

201328002A

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25年度 総括・分担研究報告書

平成26（2014）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25年度 総括・分担研究報告書

平成26（2014）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・・・・・・11
研究分担者：岡田義昭（埼玉医科大学病院・血液・細胞移植部）
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）・・・・・・19
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・・・・・・27
研究分担者：百瀬俊也（日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター製剤一部）
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：個体識別マーキング法を用いたヒトスジシマカの移動分散に関する基礎研究・・・・・・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. 高感度ウイルスゲノム検出法の検討およびウエストナイルウイルス NS1 検出系開発のための基盤的研究・・・・・・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・・・・・・67

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-医療-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。

変異型プリオン病の検出感度を上げるための基盤研究を行った。血清や血漿では添加するエキソソーム精製試薬の量を適正化することによってウイルスを効果的に濃縮することが可能になった。濃縮したウイルスは感染性を有し、検出法としてだけではなく、ウイルスの不活化・除去法の評価用の高力価のウイルス調整法としても有用な方法であった。

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。シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。対象者 457 人のうち 1 人が *T. cruzi* 抗体陽性であった。

バベシア症については、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法について、ヒト血液試料を用いてその有用性の確認を行った。

ウイルス媒介蚊については、移動分散に関する実験を行った。ヒトスジシマカの再捕獲率はオオクロヤブカよりも有意に高かった。またヒトスジシマカの再捕獲率を放逐場所間で比較したところ有意に異なっていた。大きな緑地の内部はヒトスジシマカ潜伏や吸血動物の探索に好適であり、雌成虫が周囲の生息場所から集まってくることが示唆された。

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 法の開発を行った。

研究分担者：

岡田義昭（埼玉医科大学血液・細胞移植部
部長）

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 (日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター 部長)

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:

五十嵐 滋 (日本赤十字社血液事業本部 課長)

沖 学 (日本赤十字社血液管理センター 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部長)

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)

平 力造 (日本赤十字社血液事業本部課長)

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)

高橋 勉 (日本赤十字社血液事業本部安全管理課)

古澤秀明 (日本赤十字社血液管理センター検査課)

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。南米居住歴を有する献血者の抗体保有率等の実態を明らかにすることで輸血の安全性に貢献する。パペ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。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. エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発:

10%牛胎児血清入りの DMEM と 5%アルブミン製剤 10mL に牛下痢症ウイルス (BVDV)、仮性狂犬病ウイルス (PRV)、シンドビスウイルスを添加し、よく混ぜた後に濃縮前検体として 10~100 μ L を採取した。採取後の約 10m のウイルス溶液に市販されているエキソソーム精製試薬 ExoQuick-TC (System Biosciences 社) を 2mL 添加し、4°C にて 14 時間以上静置した。反応後、1500g で 30 分遠心して得られた沈殿を 500 μ L の PBS で溶解しウイルス濃縮液とした。牛胎児血清とヒト血漿では、それぞれ 10mL に添加するエキソソーム精製試薬の量を 0-2mL に変化

させ、それぞれから得られた沈殿を PBS に溶解後、含まれるウイルス量を測定した。

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：

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々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。

3. バベシア症に関する研究：

23 年度および 24 年度にマウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法（ICT）について、人血液試料を

用いてその有用性を確認することとした。神戸医療大学薬学部斎藤あつ子教授より 111 検体のヒト血液の提供を受けた。これらの試料は、インフォームドコンセントを実行して得られて採血されている。111 検体中、IFA により 61 検体が抗体陽性、50 例が抗体陰性であることが確認されている。これらの血液を用いて市販の DNA 抽出キットにより DNA を精製した。また、エール大学より、60 検体の人血清の提供を受けた。これらの血清は、インフォームドコンセントを実行して得られ。帯広畜産大学、神戸医療大学、エール大学の倫理委員会の承認を得て実施した。

4. フラビウイルス媒介蚊に関する研究：

ヒトスジシマカの胸部背面の 5ヶ所に塗料を塗って個体を識別するマーキング法を考案し、2013 年 3 月 18 日から 27 日の期間、石垣島の住宅街でヒトスジシマカとオオクロヤブカの移動分散に関する実験を行った。蚊の採集は毎日 8:00 と 14:00 の 2 回行った。各採集場所に採集者一人が 10 分間とどまり、吸血のために飛来する蚊を吸虫管で採集した。採集された蚊は、場所ごとに紙コップに入れて持ち帰った。カップから蚊を 1 個体ずつ吸虫管で取り出し、マークの有無をチェックした。マーク虫はマークを確認、採集された場所を記録して紙コップに戻し、その日のうちに採集された場所から放した。無マーク虫には識別マークをつけて、その日のうちに採集された場所から放逐した。マーキングは初めの 7 日間継続して行い、その後の 3 日間は捕獲だけを行った。

5. 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。

(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：エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発

5%アルブミン製剤や10%FCS 入りの細胞培養液では添付資料に記載されている2mLを添加して遠心することによって感染性を有した状態でウイルスを濃縮することができた。濃縮前の10 μ Lの溶液に含まれるウイルス量と同じ溶液10mLから濃縮した沈

殿のウイルス量を検討したところ、牛下痢症ウイルスでは、約3Log濃縮されていた。また、10%FCS 入りの培養液を用いても同様な結果であった。さらに仮性狂犬病ウイルスやシンドビスウイルスも同様に効率良く感染性を有した状態で濃縮することができた。

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4県(愛知県、静岡県、岐阜県、三重県)の「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者に対して、同意を得た上で、*Trypanosoma cruzi*抗体検査とシャーガス病に関するアンケート調査を行うパイロットスタディを実施した。平成25年1月8日～11月30日で、対象者は457人で、男性335人(73%)、女性122人(27%)、平均年齢35.1歳、67%が40歳未満の若い世代であり、献血回数については、初回献血者が42%であった。対象者の88%がブラジル出身、日本滞在年数は平均15.3年であった。また、幼少時の家の構造が土壁と回答した件数が3%、家族にシャーガス病と診断された者が1.5%と、シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。対象者457人のうち1人が*T. cruzi*抗体陽性であった。*T. cruzi*抗体陽性リスクを推計すると、全国で1年間に*T. cruzi*抗体陽性となる献血者は5人以下と考えられた。

献血の機会のないラテンアメリカ人についてブラジル移動領事館及びラテンアメリカ人コミュニティーで開催される健康相談会に支援協力し、健康相談に合わせて*T. cru*

zi抗体の検査を実施した。研究調査により判明した*T. cruzi*抗体陽性者に対してどのように医療体制を整えるかを検討した。

3. ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発：

マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法のLAMPおよび簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法(ICT)について、人血液試料を用いてその有用性を確認することを目的とした。LAMPについては神戸医療大学から提供を受けた111検体の人血液よりDNAを抽出して検討を行った。その結果、抗体陽性を示した61検体中、LAMPで陽性を示した検体は5検体のみで、非常に検出率が低かった。また、IFATで陰性を示した50検体中、LAMPで陽性を示した検体が1例認められた。ICTについては、エール大学より60検体の人血清を入手し、これらの血清を用いて、検討中を開始した。

4. フラビウイルス媒介蚊に関する研究：

調査地の広さは230m×250mで、調査地内には緑地、人家、商店、ビルが存在し、ヒトスジシマカの生息場所が点在していた。個体識別マーキングは初めの7日間行い、合計232頭のヒトスジシマカと216頭のオオクロヤブカをマークして、4ヶ所から放逐した。ヒトスジシマカの再捕獲率は0.21(48/232)で、オオクロヤブカの0.09(20/216)よりも有意に高かった。またヒトスジシマカの再捕獲率を放逐場所間で比較したところ有意に異なっていた。放逐された蚊の動きを分析した結果、大きな緑地の内部はヒトスジシマカとオオクロヤブカの潜伏や吸血動物の探索に好適であり、雌

成虫が周囲の生息場所から集まってくることを示唆された。

5. 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)の国内発生に備えて現在備蓄しているTMA法のWNV-NAT試薬(Procleix® WNV Assay)と日本赤十字社4カ所のNAT施設が保有しているcobas®s401システムを用いたTaqMan PCR法のWNV-NAT試薬(TaqScreen® WNV assay)について、感度の比較検討を行った。TMA法のWNV-NAT試薬の方が、TaqMan PCR法の同試薬と比べ高く安定した結果が得られたが、両者とも製造各社が示している感度とほぼ同等であり、十分な結果が得られた。また、WNV国内感染発生時にWNV-NATを組み入れた場合、現行のNATスクリーニングの検査所要時間、完了時刻にどの程度影響するかについて、実検体を用いてシミュレートした。WNV対象NAT検体が先行して検査できる場合は、通常検査の平均所要時間9時間20分に比べ40分程度の延長で対応できることが確認できた。

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。PCRプライマーの5'末端に12塩基からなるFlap配列を付加することにより増幅感度あるいは増幅量が改善されるとの報告がある。昨年度我々はデングウイルス検出用プライマーにFlapを連結したが改善効果は見られなかった。そこで今回Flapを2種類のフラビウイルス共通プライマーセットと1種類のアルファウイルス共通プライマーに付加し、その効果を検討した。NS3領域に対

応するフラビウイルス共通プライマーの場合、使用した3種類のウイルス（デング1型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ヨコセウイルス）のすべてで増幅感度および増幅量が向上した。一方NS5領域に対応するプライマーではウイルス種によって結果が分かれた。4種のアルファウイルス（チクングニヤウイルス、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、ゲタウイルス）について、Flapを付加したアルファウイルス共通プライマーを試したところ、いずれのウイルスに対してもFlapは効果的であったが、チクングニヤウイルスでの効果は弱かった。またFlap付加アルファウイルス共通プライマーを使用して、ゲタウイルスゲノムを増幅した。

D. 考察

エキソソーム精製試薬を用いて細胞培養上清中の異常プリオンを濃縮できることをこれまでに報告したが、同じ試薬を用いることによってウイルスも濃縮できることを昨年度報告した。今年度は、10%牛胎児血清入りの細胞培養上清や血清、さらに血漿からのウイルス濃縮が可能なのか検討した。血清や血漿では添加するエキソソーム精製試薬の量を適正化することによって10mLという大容量からウイルスを効果的に濃縮することが可能になった。濃縮したウイルスは感染性を有し、検出法としてだけでなく、ウイルスの不活化・除去法の評価用の高力価のウイルス調整法としても有用な方法であることが明らかになった。さらに濃縮効果は非常に微量なウイルスも同様に濃縮することができることも明らかになることができた。

シャーガス病に関する、東海4県のパイロットスタディのアンケート調査により、「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者の背景は、男性が73%、女性が27%と男性が多く、平均年齢35.1歳、67%が40歳未満の若い世代であり、献血回数は42%が初回献血であった。大多数の88%がブラジル出身であり、日本滞在年数は平均15年であることが明らかとなった。

また、幼少時の家の構造が土壁と回答した件数が3%、家族にシャーガス病と診断された者が1.5%と、シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。

東海4県の中南米出身献血者（カテゴリー1）の対象457名中 *T. cruzi* 抗体陽性者は1名のみであったこと、全国で中南米出身献血者（カテゴリー1）は2,149人/年であったこと、東海4県の他のカテゴリー（2・3）での疫学調査から陽性者は認められていないことから、全国で1年間に *T. cruzi* 抗体陽性となる献血者は5人以下と推計された。一方、中南米滞在歴等を有する献血者の約3/4を占め、ほとんど日本人と考えられるカテゴリー3「中南米諸国に通算4週間以上滞在した」の滞在期間等の基準については、今後の調査、検討により見直しが必要であると考えられ

輸血用血液の *B. microti* 感染の有無を評価する検査法に関して、人検体を用いて、real-time LAMP法およびICTを実施した。その結果、LAMP法により *B. microti* に特異的なバンドパターンが得られた。また、ICTにより、*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抗体が検出された。更に、100例以上のヒ

ト DNA サンプルを用いて、LAMP 法を実施した。しかしながら、61 例の抗体陽性者の DNA サンプルを用いた LAMP 法で、5 例より陽性反応が認められなかった。しかし、3 株の *B. microti* から抽出された DNA を陽性対照として用いたところ、3 種の株で遺伝子増幅が認められた。これら神戸株、ミュンヘン株、グレイ株はそれぞれ日本、ドイツ、アメリカから分離されたものであり、地理的に非常に隔だっているにも関わらず遺伝子増幅が認められたことは、本 LAMP 法が世界的な *B. microti* の検出に使用可能であると示唆される。また、アメリカの流行地で採取された人血清を用いて、ICT の有用性の検討は今回期限内に実施できなかった。しかしながら、ICT の作製に使用された BMN17 遺伝子情報はミュンヘン株から得られており、世界的に非常に良く保存されている。このミュンヘン株の遺伝子情報に基づいて作製され組換え蛋白質を用いた ICT により、地理的および遺伝的に遠い神戸の患者血清で抗体を検出できたことから、本 ICT の実用化の可能性は高いと考えられる。今後、更により多くの人血清数を用いて、これらの遺伝子ならびに血清診断法のその有用性について検討する必要がある。

個体識別マーキング法を用いたヒトスジシマカの移動分散に関する研究においては、採集場所 C から放逐された個体がそのままとどまる可能性が高く、また、周辺の間所から C へ移入してくる個体も多いことがわかった。特にヒトスジシマカの場合、採集場所 B から C へは方向性を持って移動している個体が多いことが示唆される。これらの結果は、採集場所 C の周辺がヒトスジシマカやオオクロヤブカの潜伏や吸血飛来に

適した場所であることを意味している。多くの住宅街には大小の茂みや緑地が存在することから、採集場所 C のように潜伏や吸血飛来に適した場所がどのように分布しており、それがヒトスジシマカの移動にどのように影響しているかを今後の研究で明らかにする必要がある。

E. 結論

プリオン研究について、変異型プリオン病の検出感度を上げるための基盤研究を行った。血清や血漿では添加するエキソソーム精製試薬の量を適正化することによってウイルスを効果的に濃縮することが可能になった。濃縮したウイルスは感染性を有し、検出法としてだけでなく、ウイルスの不活化・除去法の評価用の高力価のウイルス調整法としても有用な方法であった。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。対象者は 457 人であり 1 人が *T. cruzi* 抗体陽性であった。バベシア症については、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) について、人血液試料を用いてその有用性を確認することを行った。ウイルス媒介蚊について、ヒトスジシマカの移動分散に関する実験を行った。ヒトスジシマカの再捕獲率はオオクロヤブカよりも有意に高かった。またヒトスジシマカの再捕獲率を放逐場所間で比較したところ有意に異なっていた。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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 英文論文

Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. *J. Biosci Bioeng.* 2013. 115(19): 104-10.

Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nubling CM, Hanschmann KM, HEV collaborative Study Group.: World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg. Infect. Dis.* 2013. 19(5):729-735.

Imai, K., Maeda, T., Sayama, Y., Mikita, K., Fujikura, Y., Misawa, K., Nagumo, M., Iwata, O., Ono, T., Kurane, I., Miyahira, Y., Kawana, A. and Miura, S.: Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. *Emerging Infectious Diseases.* 20(1):146-148. 2014

2) 和文論文

1) 岡田義昭、輸血用血液における病原体不

活化技術の現状と新規技術の開発。検査と技術 42: 4-7, 2014

2. 学会等発表

1) 国際学会

S. Momose, Y. Furui, M. Ishinoda, T. Takahashi, S. Igarashi, Y. Sayama, S. Miura, C. Matsumoto, S. Uchida, S. Hino, A. Onitsuka, T. Minamizawa, M. Hamaguchi, M. Okada, J. Takamatsu, M. Satake, M. Minami, K. Tadokoro: Anti-trippanozoma cruzii test and questionnaire survey in Japan for blood donors native of latin America. 24th Regional Congress of the ISBT, Kuala Lumpur, Malaysia 2013

2) 国内学会

岡田義昭、水沢左衛子、浜口功：血漿分画製剤からの簡便なウイルスの濃縮法：第 6 1 回日本輸血・細胞治療学会、横浜、2013 年

岡田義昭：血漿及び血漿分画製剤からの簡便なウイルス濃縮法とその応用、第 6 1 回日本ウイルス学会、神戸、2013 年

古澤秀明、森安浩之、後藤康仁、増田久美子、馬場明美、学、山中烈次、平力造、百瀬俊也、河敬世：我が国におけるウエストナイルウイルス (WNV) 感染発生時の献血血液の検査、第 37 回日本血液事業学会総会、札幌、2013 年

津田良夫. ヤブカの個体識別マーキング法の検討：石垣島におけるヒトスジシマカとオオクロヤブカを用いた実験. 第 65 回日本

衛生動物学会東日本支部大会、2013 年 10
月 25 日、川口市

田島茂、小滝徹、谷ヶ崎和美、小林大介、
谷脇妙、沢辺京子、高崎智彦. Flap 配列を
付加したフラビウイルス共通プライマーお
よびアルファウイルス共通プライマーの評
価とゲタウイルス検出の実例について. 第
20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、
神戸、2013 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

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（埼玉医科大学病院 血液・細胞移植部 部長）

研究要旨

エキソソーム精製試薬を用いて細胞培養上清中の異常プリオンを濃縮できることをこれまで報告したが、同じ試薬を用いることによってウイルスも濃縮できることを昨年度報告した。今年度は、10%牛胎児血清入りの細胞培養上清や血清、さらに血漿からのウイルス濃縮が可能なのか検討した。血清や血漿では添加するエキソソーム精製試薬の量を適正化することによって10mLという大容量からウイルスを効果的に濃縮することが可能になった。濃縮したウイルスは感染性を有し、検出法としてだけでなく、ウイルスの不活化・除去法の評価用の高力価のウイルス調整法としても有用な方法であることが明らかになった。さらに濃縮効果は非常に微量なウイルスも同様に濃縮することができることも明らかにすることができた。

A. 研究目的

ウシ海綿状脳症の対策が功を奏し、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年をピークとして減少し、2013年の英国の死亡例は0となった。我が国では、英国等の滞在歴を有する献血者からの採血を制限していることや白血球除去フィルターの導入によって血液製剤を介した変異型CJDの感染する可能性は非常に少ないものとなっている。また、異常プリオンを核酸増幅検査のように増幅させるPMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) 法の増幅効率が向上し、CJDと診断された患者の髄液からも異常プリオンが検出できるようになった。このような状況の中で、必要が生じたときに血液中からも異常プリオンを検出できる方法を開発しておくことが必要であ

り、エキソソーム精製試薬を用いることによって感染細胞の培養液から異常プリオンを濃縮・検出できることを報告してきた。さらに昨年度、ウイルスの粒子とエキソソーム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、エキソソーム精製試薬を用いてウイルスの濃縮を試みた。5%アルブミン製剤や免疫グロブリン製剤では10mLから効率良くウイルスを濃縮できることを明らかにしたが、血清や血漿では困難であった。今年度は、至適条件を検討し、血清や血漿からウイルスを効率良く濃縮できる方法を検索した。

B. 研究方法

(1) エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発

10%牛胎児血清入りのDMEMと5%アルブミン

製剤 10mL に牛下痢症ウイルス (BVDV)、仮性狂犬病ウイルス (PRV)、シンドビスウイルスを添加し、よく混ぜた後に濃縮前検体として 10~100 μ L を採取した。採取後の約 10m のウイルス溶液に市販されているエキソソーム精製試薬 ExoQuick-TC (System Biosciences 社) を 2mL 添加し、4°C にて 14 時間以上静置した。反応後、1500g で 30 分遠心して得られた沈殿を 500 μ L の PBS で溶解しウイルス濃縮液とした (図 1)。

牛胎児血清とヒト血漿では、それぞれ 10mL に添加するエキソソーム精製試薬の量を 0~2 mL に変化させ、それぞれから得られた沈殿を PBS に溶解後、含まれるウイルス量を測定した。

また、極微量のウイルスに対する回収率を評価するために仮性狂犬病ウイルスを牛胎児血清 1 mL 当たり約 10 感染価に調節した牛胎児血清にエキソソーム精製試薬を添加し、上記と同様の処理を行い、回収効率を検討した。

(2) ウイルスの感染価測定

牛下痢症ウイルスの感染価は、MDBK 細胞を用いた。感染 1 日前に 96 穴プレートに 5×10^4 /well を蒔き、PBS で 500 μ L にした濃縮前後のウシ下痢症ウイルス (BVDV) を 10 倍ずつの段階希釈を行ない、10 の各々独立した希釈系列を作製し、100 μ L ずつ細胞に感染させた。感染 7~10 日後に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って各検体の TCID₅₀ を求めた。

仮性狂犬病ウイルス (PRV) の感染価は、CRFK 細胞を用いた。感染 1 日前に 96 穴プレートに 1×10^4 /well を蒔き、PBS で 500 μ L にした濃縮前後の仮性狂犬病ウイルスを 10 倍ずつの段階希釈を行ない、10 の各々独立した希釈系列を作製し、100 μ L ずつ細胞に感染させた。感染 3~5 日後に CPE

の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って各検体の TCID₅₀ を求めた。

シンドビスウイルスの感染価は、Vero 細胞を用いた。感染 1 日前に 96 穴プレートに 1×10^4 /well を蒔き、PBS で 500 μ L にした濃縮前後のシンドビスウイルスを 10 倍ずつの段階希釈を行ない、10 の各々独立した希釈系列を作製し、100 μ L ずつ細胞に感染させた。感染 3~5 日後に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って各検体の TCID₅₀ を求めた。

(3) 微量ウイルスの回収効率の評価

牛胎児血清 11mL に 10 ビリオン/mL となるように仮性狂犬病ウイルスを添加し、濃縮前の検体 1 mL を採取した。残りの 10mL の検体に 0.3 mL のエキソソーム精製試薬を添加し濃縮した。濃縮前の検体に培養液 4.5mL を加え、前日に蒔いておいた CRFK 細胞に 100 μ L ずつ 48 穴に感染させた。濃縮したウイルスは、PBS 500 μ L で溶解後培養液を 10mL 添加し、前日に蒔いておいた CRFK 細胞に 100 μ L ずつ 96 穴に感染させた。感染 3~4 日後に CPE を生じたウエル数を数えた。実験は独立に 4 回行った。

C. 研究結果

(1) エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発

5%アルブミン製剤や 10%FCS 入りの細胞培養液では添付資料に記載されている 2 mL を添加して遠心することによって感染性を有した状態でウイルスを濃縮することができた。濃縮前の 10 μ L の溶液に含まれるウイルス量と同じ溶液 10mL から濃縮した沈殿のウイルス量を検討したところ、牛下痢症ウイルスでは、約 3Log 濃縮されていた。

また、10%FCS 入りの培養液を用いても同様な結果であった。さらに仮性狂犬病ウイルスやシンドビスウイルスも同様に効率良く感染性を有した状態で濃縮することができた(図2)。次に血清と血漿を検討したが、大量の沈殿が生じ溶解することは困難であった。これまで市販のエキソソーム精製試薬のプロトコールに従って添加する試薬の量は10mL当り2mLと決めていたが、ウイルスが沈殿する至適添加量を解析したところ、2mLよりも少ない量で充分であることが判明した(図3)。そこで血漿でエキソソーム精製試薬の量を検討したところ、10mL当り0.3~0.5mL添加すれば、ウイルスは沈殿してくるが血漿タンパクの沈殿が少ないことが明らかになった(図4)。

(2) 微量ウイルスの回収効率の評価

濃縮前の検体から4回平均で4.5個の感染性ウイルスが回収できた。一方、濃縮後の検体からは平均37.5個のウイルスが検出され、約83%のウイルスが濃縮できたことになる。血清から非常に濃度の低いウイルスが効率良く、しかも感染性を保持しながら濃縮できることが明らかになった。

D. 考察

エキソソーム精製試薬によって異常プリオンが濃縮されたことから昨年度は、ウイルスも同じ試薬によって濃縮できる可能性を検討し、10mLの5%アルブミン製剤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。しかし、血清や血漿では溶解が不可能な程の大量の沈殿が生じてしまい濃縮できなかった。今年度は、血清や血漿などタンパク質濃度の高い溶液でも濃縮可能な方法を検討した。用いた精

製試薬では検討した3つのウイルスが感染性を保持した状態で濃縮できることが明らかになったので容易にウイルスの感染価を指標に濃縮効率を評価することができた。そこで添加する試薬の量を変えてそれぞれの濃縮効率を解析した結果、10%FCS入りの細胞培養液において2mLよりも少ない精製試薬によっても濃縮できることが明らかになった。この結果を基に牛血清とヒト血漿も同様に検討した結果、10mL当り0.3~0.5mLの精製試薬を添加すれば、共沈してくる血漿タンパクを減少させウイルスが濃縮できることが判明した。培養液と同様に感染性も保持していた。また、検討したウイルス溶液はウイルス量が多いことから極めて少ない場合の濃縮効率も確認した。1mL当り数個のウイルスが混入した血清10mLを濃縮したところ約83%のウイルスを回収することができ、微量なウイルスにおいても充分濃縮できることを明らかにすることができた。10mLから濃縮できる本方法は、血漿分画製剤や原料血漿等に混入する極めて少量のウイルスを簡便に濃縮できることから血液製剤の安全性向上に有効だと考えられた。

E. 結論

エキソソーム精製試薬を用いる事によって異常プリオンだけでなくウイルスも血清や血漿から通常の実験室にあるような遠心機と冷蔵庫があれば、簡便に濃縮できることを明らかにした。極微量なウイルスも濃縮することで検出可能になることが期待でき、血液製剤の安全性向上に貢献すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, and Fukui K. : Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity.

J. Biosci Bioeng. 2013. 115(19): 104-110.

2) Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nubling CM, Hanschmann KM, HEV collaborative Study Group. : World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA.

Emerg. Infect. Dis. 2013. 19(5):729-735.

3) 岡田 義昭、輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発。

検査と技術、42巻、4～7ページ、2014年。

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、浜口 功：血漿分画製剤からの簡便なウイルスの濃縮法：第61回日本輸血・細胞治療学会、横浜、2013年

2) 岡田 義昭：血漿及び血漿分画製剤からの簡便なウイルス濃縮法とその応用、第61回日本ウイルス学会、神戸、2013年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

5%アルブミン製剤
ウシ下痢症ウイルス液

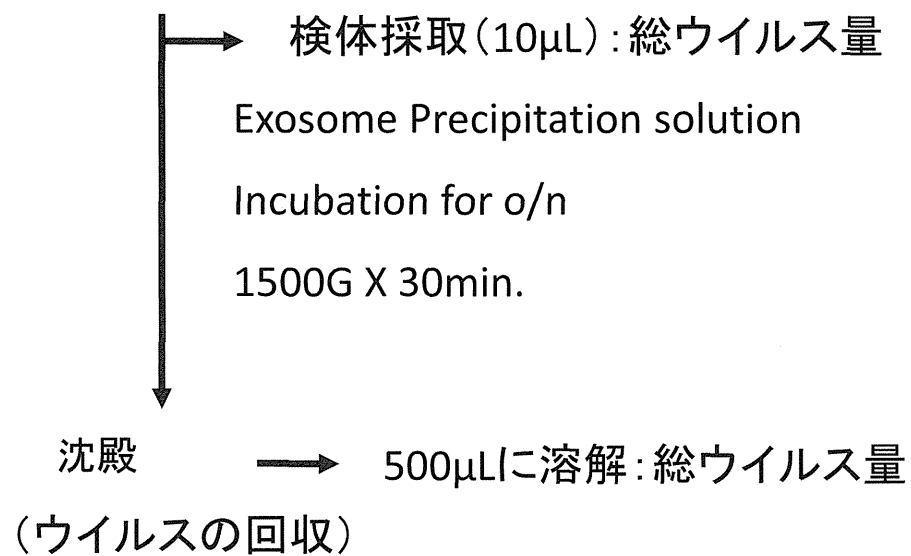


図1. アルブミン製剤からの感染性ウイルスの濃縮

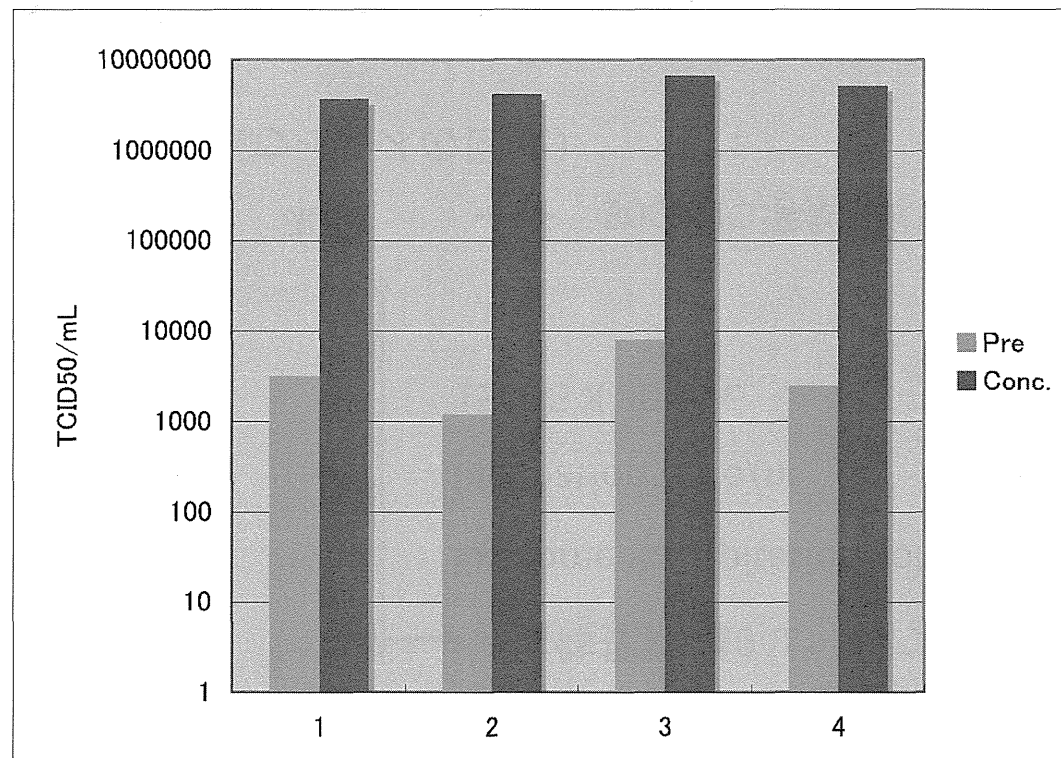


図2. エキソソーム精製試薬によるウシ下痢症ウイルスの濃縮