

201235013A

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25（2013）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24年度 総括・分担研究報告書

平成25（2013）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・・・13
貯留前白血球除去と初流血除去の効果の解析・・・19
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）・・・27
研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・副所長）
研究協力者：三浦左千夫（日本赤十字社中央血液研究所・感染症解析部）
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・・・35
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・・・45
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：吸血飛来するヒトスジシマカの寿命、移動分散範囲に関する基礎研究・・・49
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および高感度ウイルスゲノム検出法の検討・・・55
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・・・65

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。また、貯留前白血球除去法と初流血除去に関し、報告データを用いた解析と文献的考察を行った。

異常プリオン研究について、白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去効果を検討した。2 Log 以上除去できることが示された。また、エキソソーム精製試薬を用いて異常プリオン感染細胞の培養上清 10mL からウエスタンブロットで検出できる量にまでに異常プリオンが濃縮された。

貯留前白血球除去法と初流血除去に関し、報告データを用いた解析を行った。貯留前白血球除去により非溶血性発熱反応の減少は認められなかったが、アナフィラキシー反応は減少した。初流血除去は、血小板での細菌陽性率が導入前から導入後に約 1/3 となる事が示された。

シャーガス病については東海四県において同意を得た中南米居住歴を有する献血申込者に対し *T. cruzi* 抗体検査を実施した。29 人全員陰性であった。さらに、ラテンアメリカ人定住者コミュニティーのある地域において 195 名の抗体検査を行ない、5 名が抗体陽性であった。在日 17 年を経過するボリビア日系家族に先天性シャーガス病感染者が検出された。

バベシア症については、イムノクロマト法の開発を *B. microti* の BMN1-17 蛋白質を用いて行った。イムノクロマト法は *B. microti* に対する高い特異性を示した。感染ハムスター血清を用い赤血球寄生率が検出される時期にイムノクロマトにより抗体を検出した。またヒト感染血清を用いても、抗体検出が可能であった。

フラビウイルス関連研究においては重要なフラビウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカの平均移動距離と平均余命のデータからヒトスジシマカが一生涯の間に移動分散する範囲は平均 200m（平均余命が 20 日の場合）から平均 400m（平均余命が 40 日の場合）と推定された。フラビウイルス遺伝子検出法の感度を増加させる目的でデングウイルスをモデルとして、Flap RT-PCR 法の開発を試みた。

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）

津田良夫（国立感染症研究所昆虫医科学部 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）

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）

研究協力者：

三浦左千夫（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所客員研究員）

沖 学（日本赤十字社血液管理センター 検査課長）

高松純樹（日本赤十字社東海北陸ブロック血液センター所長）

鬼束惇義（岐阜県赤十字血液センター所長）

南澤孝夫（静岡県赤十字血液センター所長）

濱口元洋（愛知県赤十字血液センター所長）

岡田昌彦（三重県赤十字血液センター所長）

内田茂治（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所 感染症解析部長）

平 力造（日本赤十字社血液事業本部 製造管理課参事）

古居保美（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）

石野田正純（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）

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。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。バベシア症については検査法の確立を進める必要が生じている。異常プリオンに関しては、定量性の良い異常プリオンの培養系を確立し、さらに血液からの簡便な除去法の確立と評価系を作る必要がある。また、本年度は貯留前白血球除去と初流血除去の効果を現在集計されているデータを解析するとともに諸外国における報告から文献的考察を加える。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：

1) 異常プリオンの検出：細胞を 0.4mL の Lysis buffer に溶解後、核成分を除いた上清を得た。タンパクを定量し、ProteinaseK (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、9 倍量のメタノールを添加し、20°C にて遠心を行った。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) 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グリオーマ細胞株の培養上清にキレート剤を添加後、0.5mL を 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、 1×10^5 /well に撒いた異常プリオン非感染ヒトグリオーマ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 PK 処理し、検討した。

2. 貯留前白血球除去と初流血除去の効果解析：

1) 貯留前白血球除去の効果の評価：日本赤十字社の輸血情報を用いた解析を行った。日本赤十字社では、医療機関から輸血による副作用が疑われて血液センターに報告された症例を毎年公開している。副作用の種類として蕁麻疹、アナフィラキシー（様）反応、アナフィラキシー（様）ショック、血圧低下、呼吸困難、発熱反応、その他の症状が、血小板製剤、赤血球製剤、新鮮凍結血漿の 3 製剤毎の発生件数として公開されている。2004 年から 2011 年までの 8 年

間の副作用発生件数を解析した。

2) 貯留前白血球除去の効果の評価：海外の輸血の専門雑誌と日本輸血細胞治療学会誌から貯留前白血球除去に関する文献検索を行ないその有効性を解析した。

3) 初流血除去の効果の解析：海外の輸血の専門雑誌と日本輸血細胞治療学会誌から初流血除去に関する文献検索を行ないその有効性を考察した。

3. 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。ラテンアメリカ人集住地域医療機関から検査依頼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、IFA、ELISA 法 PCR 法及び LAMP 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。

4. バベシア症に関する研究：

B. microti に特異的な BMN1-17 の組換え蛋白質の作製を行った。*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んだ。その後、GST-Fusion タンパク質として大腸菌に発現させ、精製後 SDS-PAGE で目的とする蛋白質の分子量について検討を行った。BMN1-17 組換え蛋白質を用いたイムノクロマトストリップを作製した。実験感染マウスの試料を用いた評価は以下のように行った。ハムスターを用いた *B. microti* 感染実験を行い、継時的に血液試料を採取した。血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の算定、IFAT、そして今回発現精製した rBMN1-17 を用いた ELISA 及び ICT の検出感度を比較した。また、ヒトバベシア患者の血液を用いて、rBMN1-17 蛋白質を用いた ICT により患者血清の抗体検出について検討した。

5. フラビウイルス媒介蚊に関する研究：

ヒトスジシマカが 1 日の間に動き回る範囲を知るために、1 個体ずつ異なるマークを付けて放逐し、複数の採集場所で再捕獲を継続して行って、個体ごとに動いた軌跡を調べた。個別マークは、左右の翅それぞれに 3 か所、合計 6 ヶ所に、マジックペンで印をつけて行った。2012 年 7 月 24 日から 8 月 2 日に合計 199 頭のヒトスジシマカを採集しマークして放逐したが、再捕獲された個体数がわずかに 3 頭と少なく、分析できるデータが得られなかった。そのため、同様の方法によって 1990 年に長崎市の市

街地に隣接した林内で実施した調査結果から、44 個体の再捕獲データを取り出して分析を行った。

ヒトスジシマカの寿命調査については、2005 年 6 月から 11 月の期間にヒトスジシマカの人囀採集を行った際のデータを用いた。採集されたヒトスジシマカの雌成虫を持ち帰り $26.5 \pm 0.1^{\circ} \text{C}$ 、相対湿度 $58 \pm 0.9\%$ 、16 時間日長に調節した飼育室で飼育しすべての個体が死亡するまで死亡日と死亡個体数を毎日記録した。この調査結果に基づいて、野外捕集蚊の実験室内における平均余命を求めた。成虫の翅にマークする方法は翅に対するダメージが大きいと考えられたため、新たなマーキング法を検討した。胸部背面の 5 ヶ所に白色の修正インクで印をつける方法を考案した。翅にマークする方法と胸部背面にマークする方法が、成虫の生存に対してどの程度影響するかを実験的に調べた。

6. フラビウイルス感染検査診断に関する研究：

ウエストナイルウイルス (WNV) に関する研究においては、非感染性とした WNV 液を希釈用血漿で希釈し、300、100、30、10、0 cps /mL 濃度のウイルス添加血漿を作製し、TaqScreen®WNV Assay 試薬及び Procleix® WNV Assay 試薬を用いて NAT を各々 27 重測定した。また、実検体による試験として献血血液の NAT 用検体を用いて作製した 20 本プール NAT 検体で、HBV、HCV 及び HIV のスクリーニング NAT 陰性の 240 検体を 2 つの WNV 試薬を用いて 3 回に分けて測定した。

フラビウイルス遺伝子検出法の感度を増加させる目的でデングウイルスをモデルと

して、Flap RT-PCR 法の開発を行った。従来我々が使用してきたデング 1 型ウイルス検出用プライマー (Ito et al., 2004) の 5' 末端側に非ウイルス由来ヌクレオチドを 12 塩基 (5' -AATAAATCATAA-3') 付加した。鋳型にはデング 1 型ウイルス (NIID02-20 株) を A549 細胞に感染させたのちの培養上清から回収したウイルスゲノム RNA を使用した。また RT-PCR は SYBR Green I を用いた方法によりおこなった。

(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 :

1) 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 5% アルブミンに添加し、白血球除去フィルターを通した検体からは、 10^{-3} に希釈して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^{-4} 倍希釈した検体まで異常プリオンが検出できた。

2) エキソソームの精製試薬を用いた C 型肝炎ウイルス (HCV) の濃縮の検討 : エキソソーム精製試薬を用いて異常プリオンと C 型肝炎ウイルス (HCV) の濃縮を検討した。

異常プリオン感染細胞の培養上清 10mL からウエスタンブロットで検出できる量にまで異常プリオンは濃縮できた。一方、HCV も 10mL のアルブミン製剤から全ウイルス量が沈殿として回収できた。10mL 程度の検体に含まれる微量なウイルスを濃縮・検出するために有用な方法である事が明らかとなった。

2. 貯留前白血球除去と初流血除去の効果の解析 :

1) 貯留前白血球除去の効果 : 我が国においては 2007 年から赤血球製剤に貯留前白血球除去を導入したが、日本赤十字社に報告される副作用報告件数で見ると、非溶血性発熱反応の減少は認められなかったが、アナフィラキシー反応 (ショックを含む) は減少した。さらに、諸外国における文献に基づく解析を行った。貯留前白血球除去は、欧米において導入されており非溶血性発熱反応を抑制するとの報告が多い。一方、術後の感染症の減少や入院期間の短縮に関しては一致した結論は得られていない。

2) 初流血除去の効果の解析 : 諸外国における文献に基づく解析を行った。初流血除去は、採血時に混入してくる皮膚断片等に存在する皮膚常在菌による血液製剤の細菌汚染を予防するために考案・導入された。オランダからの報告では血小板製剤の細菌陽性率が 0.85% から 0.37% に減少した。日本赤十字社の報告では、血小板での細菌陽性率も同様に導入前の 0.17% から導入後に 0.05% となった。皮膚常在菌の混入予防法として有用な方法であると解釈された。

3. 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：

献血者10,190人を、日本人と外国人に分類したところ、日本人は8,490人(83.3%)、外国人1,700人(16.7%)であり、外国人の国別内訳では、ブラジルが1,299人と最も多く全体の76.4%を占め、以下、ペルー211人(12.4%)、アルゼンチン64人(3.8%)であった。

東海4県における同意を得た中南米居住歴を有する献血申込者に対し *T. cruzi* 抗体検査を実施した。平成24年4月～9月で、29人(男性15人、女性14人)全員陰性であった。なお、平成23年度から平成24年度までの本調査の累計数は120人となり、全て *T. cruzi* 抗体検査陰性であった。このうち中南米国籍を有する者は108人(男性74人、女性34人)であり、年齢別では、20代33人、30代43人、40代27人、50代5人であった。国籍別では、ブラジルが97人と最も多く、以下、ペルー8人、メキシコ、コロンビア、パラグアイが各1人であった。彼らの在日期間は平均10.7年(2ヵ月～28年)であった。

シャーガス病に関するアンケート調査をおこなった。サシガメやシャーガス病の認知度は、日本人を除いた中南米国籍者では各々70%、79%であったが、「知っている」と回答したのは、中南米国籍者では全員ブラジル人であった。家族にシャーガス病の者がいたのは2名(祖母、親)だけであり、いずれもブラジル人であった。

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。今年度は195名の抗体検査を実施出来た。うち5名が抗体陽性であった。」そのうち、在日17年を経過するボリビア日系家族に先天性シャーガス病感染者が検出され昨年にひきつづき2例目であった。母親は近医に紹介経過観察中であり、子に関しては無症状である。

4. ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発：

1) *Babesia microti* BMN1-17 組換え蛋白質の作製：*B. microti* 特異抗原として BMN1-17 蛋白質を選び、大腸菌を利用した蛋白質発現について検討を行った。*B. microti* から抽出した DNA を用いて PCR を行ったところ、1050bp の *bmn1-17* 遺伝子がクローニングされた。更にこの遺伝子を pGEX 発現ベクターに組み、GST 融合蛋白質として大腸菌に発現させた。

2) イムノクロマト (ICT) ストリップの検討：ICT ストリップ作製のため、組換え抗原を用いて金コロイド標識の条件について検討したところ、組換え BMN1-17 蛋白質の濃度が 200mg/ml、pH 5.0 が最良であった。得られた金コロイド標識 rBMN1-17 蛋白質、BMN1-17 蛋白質と抗ウサギ BMN1-17 蛋白質 IgG を用いて、ICT ストリップを作製し、特異性について検討を行った。その結果、ハムスターの陽性血清、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検討を行ったが、陽性コントロールにのみバンドが確認され、他のサンプルでは陽性ラインは認められなかった。

3) 実験感染マウスの試料およびヒト血清を用いた評価:

ハムスターを用いて感染実験を行い、継続的に血液を採取して、血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の測定、IFAT、rBMN1-17を用いたELISA及びICTの抗体検出感度を比較した。赤血球寄生率は、実験感染後5日目に1%を越えて急激に増加し、約2週間後にピークを迎えた後、8週後に1%以下に減少した。ELISAでは、5日目から抗体が検出され始め、1週間ほどで急激に上昇してその後高い値を維持した。一方、ICTとIFATでは7日後から検出され始め、その後抗体が継続的に検出された。最後に輸血による*B. microti*感染が日本で初めて確認されたヒト感染血清を用いた検討を行った。その結果、輸血を受けた患者血清および血液ドナーにバンドが認められ、抗体検出が可能であった。

5. フラビウイルス媒介蚊に関する研究:

856雌蚊に個別のマークをつけて、林の中に放逐した。林内の10か所で再捕獲と再放逐を15日間繰り返した。放逐後に、2回再捕獲された個体のデータが44組えられた。各個体について再捕獲された2ヶ所の採集場所の直線距離を移動距離として、1日の平均移動距離を推定した。その結果、1日当たりの平均移動距離は、 10.1 ± 10.6 m、最大移動距離は44mであった。野外で採集されたヒトスジシマカの飼育室における平均余命には、調査した月によって大きな変動がみられた。最も短かったのは9月の採集雌で13.8日、最も余命が長かったのは、6月の採集蚊で平均40.8日だった。調査した公園におけるヒトスジシマカの最高密度

は8月の15.6頭であった。ヒトスジシマカの移動分散範囲は、1日の平均移動距離と平均余命の積によって以下のように推定された。移動分散範囲は、平均余命が20日の場合、平均200m(最大880m)、平均寿命が40日の場合、平均400m(最大1760m)である。

翅にマークした個体15頭、胸部背面にマークした個体18頭、対照区としてマークをしなかった個体20頭を飼育室内で飼育して、マーク後10日間の生存率を調べた。対照区では死亡個体はゼロであったが、翅にマークした個体は40% (=6/15) が10日間で死亡した。これに対して胸部背面にマークした個体の10日間の死亡率は、11% (=2/18) であった。

6. フラビウイルス感染検査診断に関する研究:

WNV-NAT試薬の感度試験は、TaqMan PCR法及びTMA法とも両社の標榜する検出感度を下回る結果となった。特異性試験においては、20プールした献血者検体それぞれ240本について、NATを実施したが、TaqMan PCR法及びTMA法共に全て陰性で、陽性又は偽陽性は検出されなかった。

フラビウイルス遺伝子検出法の感度を増加させる目的でデングウイルスをモデルとして、Flap RT-PCR法の開発を行った。通常使用しているウイルス遺伝子検出用プライマーに12塩基の非ウイルス由来配列(Flap配列)を連結すると、検出感度および増殖量が顕著に増加するとの報告がされた(Afonina, I. et al., Biotechniques 43: 770-774, 2007)。本年度は我々が保有し、通常ウイルス検出用に使用しているプライ

マーに Flap 配列を連結した新たなプライマーを合成し、SYBR Green I を用いた RT-PCR 反応を行い従来のプライマーや、ややウイルス特異的配列を短縮したプライマーとの間で増幅感度・増幅量を比較した。今回 5 パターンについて増幅したが、これまで使用してきたプライマーが最も高感度であった。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。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のなかから 2 番目に顕著であった補体因子 C1s に注目し解析を進めた。

D. 考察

白血球除去フィルターによって 5%アルブミンに添加した異常プリオンが除去できることが示された。昨年度は、生食に異常プリオンを添加して得られた結果だったが、本年度は 5%のアルブミンの結果であり、より血液の性状に近い状態での評価となった。ただし、評価可能な範囲が狭いため 2 Log 以上の除去効果の確認となった。

貯留前白血球除去は、赤血球製剤や血小板製剤の輸血に伴う非溶血性発熱反応を減少させる効果があることが複数の施設での治験から報告されている。一方、輸血による免疫修飾については、術後の感染症発症率の減少や入院期間の短縮などに有意の差があったとの報告がある一方、差がないとの報告もあり、現在でも結論に至っていない。腫瘍の再発率に関しても一定の見解は

得られていない。貯留前白血球除去による感染症予防効果では、白血球内に存在する病原体に有効であると考えられるが、血液バッグに残存する白血球もあるため、除去されずに残存する白血球の中に病原体が存在していれば、感染を引き起こす可能性は否定できない。日本における貯留前白血球除去の効果を見るために日本赤十字に報告されている輸血に伴う副作用情報を解析した。これらの情報は、引用した論文と異なり病院から薬事法に則って報告される主に中程度以上の副作用に限られるため軽微な副作用は含まれない。また、自主的な報告なので全数が報告されている訳ではない。赤血球製剤の貯留前白血球除去導入前後で発熱の報告件数に著明な変化は認められなかった。一方、アナフィラキシーが減少していた。この結果は、他国からの報告と異なる結果であるが、副反応報告対象の違いである可能性もある。

シャーガス病に関するアンケート調査をおこなった。サシガメやシャーガス病の認知度は、日本人を除いた中南米国籍者では各々70%、79%であったが、「知っている」と回答したのは、中南米国籍者では全員ブラジル人であった。家族にシャーガス病の者がいたのは2名(祖母、親)だけであり、いずれもブラジル人であった。中南米出身献血者においては、20~30代の若い世代が7割を占めており、幼少時の住環境や家族の既往者の有無などから、日本の献血における *T. cruzi* 抗体陽性リスクは低いと考えられる。現時点では *T. cruzi* 抗体陽性率は 0/108 であるので、*T. cruzi* 抗体陽性リスクは 1%未満である。平成 22 年度の全献血者数 5,329,676 人、中南米居住歴のある外

国人献血者数 1,700 人から推計すると、17 人未満/年、1/31 万人未満と考えられる。

現在までシャーガス病に関しては医療機関を通じての検査依頼は 43 件 17 名が抗体陽性と確認されている。そのうち 8 名については PCR 法で *T. cruzi*-DNA が検出されている。一方、在日ブラジル人およびボリビア人の献血人数と現在までの在日ラテンアメリカ人の *T. cruzi* 抗体陽性率 (1.8%) から抗体陽性者数は数十名と推定される。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い、サシガメ及びシャーガス病について母国での啓蒙教育のため名前だけは知っていると考えられる。在日ラテンアメリカ人の集住地域東海 4 県における住民に対するシャーガス病に関する啓発活動は自治体の多文化共生課など行政が NPO と共同で実施するようになった。既存の迅速診断キット (試験研究用) が中南米の流行地で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。世界的にシャーガス病が報告されており、我が国でも本感染症に対する具体的な対策が待たれる。

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イムノクロマト法 (ICT) の開発を試みた。ICT ストリップ作製のためには、高純度・高濃度の組換え抗原が必要である。そこで、*B. microti* の DNA を用いて PCR を行い、*bmn1-17* 遺伝子をクローニングした。この遺伝子を大腸菌に組み込み、約 50kDa の可溶性 BMN1-17 蛋白質として発現させた。この組換え抗原を用いて作製した ICT ストリップは、*B. microti* のハムスター感染血清とのみ発色し、ダニに媒介されるアナプラズマやエールリキア

の感染血清では発色せず、*B. microti* に対する高い特異性が認められた。ハムスター感染モデル実験で、感染後 5 日で赤血球内に *B. microti* に認められ、ELISA によっても抗体が検出された。ICT では、やや遅れて IFAT と同様感染後 7 日後に抗体が検出された。一般的に ICT は ELISA と同程度の検出感度を有するとされている。しかしながら、本研究では ICT による抗体検出が ELISA よりも遅れたことから、更に ICT の検出感度を上げる改善が必要である。さらにヒトの感染血清を用いた試験を行った。その結果、*B. microti* 重症感染発症患者および不顕性の血液ドナーの血清中から ICT により抗体が検出された。今後更により多くの人血清数を用いて、その有用性について検討する必要がある。

蚊の移動分散範囲を 1 日当たりの移動距離と蚊の寿命の積によって推定する方法は、蚊が一生のうちで活動する範囲を推定することができ、有用である。現在利用できるデータに基づいて、ヒトスジシマカが 1 日に移動する距離は平均 10m (最大 44m) と推定された。このデータは市街地に隣接した林内で行われた実験で得られたものであり、ヒトスジシマカの吸血習性を考えると、住居が密集した住宅街での分散範囲の推定に適用するには無理があると思われる。今後、住宅街でマーキング実験を行って、より信頼度のある推定値を得る必要がある。公園で人を刺しに来たヒトスジシマカの余命が、月によってかなり大きく異なることが明らかになった。この変動の第一の原因は、公園に生息するヒトスジシマカ集団の中に占める若い成虫の比率が季節的に大きく変化することにあると思われる。数日前

に羽化したばかりの若い成虫は、期待余命が長いので、若い個体が多いほど飼育条件下で観察される平均余命は長くなると考えられる。平均余命と1日の平均移動距離の積によって、ヒトスジシマカの移動分散範囲が平均200m（平均余命が20日の場合）から平均400m（平均余命が40日の場合）と推定された。これらの推定値は、今後の調査研究によってより正確な値へと修正されると考えられるが、公園や林の内部のような環境における移動分散範囲と理解することができる。

フラビウイルス感染に対する迅速かつ高感度な病原体検出法は、血液製剤の安全性確保と安定供給のために非常に有用である。デングウイルスをモデルとして現行のRT-PCR法をさらに高感度にする可能性のあるFlap RT-PCR法を試みた。しかし結果は従来法に勝らず、少々劣る結果となった。デングウイルスPCR法はすでに条件としてほぼ最適化されているものには適当でない可能性がある。

E. 結論

プリオン研究について、白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去効果を検討した。白血球除去フィルターを用いて濾過し、異常プリオンの除去の有無を解析した。2 Log 以上除去できることが示された。また、エキソソーム精製試薬を用いて異常プリオンの濃縮を検討し、異常プリオン感染細胞の培養上清 10mL からウエスタンブロットで検出できる量にまで異常プリオンは濃縮できた。

貯留前白血球除去法と初流血除去に関し、報告データを用いた解析を行った。本解析

においては、貯留前白血球除去により非溶血性発熱反応の減少は認められなかったが、アナフィラキシー反応は減少していた。初流血除去は、血小板での細菌陽性率が導入前の0.17%から導入後に0.05%となり、皮膚常在菌の混入予防法として有用な方法である事が示された。

シャーガス病については東海4県において同意を得た中南米居住歴を有する献血申込者に対し *T. cruzi* 抗体検査を実施した。29人全員陰性であった。今年度までの本調査の累計数は120人となり全て *T. cruzi* 抗体陰性であった。シャーガス病に関するアンケート調査をおこなった。サシガメとシャーガス病の認知度は、日本人を除いた中南米国籍者では各々70%、79%であった。さらに、ラテンアメリカ人定住者コミュニティーのある地域において195名の抗体検査を行ない、5名が抗体陽性であった。うち、在日17年を経過するボリビア日系家族に先天性シャーガス病感染者が検出された。

バベシア症については、簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法の開発を *B. microti* の BMN1-17 蛋白質を用いて行った。大腸菌を用いて可溶性の組換え BMN1-17 蛋白質を発現させ、得られた rBMN1-17 蛋白質を用いたイムノクロマトは、*B. microti* に対する高い特異性を示した。感染ハムスター血清を用い赤血球寄生率が検出されるほぼ同時期に本法により抗体を検出した。またヒト感染血清を用いても、抗体検出が可能であった。

フラビウイルス関連研究においては重要なフラビウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカの平均移動距離は 10.1 ± 10.6 m、最大移動距離は44mと推定された。平均余命は

9月の採集雌で最も短く13.8日、6月の採集雌で最も長く平均40.8日だった。以上より、ヒトスジシマカが一生の間に移動分散する範囲は平均200m（平均余命が20日の場合）から平均400m（平均余命が40日の場合）と推定された。フラビウイルス遺伝子検出法の感度を増加させる目的でデングウイルスをモデルとして、Flap RT-PCR法の開発を試みたが感度の上昇が見られなかった。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 英文論文

Tsuda, Y. and Kim, K.S.: Ecology of mosquitoes inhabiting a park in urban Tokyo, Japan: density of biting *Aedes albopictus* and laboratory estimation of the residual longevity. *Medical Entomology and Zoology* 63: 223-230, 2012

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

百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、内田茂治、日野学、鬼束惇義、南澤孝夫、小島精、高松純樹、田所憲治：東海4県の中南米居住歴を有する献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査とシャーガス

病に関するアンケート結果について、第60回日本輸血・細胞治療学会総会、福島、2012年

百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、石野田正純、松本千恵子、内田茂治、日野学、高松純樹、田所憲治：東海4県の中南米からの定住者の献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査パイロットスタディと日本における中南米からの定住者の献血者数の推計について、第53回日本熱帯医学会大会、帯広、2012年

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

1. 5%アルブミンに異常プリオンが持続感染している細胞株の上清を添加し、白血球除去フィルターを用いて濾過し、異常プリオンの除去の有無を解析した。2 Log 以上除去できることが示された。
2. エキソソーム精製試薬を用いて異常プリオンとC型肝炎ウイルス(HCV)の濃縮を検討した。異常プリオン感染細胞の培養上清10mLからウエスタンブロットで検出できる量にまで異常プリオンは濃縮できた。一方、HCVも10mLのアルブミン製剤から全ウイルス量が沈殿として回収できた。10mL程度の検体に含まれる微量なウイルスを濃縮・検出するために有用な方法である事が判明した。

A. 研究目的

ウシ海綿状脳症の対策として実施してきた対策が功を奏し、狂牛病を発症したウシの数は激減した。それに伴い変異型CJD(vCJD)の報告は、2000年をピークとして以後減少し、2012年の英国の死亡例は0となった。しかし、ニューギニアのKuruの追跡調査から、感染してから発症するまで50年以上を要した例もあることから今後も長期にわたり対策を取り続ける必要がある。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動物実験から完全ではないが異常プリオンを除去できることが証明されている。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。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。そこで、異常プリオン感染細胞株の培養上清を用いて白血球除去フィルターから実際に異常プリオンが除去できるか検討を続けている。昨年度は白血球除去フィルターに吸着し易いと考えられた生食に培養液を添加して検討したが、今年

度は、血漿の性状に近い5%アルブミン製剤に添加して除去の有無を検討した。さらに昨年度、異常プリオンが exosome と共に沈殿してくる事を明らかにしたが、ウイルスの粒子と exosome が細胞質から小胞に放出する場所が同じであることから両者の性状が類似していると推定した。そこで市販されている exosome の精製試薬を用いてC型肝炎ウイルス (HCV) の濃縮を検討した。

B. 研究方法

(1) 異常プリオンの検出法

細胞を 0.4m L 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、ProteinaseK (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、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) 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、0.5mL を 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、 1×10^5 / 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。

(3) exosome の精製試薬を用いた C 型肝炎ウイルス (HCV) の濃縮の検討

5%アルブミン 10mL に人血漿由来の HCV100 μ L を添加し、混合後 100 μ L を濃縮前の検体として採取した。残りの約 10mL のアルブミンに ExoQuick-TC (System Biosciences 社) を 2mL 添加し、4°C にて 14 時間以上静置後 1500g で 30 分遠心し沈殿を得た。濃縮前後の検体から RNA を抽出し、50 μ L に溶解した。溶解した核酸をそれぞれ 10 倍ずつの段階希釈し、希釈した RNA を 10 μ ずつ用いて one step RT-PCR (40 サイクル) を行ない、増幅産物が得られた最大希釈倍率を求めた。

C. 研究結果

(1) 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 5%アルブミンに添加し、白血球除去フィルターを通した検体からは、 10^{-3} に希釈して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^{-4} 倍希釈した検体まで異常プリオンが検出できた (図 1)。

(2) exosome の精製試薬を用いた C 型肝炎ウイルス (HCV) の濃縮の検討

濃縮後の検体は 10mL 由来であり、濃縮前の検体が $100 \mu\text{L}$ であることから、全てのウイルスが濃縮によって回収できていれば、濃縮前の検体比べて約 100 倍の核酸量になる。濃縮前では 10 倍希釈まで HCV の遺伝子が増幅されたが、濃縮後は 1000 倍希釈まで HCV が検出できた (図 2)。

D. 考察

白血球除去フィルターによって 5%アルブミンに添加した異常プリオンが除去できることを示すことができた。昨年度は、生食に異常プリオンを添加して得られた結果だったが、今回は 5%のアルブミンの結果であり、より血液の性状に近い。評価可能な範囲が狭いため 2Log 以上の除去効果しか確認できなかった。一方、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ため、完全とは言えないまでも感染予防に効果を発揮していると考えられる。2011 年に McCutcheon らによって PLoS ONE に発表されたヒツジの輸血を介したプリオン感染モデルでは、無処理の赤血球製剤におけるプリオン感染率 18.9%が白血球除去フィルター処理によって 6.9%、血小板が 24.3%から 3.4%、血漿が 13.2%から 3.4%にそれぞれ $1/3$ – $1/4$ に減少していた。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感染を予防できる。効果的なスクリーニング法がない現状では、白血球を除去することによって輸血の副作用の発生も抑制する事が期待できることから、白血球除去フィルターの導入は適切な判断だと言える。

一方、血液中での異常プリオンの存在様式に関し、exosome の精製試薬によって異常プリオンも精製された事から、ウイルスも同じ試薬によって精製 (濃縮) できる可能性を検討したところ、10mL のアルブミンからほぼ全量のウイルスを沈殿中に濃縮できる事を明らかにできた。大容量の血漿分画製剤や培養上清から簡便にウイルスが精製する事が可能になり、血液製剤の安全性向上に有効な精製法だと考えられた。

E. 結論

白血球除去フィルターによって血漿に類似した 5%アルブミンに添加した異常プリオンを 2Log 以上除去できた。また、exosome を精製する試薬を用いる事で異常プリオンだけでなく HCV も効率良く濃縮できることを明らかにした。

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、野島 清子、浜口 功:末梢血単核球から誘導した赤芽球のヒトパルボウイルス B19 に対する感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年
- 2)岡田 義昭:血液製剤のウイルス感染症対策、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年
- 3)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 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年
- 4)水澤 左衛子、岡田 義昭:核酸増幅試験法のための E 型肝炎ウイルスの WHO 国際標準品の制定のための共同研究と日本の国内標準品の作成について、第 60 回日本輸血細胞治療学会、郡山、2012 年

H.知的財産権の出願・登録状況

なし