去された。しかし、5%アルブミンで同様に濾過しても除去は確認できなかった。白血球除去フィルターは異常プリオンを除去できるが、タンパクが存在すると除去効率が著しく低下することが示唆された。

#### A. 研究目的

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欧米においては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はプリオンに感染した動物の血液を用いた実験から 70%の感染性は除去できるものの 30%の感染性は残存すると推定されている。しかし、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。これは白血球除去フィルタ

ーが、感染細胞だけではなく血中の異常プリオンを除去している可能性がある。その可能性を明らかにするために感染細胞から血液中に産生される異常プリオンの性状の解析は重要である。異常プリオンに感染した脳組織では、神経細胞に異常プリオンが凝集した不溶性のタンパクとして蓄積している。一方、細胞は不要となった細胞成分を生体膜に包み exosome として細胞外に放出する機構があることが知られている。また、レトルウイルス等のウイルスに感染し

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関係するタンパクの発現が増加させると報告されている。そこで マウスレトロウイルスと異常プリオンが重感染した細胞株から exosome を精製し、異常プリオンの存在を検索した。また、異常プリオンが持続感染している細胞株の培養上清を白血球除去フィルターで濾過し、異常プリオンが除去できるか検討した。

## 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  $\mu$ g/200  $\mu$ L に調整後、Proteinase K (PK) を最終濃度 20  $\mu$ g/mL になるように添加し、37°C で 45 分間反応させた。10  $\mu$ 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) exosome の精製法と異常プリオンの検出

マウス白血病ウイルスと異常プリオンが重感染したヒト腎癌細胞株の培養液を 10mL 取り、3000g で 15 分遠心し、上清に ExoQuick-TC (System Biosciences 社) 2mL を添加した。混合し 4°C にて 14 時間以上静置後、1500g で 30 分遠心し exosome 沈殿を得た。この沈殿を (1) の条件で lysis 液に溶解後 Proteinase K を最終濃度 10  $\mu$ g/mL になるように添加し、37°C で 30 分間反応させた。それ以外は、(1) の方法に従って処理した。

### (3) 白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去

ウシ海綿状脳症を発症したウシの脳乳剤を用いて異常プリオンを感染させたヒト glioma 細胞株の培養上清にキレート剤を添加後、それぞれ 0.5mL ずつ生食 200mL と 5% アルブミン 200mL に加えた。これを白血球除去フィルターのバッグに注入しよく混合した。1 部を除去前の検体として採取した。仕様書に従って白血球除去フィルターで濾過した。フィルターを通した溶液は処理後の検体として採取した。フィルターによる除去前後の検体は、それぞれ 10 倍ずつの段階希釈を行い、 $1 \times 10^5$ /well に撒いた異常プリオン非感染ヒト glioma 細胞株に感染させた。感染させた細胞は、2 回/週の頻度で継代し、サンプリングした。異常プリオンの感染の有無は、サンプリングした検体を (1) の方法によって PK 処理し、検討した。

## C. 研究結果

### (1) exosome からの異常プリオン検出

異常プリオンを感染させるも感染が確認できなかつた細胞株とマウス白血病ウイルスと異常プリオンが重感染したヒト細胞株、異常プリオン非感染細胞株からそれぞれ exosome を精製し、PK 処理後ウェスタンブロットにて異常プリオンの検出を行った。マウス白血病ウイルスと異常プリオンが重感染したヒト細胞株から精製した exosome に異常プリオンが検出された (図 1)。

### (2) 白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去

感染後 30 日の細胞を PK 処理し、異常プリオンのバンドの有無を検討した。異常プリオンを生食に添加し、白血球除去フィルターを通した検体からは、原液で感染させた細胞からも異常プリオンは検出されなかつた。一方、濾過前の検体からは  $10^{-6}$  倍希釈した検体を感染させた細胞からも異常プリオンが検出できた (図 2)。また、5%アルブミン製剤を生理食塩水と同様にフィルター処理した検体では明らかな除去効果は確認できなかつた。

## D. 考察

白血球除去フィルターによって異常プリオンが除去できることを示すことができた。しかし、著しい効果が期待できるのはタンパクの含量が低い条件であること

も示された。輸血後に vCJD を発症した供血者とその血液の受血者における vCJD 感染症例の解析から、血液製剤中に存在する異常プリオンの量は極めて少ないことが統計学的に示されている。輸血の場合、発症している供血者から採血することは考えられず、発症前の潜伏期の献血者からの採血であるからである。従って、極微量の異常プリオンに感染している白血球の除去と血漿中に存在する cell free の異常プリオンが除去できれば、完全とは言えないまでも受血者の発症までの期間を延長することが期待できる。今回、5%アルブミン製剤をフィルターで濾過した場合は明らかな除去は認められなかつたがアルブミン分子と競合しながらも微量な異常プリオンは白血球除去フィルターに吸着し除去されている可能性もある。最近、プラスミノゲンが再度、注目を集めている。異常プリオンとプラスミノゲンが結合することが以前より知られていたが、血漿の中に存在している物質であることからこれをフィルターに吸着させることによって異常プリオンを除去できる可能性がある。白血球除去フィルターでは、タンパク存在下では除去効率が激減したがプラスミノゲンを加えることによって効果的な除去が可能になると考えられる。

一方、血液中での異常プリオンの存在様式に関し、exosome と同じ挙動を取ることが明らかになった。来年度は、exosome と異常プリオンがどのように存在してい



るのか解析を予定している。また、プラスミノーゲンと exosome との結合性も解析する予定であり、これらによって効率良く異常プリオンの除去が可能な除去法の開発を目指す。

#### E. 結論

白血球除去フィルターによって異常プリオンは除去できたが、タンパクの存在によって除去効率は阻害され、有意な除去効率は確認できなかった。また、異常プリオンは exosome と同じ挙動を取ることが示唆された。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 梅森 清子、岡田 義昭、浜口 功: 過去の血漿分画製剤に対する核酸増幅法による HCV 遺伝子検査について、第 59 回日本ウイルス学会、札幌、2011 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、第 59 回日本ウイルス学会、札幌、2011 年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

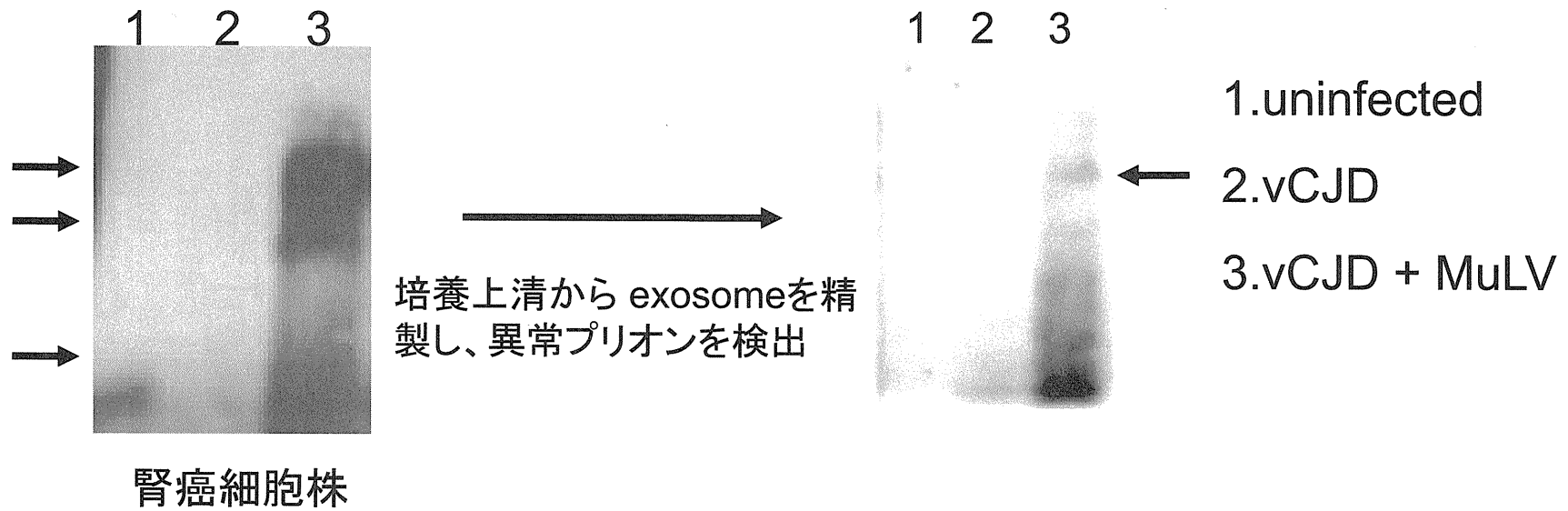


図1 異常プリオン感染細胞由来exosomeからの異常プリオンの検出

除去前

除去後

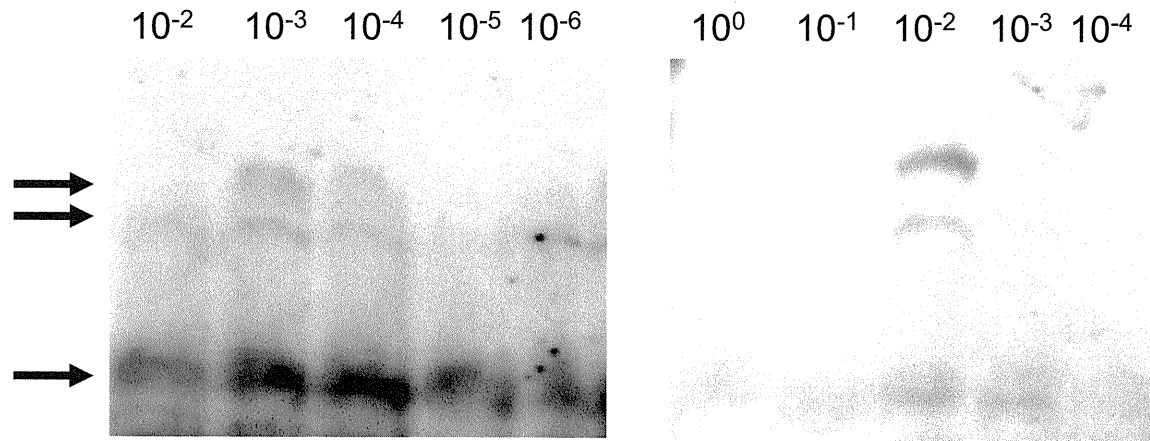


図2 白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去効果

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総合研究事業)  
「血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」  
(H23-医薬-一般-003)

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  
(慢性期シャーガス病の調査研究)

研究分担者 三浦左千夫(慶應義塾大学医学部 非常勤講師)

研究要旨:

在日ラテンアメリカ人の定住化が進み、地域に密着した活動として献血に協力する者も少なくない。また、定住化に伴いわが国での出産、育児、教育など日本人として成長をする第二世代がすでに献血年齢に達成し、先天性シャーガス病キャリアーが献血をする可能性も出てきた。シャーガス病慢性感染者が潜んでいる可能性が極めて高いことはすでに明らかであり、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。感染防止対策上ラテンアメリカ人集住地域での献血血については抗体検査を実施した。またラテンアメリカ人のコミュニティーで開催される健康相談会に支援協力し同じく *T.cruzi* 抗体の検査を実施した。本年度は先天性感染シャーガス病に関しての調査も実施した。その結果すでに13歳になる日系ボリビア人男児が *T.cruzi* 抗体陽性、母子共にシャーガス病キャリアーであることが示唆された。この出産に関して関係した医療従事者複数についての二次感染は抗体検査の結果否定された。上記を踏まえて、わが国での *T.cruzi* 抗体陽性者に対する医療関係機関での対応および帰国希望者に対しての母国での対応策について検討した。

A. 研究目的

- ①在日ラテンアメリカ人集住地域での *Trypanosoma cruzi*(*T.cruzi*)抗体保有者の検索。
- ②献血現場で対応できる既存の迅速抗体測定キットの評価検討。
- ③在日ラテンアメリカ人先天性感染Chagas病例の有無について検討する。

B. 研究方法

- 1)在日ラテンアメリカ人集住地域におい

てNPO、ブラジル領事館などの協力の基で調査研究参画への同意書が得られた人たちを対象に抗体検査を行う。  
2)ラテンアメリカ人集住地域医療機関からの検査以来を受けた血清を用いて病原体 *T.cruzi* に対するIgG抗体の有無をクロマト法、IHA,IFA、ELISA 法で調べる。  
3)既存の抗体検出キット(試験研究用)を用いて、それぞれの利便性、信頼性について検討した。  
以上の疫学調査検診による血清診断は、

各地の医療機関から依頼される血清検体と同様に慶応大学医学部倫理委員会の承認の下に行った。また、抗体陽性者の精査に関しては紹介先医療機関の指針に従った。

### C. 結果:

1&2) 愛知県、静岡県、神奈川県下のラテンアメリカ人定住者コミュニティのある地域にて *T. cruzi* 抗体の有無について Chagas-Stat-Pack (Chembio) および、Trypanosoma-Detect (*In-Bios*) キットを用いて検討した。

今年度は震災、台風などの影響でラテンアメリカ人コミュニティでの抗体検査実施は4箇所で行われたが、55名の検査希望者にとどまった。しかしそのうち、在日19年を経過するBolivia日系家族に先天性Chagas病感染者が検出された。母親はすでにECGで心臓機能の異常を示し、近医に紹介経過観察中。

子に関しては無症状であるが、Bolivia基準マニュアルでは15歳未満で*T. cruzi*抗体陽性者は特異的治療の対象となっているため、近医小児科と検討中。

#### 忍び寄るシャーガス病

今日わが国における南米からの定住化人口は、27万人(外人登録者数200万人)に達している

医療機関を受診し、心疾患で病原診断を行ったところChagas病を示唆された者は16/42名(38.1%)であった

抗体陽性者のうち7/16名についてPCRで*T. cruzi*-DNAが検出された  
そのうち  
4/7名の末梢血液から*T. cruzi* が分離された  
慢性感染キャリアーが存在する

慢性キャリアー検出には*T. cruzi*抗体検査が不可欠

◎母子感染例:

母: 1在日19年のBolivia人  
子: 日本にて出産現在12歳抗体陽性  
PCR-DNA 母子ともに検出

我が国には感染急性期\*に対応できる薬は無い

ラテンアメリカ人の平均滞日年数は13.5年であり、今回の先天性感染児もすでに13歳であった。

数年後には献血年齢に達し、善意の献血にボランティアとして参加することが可能となる。本人周囲もChagas病に感知することなく病原体を広めてしまう危険があることを熟知させ、二次感染予防に努めるべく医療機関へ紹介経過観察を推奨した。

在日ブラジル人およびボリビア人の献血人数と在日ラテンアメリカ人の *T. cruzi* 抗体陽性率から推定される抗体陽性者数は77名となる。

### 献血による感染のリスク

- ・ 献血者1,108人の平均滞日年数13.5年
- ・ 日本での献血経験を有する者18/1108名 (1.62%)
- ・ エアゾール系人血成分の感染率(0.5%)
- ・ 2008年度から2010年度までの抗体陽性者数 20/1108名 1.8%
- ・ 2008年度日本献血者数(のラテンアメリカ系)4,234名  
4,234 X 1.8%=76 献血者のうち76名が抗体陽性???
- ・ 2010年度日本献血者数(のラテンアメリカ系)4,444名  
4,444 X 1.8%=80 献血者のうち80名が抗体陽性???

ボリビア国籍+ブラジル国籍の献血可能年齢層をおよそ243千人  
献血者の推定抗体陽性者数71名

2011-9月 Bolivia人コミュニティで行った*T. cruzi*抗体検査にて11/18陽性

49歳女性 在日19年 日本にて出産 長男 *T. cruzi*抗体検査陽性  
母子感染例(日本初)

シャーガス病に関する情報は国内外共に日系人には関心が薄くサシガメ及びシシャーガス病について現地での啓蒙教育のため名前だけは知っている程度であることが判明した。

3) 既存の迅速診断キット(試験研究用)は現在 CHAGAS-STAT-PACK (CHEMBIO)、Derect-Trypanosoma cruzi(InBios)は特異性が高く中南米流行地でのスクリーニングに採用をされているが高価なために汎用的ではない。しかし、世界的にChagas病のグローバル化が進み、WHOからスクリーニング用の11キットの評価の検討を行うべく要請があった。現在日赤・中央血液研究所において検討中である。