

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  
（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業））

分担研究報告書

血液製剤による Leishmania 感染予防のための開発

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

Leishmania 原虫は、世界に広く分布し、約 15 種がヒトに病原性を有していると言われ不顕性感染も存在する。そのため地中海沿岸諸国では輸血や臓器移植による感染例が報告されている。しかし、我が国では馴染みが薄い感染症であるため、現行の製法で作られた血液製剤がどれくらいリスクがあるのか解析されていない。これを明らかにするために今年度は、1) ユニバーサルに Leishmania を検出できるプライマーの作成を検討し、kinetoplast DNA が原虫当り複数コピー存在することから検出には適していると考えられた。2) 輸血用血液製剤中での Leishmania の鞭毛型原虫の生存率を解析した。全血の 4 保存では、3 週間で約 2 Log、5 % アルブミン液の室温保存では 7 日間で約 2 Log 生存率は減少した。ヒトの体内では無鞭毛型で存在することから鞭毛型と生存率が異なる可能性があり、来年度は無鞭毛型で検討したい。

A. 研究目的

Leishmania は、主にアフリカ北部、地中海沿岸、中東、西アジア、南米に広く分布している原虫である。サシチョウバエ (sandfly) と呼ばれる蚊帳を通り抜けられる程小さい「ハエ」によって媒介される。世界 88 カ国に 1200 万人の感染者がいると推定されている。不顕性感染が存在することは知られており、これまで輸血や臓器移植によって感染した報告がある。日本では、輸入感染症として報告はあるが、ほとんど知られていない。日本において現行の製造法（白血球除去や保存温度）で製造された血液製剤にどの程度のリスクがあるのか明らかにすることを目的とした。今年度は、検出法と血液製剤中での Leishmania 原虫の生存率を検討した。

B. 研究方法

(1) Leishmania 原虫の培養法

長崎大学熱帯医学研究所 NEKKEN NBRP (ナショナルバイオリソースプロジェクト) から L.donovani と L.amasonensis を購入し、シヨウジョウバエ細胞培養液に最終濃度が 10% になるように牛胎児血清を添加して 25℃、炭酸ガス濃度 5% で培養した。原虫の数は、顕微鏡下に細胞計算盤で数えた。

(2) Leishmania 原虫の PCR による検出

文献から Leishmania 原虫の PCR による検出法を検索し、マルチコピー存在する遺伝子を標的としたプライマーを作成した。リボソーマル遺伝子 (Eur.J.Clin.Microbiol Infect Dis. Vol.30.209-218,2011) と kinetoplast

DNA(Clin. Infect. Dis. vol. 37. 149-153. 2003) を増幅するプライマーを作成し、PCR を実施した。核酸は、2 種の Leishmania 原虫をそれぞれ  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10、3 個に調整し、DNA を抽出した。溶出した 1/3 の核酸を PCR に添加し 32 サイクルの増幅を行なった。検出はゲルを用いた電気泳動で増幅産物の有無で行なった。

### (3) 血液製剤中での生存率の解析

鞭毛型原虫を  $10^8$  匹/mL に調整し、全血(4 保存)、5%アルブミン(室温：血小板製剤を想定)に添加し、全血は経時的にサンプリングしながら最長 4 週間、5%アルブミンは最長 7 日間保存した。経時的に採取した検体は、ショウジョウバエ細胞培養液を用いて 10 倍ずつ段階希釈した。25℃、CO<sub>2</sub>5%で 2 週間培養し、増殖してくる原虫の有無を顕微鏡下に観察した。各希釈で観察できたウエル数を用いてウイルス感染価と同様に TCID<sub>50</sub> を計算し、生存していた原虫数とした。

### (4) 変異型 CJD 発生動向

変異型 CJD の発生状況を英国と WHO の CJD サーベイランスから経時的に評価した。

## C. 研究結果

### (1) Leishmania 原虫の PCR による検出

文献から 3 組(2 組はリボゾーム遺伝子を検出)のプライマーを選択肢、L. donovani と L. amazonensis の検出を行なった。図 1 に示すように ribosomal DNA に比べて kinetoplast DNA の方が高感度であり、原虫 3 匹からでも陽性となった。

### (2) 血液製剤中での Leishmania 生存率の解析

血小板を想定した 5%アルブミンでの生存率

は、経時的に減少したが、7 日目で約 2Log 減少であった。赤血球を想定した全血の 4 保存では現在の有効期間である 3 週間後は、室温保存のアルブミンと同様に約 2Log 減少した(図 2)。

### (3) 変異型 CJD 発生動向

図 3 に年度毎の患者数(死亡者数)を示した。2012 年から 3 年間に英国では 1 名、フランスでは 2012 年に 2 名感染者の報告があったが、それ以後の発生はなかった。2000 年に発生のピークがあり、第 2 次の発生ピークが危惧されているがその兆候は認められなかった。

## D. 考察

Leishmania 原虫症は、世界に広く分布するものの日本では馴染みが薄い感染症である。地中海沿岸やインド、南米に存在することから旅行者や長期滞在者、さらに在日している感染国出身の人から日本に持ち込まれる可能性がある。しかし、ベクターが存在しないので輸血や臓器移植を介した感染が問題となる。献血者に中に感染者が非常に少ないと考えられることから現在の血液製剤の製法や保存方法によってどの程度除去されたり死滅するのかを検討することにした。今回は、鞭毛を有する鞭毛型原虫を用いて生存率を解析したが、実際の人の感染では原虫は単球の中に無鞭毛型原虫として存在している。そのため来年度は、無鞭毛型原虫を用いた解析を予定している。そのための鞭毛型から無鞭毛型に分化させる方法の検討、及び無鞭毛型の原虫数の測定法について検討を行なっている。

人体内では単球に存在していることから白血球

除去膜による除去が有効と考えられ、来年度は無鞭毛型原虫を用いて除去効果も検討する予定でいる。

変異型 CJD は牛の管理が適切に実施されたことから 2000 年を境に感染者数は激減した。2 次的なピークが危惧されているが、いまのところその兆候は認められていない。摘出された虫垂検体を用いた疫学調査では未発症の感染者が存在しているとの報告もあり今後も発生数の推移に注意する必要がある。

#### E. 結論

輸血による Leishmania 感染症を防止するために Leishmania 遺伝子の検出法を検討し、kineto-plast DNA が適していることを明らかにした。また、鞭毛型原虫の血液製剤中での生存率を検討し、血液の保存中に 2Log 程度減少することを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 鈴木雅之、青木麻衣子、加藤光洋、玉栄建次、内野富美子、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭：同種骨移植のための骨保管支援業務の現状、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良
- 2) 岡田義昭、小林清子、池淵研二：リアルタイム RT-PCR を用いた B19-RNA 定量による B19 感染評

価系の開発、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良

3) 山田攻、加藤光洋、鈴木雅之、内野富美子、小林清子、池淵研二、岡田義昭

：当院における産婦人科緊急輸血症例の分析とその対策、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし