

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政策研究事業  
分担研究報告書

輸血血液におけるデングウイルスおよびHTLV-2の検出法開発に関する研究

研究分担者 大隈 和 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長)

研究要旨：輸血用血液を含む血液製剤は、ヒトの血液を原料とするためウイルス等の病原体混入のリスクが存在する。一方本邦で製造される血液製剤は、抗体検査やNATなど極めて精度の高い方法によって病原体スクリーニングが実施され、その安全性が担保されてきた。しかしながら、新興・再興感染症の原因ウイルス等に対する検査体制については十分な整備がなされておらず、日本国内への移入に備え早急な対応が求められている。特に、デング熱の原因となるデングウイルスは昨年約70年ぶりに国内感染が確認され、今後も感染の拡大及び血液製剤への混入が危惧されている。血液製剤の安全性を確保するためには原料血漿や血液製剤などに微量に混入した病原体を高感度に検出できる方法が不可欠であるが、現存の検査系においては感度が不十分であり改善が必要であった。そこで本研究では、血液製剤の安全性評価への適用を想定し、マルチプレックスPCR法を用いたデングウイルスの新規高感度検出系を確立した。本年度は特にデングウイルスの検出法開発を優先的に推し進め、HTLV-2の検出法開発は昨年の研究を継続した。

研究協力者

倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部  
研究員  
手塚健太 国立感染症研究所 血液・安全性研究部  
任期付研究員  
浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部  
部長  
高崎智彦 国立感染症研究所 ウイルス第一部  
室長

A. 研究目的

血液製剤の安全性を担保する上で、病原体の混入を防止及び製造過程より排除することは極めて重要な課題である。国内の献血血液に対して日本赤十字社でこれまでにHBV, HCV, HIV等々の様々な病原体に対して高感度なスクリーニング検査を実施しており、本邦における血液製剤のこれらの病原体に対する安全性は極めて高く管理されている。しかしながら、海外への渡航者などを介して、本来は国内に存在しなかった病原体の輸入症例が増加しており、新規感染症の本邦での定着が危惧されている。実際、デング熱やデング出血熱の原因となるデングウイルス(DENV)においては、約70年ぶりに東京を中心として国内感染事例が発生した。DENVの感染者は無症候である場合も多く、献血血液を介したDENVの血液製剤への混入を検出し、感染の拡大を未然に防止する高感度検査法が必要である。

これまで、国立感染症研究所においてDENVの輸

入症例等に対して依頼検査を行ってきたが、DENV核酸検査に用いられるPrimer及びProbeセットが、献血血液や血液製剤の原料血漿などに混入したDENVを高感度に検出可能であるかについてはこれまで十分に検討されていなかった。血液製剤の製造過程で大幅に希釈されると想定されるDENVを検出するためには、極めて高感度な検出法が必要であり、既存の手法を再検討・改善する必要があると考えられる。

そこで本研究においては、デングウイルス各血清型のRT-PCR用Primer及びProbeを大規模スクリーニングすることにより、新規高感度Primer及びProbeを同定し、これらのPrimer及びProbeを用いて検出系を最適化した後、全血清型の高感度同時検出が可能な新規マルチプレックスPCR法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

・DENV特異的Primer及びProbeの大規模スクリーニング

Primer Express ver3ソフトウェア(Life Technologies)を使いPrimer及びProbeを設計した。PrimerのスクリーニングにはSYBR Green PCR Master Mixの推奨プロトコルに従い、Probe(FAM標識)のスクリーニングにはRNAtc One-Step RT-PCRキットの推奨プロトコルに従って、real-time RT-PCRを行った。各血清型で最も効率良くPCRが実施されるオリゴセットを同定した。

・DENVゲノムRNAの精製

Vero細胞で増やした培養上清中のDENVゲノムRNAは、QIASymphony DSP virus/pathogen kitを用いて、QIASymphonyにプログラムされた抽出プロトコルで抽出した。

・新規マルチプレックスPCR検出系の構築

マルチプレックスPCR法は、同定したPrimer及びProbeを用い、QuantiTect Multiplex RT-PCR kitの推奨プロトコルに従い検討・実施された。各血清型のProbeはそれぞれ異なる蛍光色素で標識した(DENV-1: FAM, DENV-2: VIC, DENV-3: NED, DENV-4: Cy5)。

C. 研究結果

・DENV特異的高感度Primer及びProbeの同定

DENV-1, 2, 3, 4の各血清型について、ForwardおよびReverse Primerセットをそれぞれ108, 80, 72, 71セット(合計約350セット)を設計した。SYBR Greenを用いたreal-time RT-PCRの結果、各血清型についてそれぞれ17, 14, 18, 18セットの優良なPrimerセットを同定した。同定したPrimerセットについて、Taqman MGB Probeを設計した。それぞれの血清型について11~13セットのProbeを準備し、同じ分離株を用いてTaqman PCRを行った。その結果、各3~4セットのプロープが極めて優れた増幅を示した。さらに、同定したPrimer及びProbeを用いて、国立感染症研究所ウイルス第一部で解析された輸入症例の核酸(全52株)を検体として、各オリゴセットの検出能を検討した。その結果、最も検出域、感度、特異性に優れると考えられる各オリゴセットの組み合わせを決定した。

・マルチプレックスPCRによる4血清型の同時検出

DENVは4つの血清型が存在するため、DENVの検出及び血清型判別のためには、これまで数回のPCR反応が必要であった。しかし、1回のPCR反応で全ての血清型が検出可能であれば、コスト面の改善や煩雑な作業が簡略化されることでコンタミネーションのリスクも低下し、より有用性が高まると期待される。そこで、今回同定した新規オリゴセットを用いて、マルチプレックスPCR法による新規DENV検出系の構築を試みた。QuantiTect Multiplex RT-PCR kitと同定したオリゴセットを用いてマルチプレックスPCR反応を実施したところ、非特異的な反応が見られず、かつ異なる蛍光色素で標識された各血清型に特異的なシグナルの検出が可能であった(Figure 1)。また、DENV臨床分離株を鋳型として各血清型のシングルプレックスPCRとマルチプレックスPCRの検出感度を比較したところ、2つの検出系は各血清型において同等のCt値を示した(Table 1)。さらに、DENV以外の種々の核酸を鋳型として検討したところ、非特異的な反応は見られなかった。

以上のことから、構築した新規マルチプレックス

PCR法は、感度・特異性共にシングルプレックスPCRと同等であり、かつ1反応当たりのコストが低く、より簡便で有用な手法であると考えられた。

Serotype	Strain	Ct value	
		Singleplex	Multiplex
DENV-1	01-44	27.2	27.3
DENV-2	12-26	26.2	26.6
DENV-3	00-40	25.9	26.1
DENV-4	08-11	26.0	27.1

Table 1. シングルプレックスとマルチプレックスPCRの比較

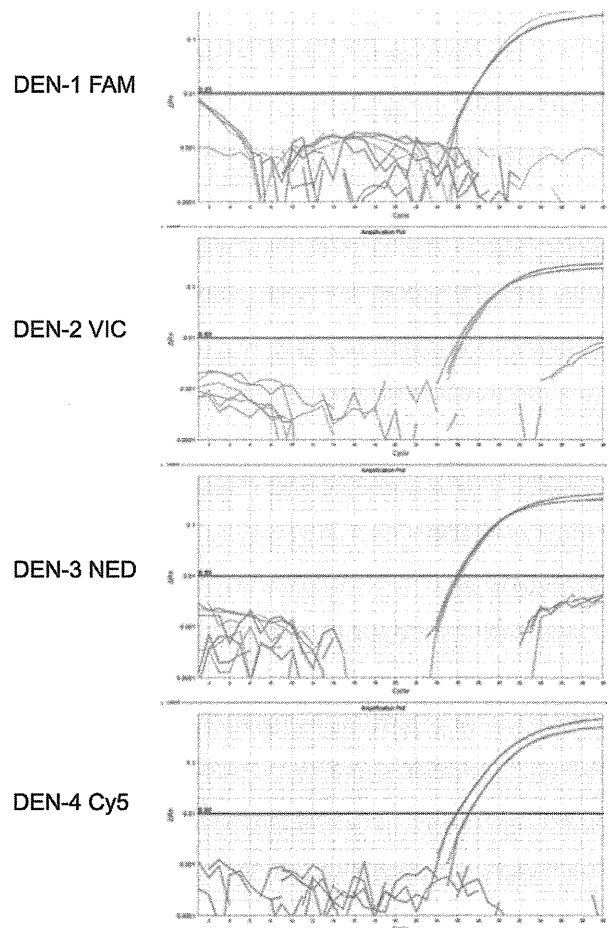


Figure 1. 各血清型におけるマルチプレックスPCRの特異性

D. 考察

DENVは昨年の8月に約70年ぶりに国内感染例が発生し、当該ウイルスに対する血液製剤の安全性確保は喫緊の課題となった。

本研究では、DENV特異的なPrimer及びProbeの大規模スクリーニングによって、多数の新規オリゴセットを得ることが出来た。これらのオリゴセットの中から、さらにDENVの臨床分離株を用いて選

定を行うことで、感度・特異性そして検出域の非常に優れたオリゴセットを同定した。

国立感染症研究所を中心に、これまで DENV の検査・検出に用いられてきた PCR 法は主にシングルプレックス PCR 法であったが、DENV は 4 つの血清型が存在するために複数の PCR が要求されるなどアッセイ系が煩雑になっていた。本研究においては、1 反応の PCR で全ての血清型を高感度・特異的に検出するマルチプレックス PCR 法の確立に成功した。この新規手法は、アッセイ当たりの実質コストが半減以下になるだけでなく、簡便で、かつこれまでの手法よりも高感度であると考えられた。今後は、血液製剤や原料血漿などにおいて、微量な DENV の混入をスクリーニングする手法として有用と考えられ、血液製剤の安全性確保に寄与することが期待される。

さらに、今回の研究で確立した Primer 及び Probe の大規模スクリーニング、その後の高感度マルチプレックス PCR 法の確立は、DENV に限らず多くの病原体についても応用可能であると考えられる。新興・再興感染症など、検査法の十分な検討が進んでいない分野について、画期的な手法を提供する可能性がある。

#### E. 結論

本研究により、DENV 全血清型特異的な高感度マルチプレックス PCR 法を確立した。本検査法は、特にこれまで困難であった血液中の微量な DENV の検出に有用であり、献血血液などのスクリーニングに適していると考えられる。本検査法の開発は、今後の血液製剤の安全性確保に繋がることを期待される。

#### 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

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特願 2015-215906

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

分担研究報告書

輸血用血液製剤における *Trypanosoma cruzi* 原虫の動態

研究代表者 倉根一郎 (国立感染症研究所 所長)  
研究協力者 佐竹正博 (日本赤十字社中央血液研究所 所長)  
佐山勇輔 (日本赤十字社中央血液研究所)  
松本千恵子 (日本赤十字社中央血液研究所)

研究要旨

シャーガス病は、*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) 原虫の感染により引き起こされる疾患であり、主にラテンアメリカで流行している。感染者(キャリア)では、末梢血や臓器に原虫が存在するため、輸血や移植などにより患者に *T. cruzi* が伝播される可能性がある。シャーガス病非流行国において、輸血を介した *T. cruzi* 感染例の主な原因製剤は、血小板製剤である。本研究において、これまで輸血用血液製剤(血小板製剤および血漿製剤)に *T. cruzi* を接種して各輸血用血液製剤中の *T. cruzi* の動態を解析してきた。今回、(1)白血球除去(白除)フィルターの *T. cruzi* の低減化能、(2)赤血球製剤中での *T. cruzi* の動態、さらに(3)低温環境下での *T. cruzi* の増殖性および感染性を解析した。白除フィルターにより、増殖可能な *T. cruzi* は 4 Log 程度の減少が認められた。赤血球製剤中では、増殖可能な *T. cruzi* は、接種 4 日目から 1~2 Log 程度減少し、21 日目では 2~4 Log の減少が認められたが、減少幅にはばらつきが認められた。低温環境下(4℃)にて培養した *T. cruzi* は増殖が認められず、特に 4 日目から amastigotes の減少が認められ 14 日目では検出限界以下となり、感染性も低下していることが考えられた。本邦で使用されている白除フィルターには、*T. cruzi* を低減化させる効果が認められ、さらに赤血球製剤中では、その保管環境により増殖性および感染性が低下し、赤血球製剤による *T. cruzi* 感染のリスクは低いことが示唆された。

A. 研究目的

シャーガス病は *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) により引き起こされる原虫疾患である。主に、中南米地域で流行している。ヒトへの感染は、サシガメおよび汚染された食品による感染の他、キャリアからの垂直感染および輸血・臓器移植による感染がある。

輸血による感染は、これまでシャーガス病非流行国であるアメリカ、カナダ、スペイン

において、これまで 20 例が同定されている。

その原因となった輸血用血液製剤のほとんどは血小板製剤であり、血漿製剤および赤血球製剤からの輸血を介した伝播は認められていない。しかしながら、保管条件や組成成分の異なる血漿および赤血球製剤の保管中の *T. cruzi* の動態を詳細に解析した報告は少なく、これらの製剤の感染性については不明である。さらに、国内で使用されている白

血球除去(白除)フィルターの有効性は不明である。

そこで本研究では、輸血用血液製剤へ *T. cruzi* を接種し、白除フィルターの低減化能および通常の保管状態における赤血球製剤の *T. cruzi* の動態を解析した。

## B. 研究方法

### (1) *T. cruzi*原虫

*T. cruzi*は、中南米出身キャリアから分離した①JRC Tc-1 (DTUs TcV)および②JRC Tc-2 (DTUs TcII)を用いた。各*T. cruzi*は、Schneider's Drosophila Mediumに最終濃度が30%になるようにFBSを添加し、25°Cで培養した。原虫数は、顕微鏡下にて細胞計算盤により計測した。

### (2) 白除フィルターによる低減化能の解析

白除フィルターは、セパセル・インテグラ CA(旭化成メディカル)を用いた。培養した *T. cruzi* ( $10^8$  parasites/Bag) を採血翌日の3名の異なる献血者由来の全血製剤に接種し、白除フィルター前後の血液を一部採取した。採取した血液は、QIASymphony DNA MIDI Kit(QIAGEN)を用い、DNAを抽出後、*T. cruzi* 核タンパク質DNAをターゲットとしたプライマー・プローブを用い、qPCRにより *T. cruzi* 量を計測した。また、*T. cruzi* 混入による白血球除去能への影響をみるため、CD81 DNAをターゲットとしたプライマー・プローブを用い白血球数をqPCRにより計測した。培養は、採取した血液を培養液にて段階希釈後培養を行い、最大50日間観察し、顕微鏡下で*T. cruzi*の活動が確認されたものを陽性とした。

### (3) 赤血球製剤における *T. cruzi* の動態解析

輸血用血液製剤は異なる3名の献血者由

来の赤血球液を用いた。培養した *T. cruzi* を各製剤へ接種 ( $10^8$  parasites/Bag) 後、4°Cにて保管をおこなった。接種後0, 4, 7, 14, 21日経過時にそれぞれ一部採取したサンプルを段階希釈後、培養を行った。培養は、(2)と同様の方法でおこなった。

### (4) 低温環境下における *T. cruzi* の増殖性および感染性の評価

培地に *T. cruzi* ( $10,000$  parasites) を接種し、25°Cおよび4°Cにて培養をおこなった。接種後0, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42日経過時にそれぞれ一部採取し、qPCRによる *T. cruzi* 量の測定および感染性を評価した。感染性の評価は、採取した *T. cruzi* を段階希釈後、MRC-5細胞(ヒト線維芽細胞、ATCC)に接種し、37°Cにて培養を行った。7日後に細胞を固定後、間接蛍光抗体法により amastigotes の観察を行った。

## C. 研究結果

### (1) 白除フィルターによる *T. cruzi* の除去

qPCRによる *T. cruzi* 量では、JRC Tc-1 および JRC Tc-2 は、それぞれ2および3 log 程度の減少が認められた(図 1A)。また、白除フィルター通過後における増殖可能な *T. cruzi* は、両株とも4 Log 以上減少し、検出限界以下であった。*T. cruzi* 混入により白血球除去能が低下することはなかった(図 1B)。

### (2) 赤血球製剤における *T. cruzi* の動態

赤血球液中での再増殖可能な *T. cruzi* 数は、JRC Tc-2 Bag#3 を除き4日目以降から減少が認められ、21日目には2~4 Log 程度の減少が確認された(図 2)。JRC Tc-2 Bag#3 は、14日目まで *T. cruzi* の減少は認められなかった。赤血球液の有効期間内で

ある 21 日では、いずれの赤血球液においても増殖可能な *T. cruzi* が確認された。

#### (3) 低温環境下での *T. cruzi* の増殖性および感染性

25°C で培養を行った *T. cruzi* は、時間の経過と共に増殖が認められたが、4°C では *T. cruzi* の増殖は認められなかった (図 3)。同様に 25°C で培養を行った *T. cruzi* では、amastigotes の増殖が認められたが、4°C での *T. cruzi* は、4 日目から amastigotes の減少が認められ、14 日目以降では検出限界以下であった。両株とも同様の結果であった。

#### D. 考察

白除フィルターにより *T. cruzi* は、2~3 Log 程度の減少が認められ、さらに培養による再増殖可能な *T. cruzi* は、4 Log 以上の減少が認められた。これはフィルターがそのトラップ能によって *T. cruzi* を低減化するだけでなく、*T. cruzi* の増殖にも影響を与えていることを示唆するが、詳細は不明である。

また、赤血球製剤は低温 (2~6°C) に保管されているため、今回赤血球液中における *T. cruzi* の動態だけでなく低温環境下 (4°C) での *T. cruzi* の増殖性および感染性を評価した。その結果、赤血球液中での *T. cruzi* は、製剤有効期限である 21 日目においても 2~4 Log 程度の減少を示すだけであったが、低温環境下にて *T. cruzi* を培養すると *T. cruzi* の増殖は認められず、さらに感受性細胞への感染性が低下することが示された。これにより、これまで非流行地域における赤血球製剤を介した *T. cruzi* 感染が認められていないのは、低温保存条件により感染性が低下している

ことが一因であると考えられた。

これまで非流行地域での血液製剤を介した *T. cruzi* 感染においては、血漿製剤および赤血球製剤による感染は認められていない。昨年度の本研究において血漿製剤中における *T. cruzi* は、一度の凍結融解により 5 Log 以上減少し、検出限界以下となることを報告した。さらに本年度の研究にて、白除フィルターによる *T. cruzi* のトラップ能および増殖能の減少、そして赤血球製剤の低温保存による増殖可能な *T. cruzi* の減少および感染性の低下が認められたことから、本邦にて製造される全血採血由来輸血用血液製剤を介した *T. cruzi* の感染は、非常に低いリスクであると考えられた。

#### E. 結論

白除フィルターにより *T. cruzi* の低減化が認められた。赤血球液中では、*T. cruzi* は保管期間中に増殖可能な *T. cruzi* が認められたが、低温環境下に保管することでその増殖性および感染性が減少することから赤血球液による *T. cruzi* の感染リスクは低いことが示唆された。

#### 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

###### 国内学会

1. 佐山勇輔、松本千恵子、三浦左千夫、  
 瀧崎晶宏、内田茂治、佐竹正博、田所

憲治．輸血用血液製剤における  
*Trypanosoma cruzi* (シャーガス病)の  
動態．第63回日本輸血・細胞治療学  
会総会．2015年5月28日-30日(東京  
都)

2. 佐山勇輔、山岸尚仁、松本千恵子、内  
田茂治、永井正、佐竹正博：輸血用血  
液製剤における製造および保存条件  
による *Trypanosoma cruzi* (シャーガ  
ス病)の動態．－白血球除去フィルタ  
ーおよび赤血球製剤を中心に－．第64  
回日本輸血・細胞治療学会総会．2016  
年4月28日-30日(京都市)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

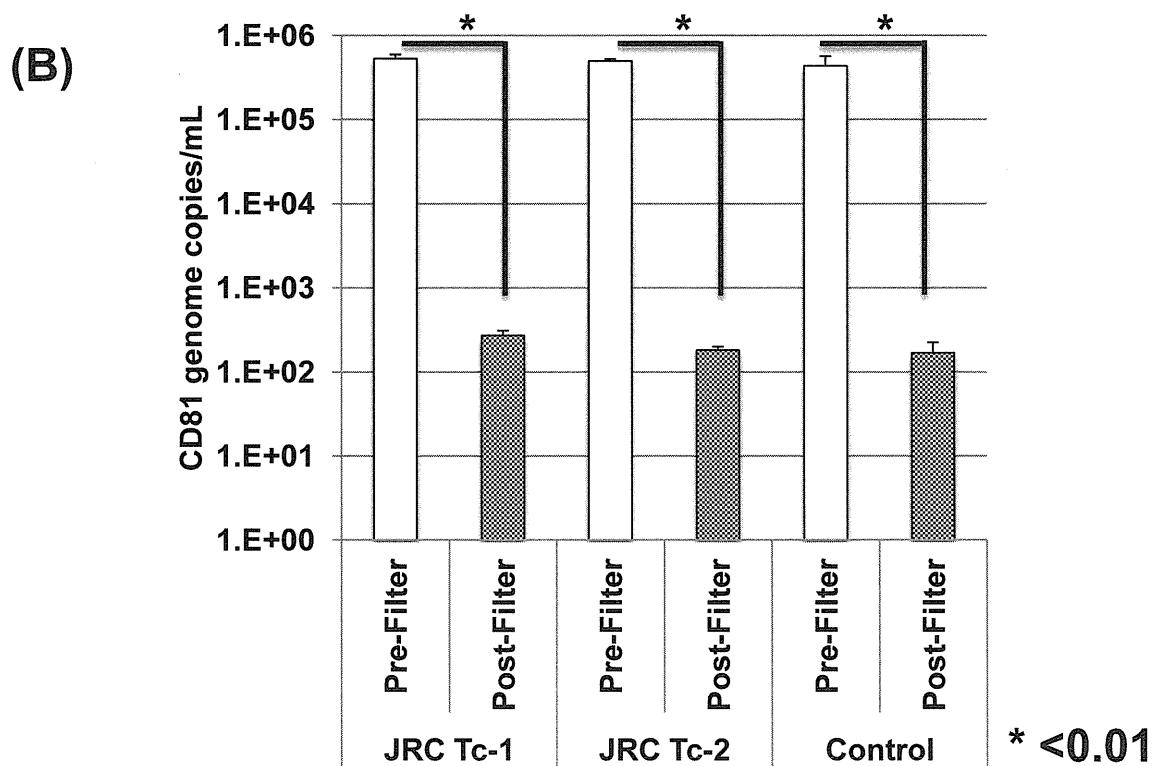
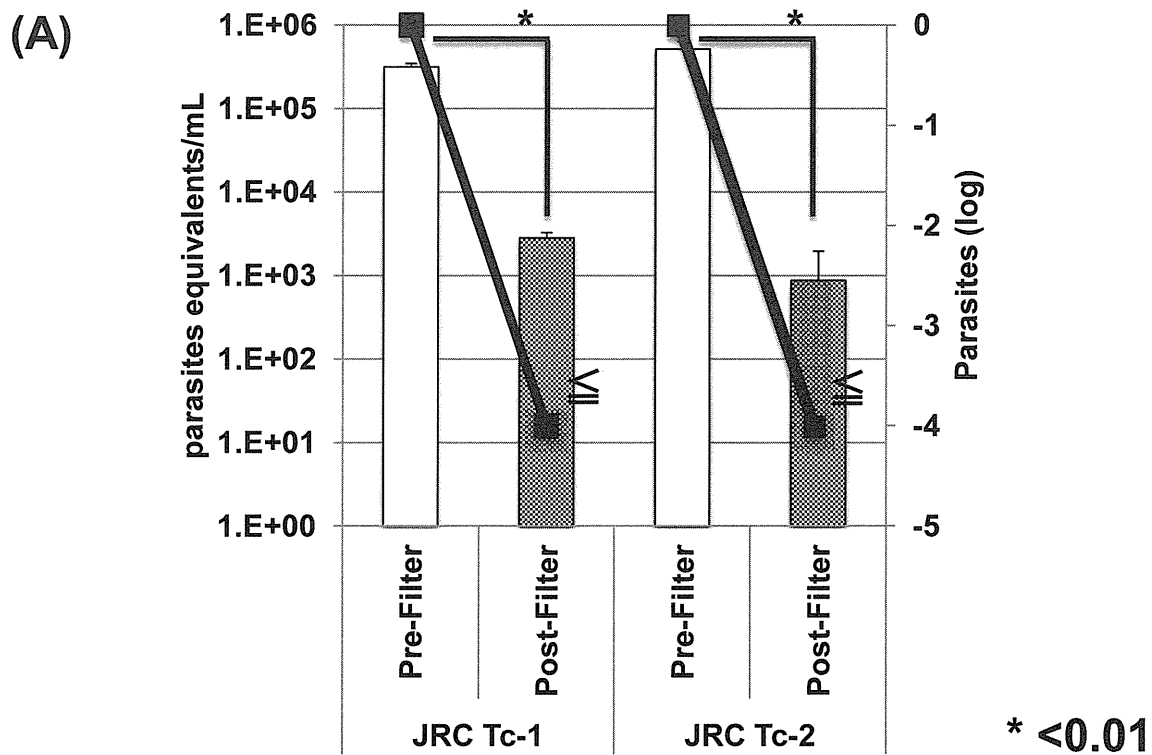


図1. 白除フィルターによる *T. cruzi* (A) および CD81 による白血球数の推移 (B)



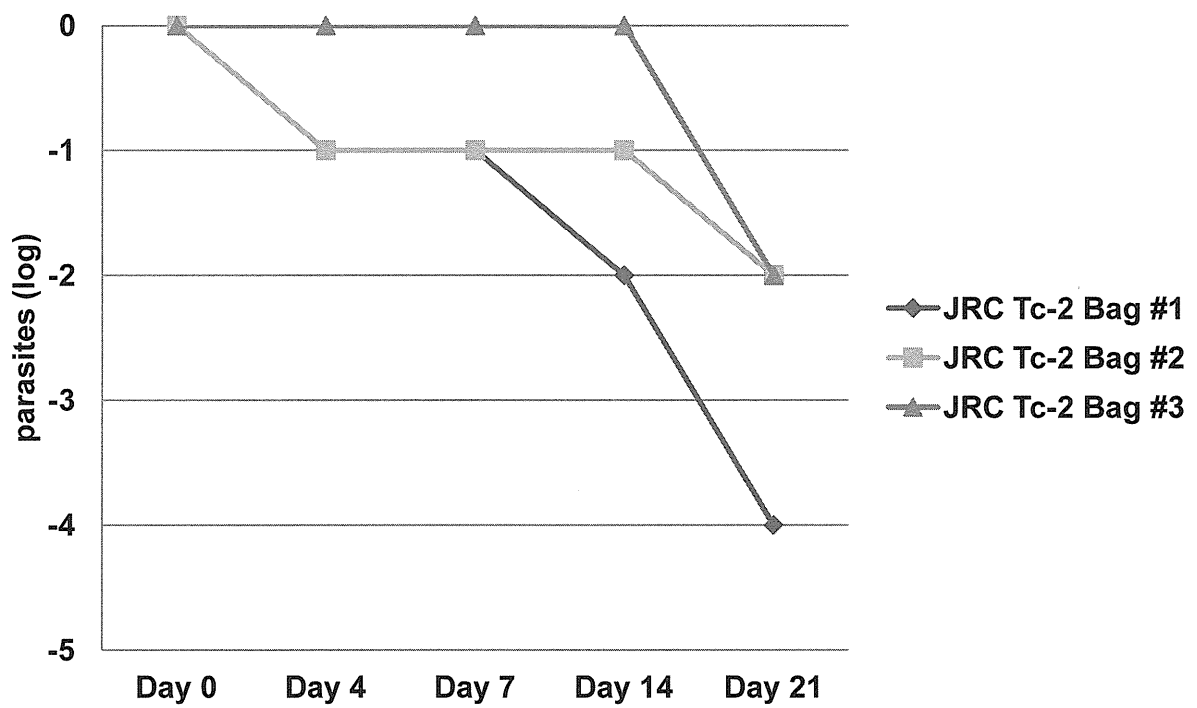
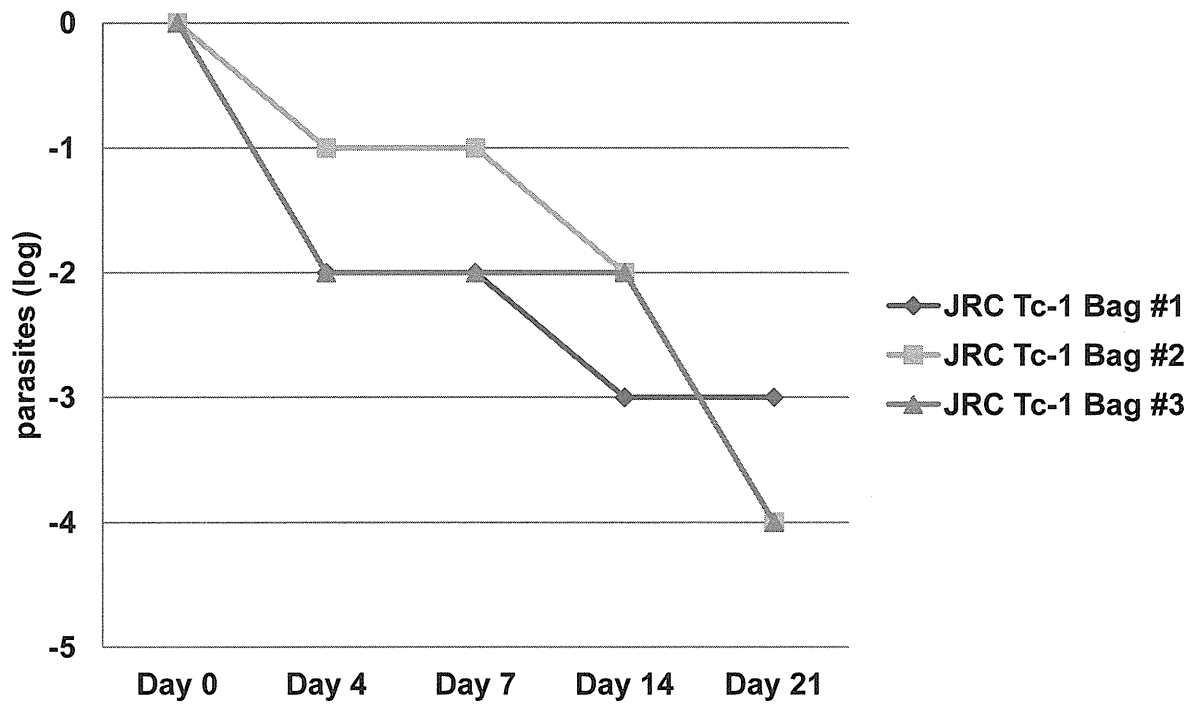


図2. 赤血球液中における*T.cruzi*の動態

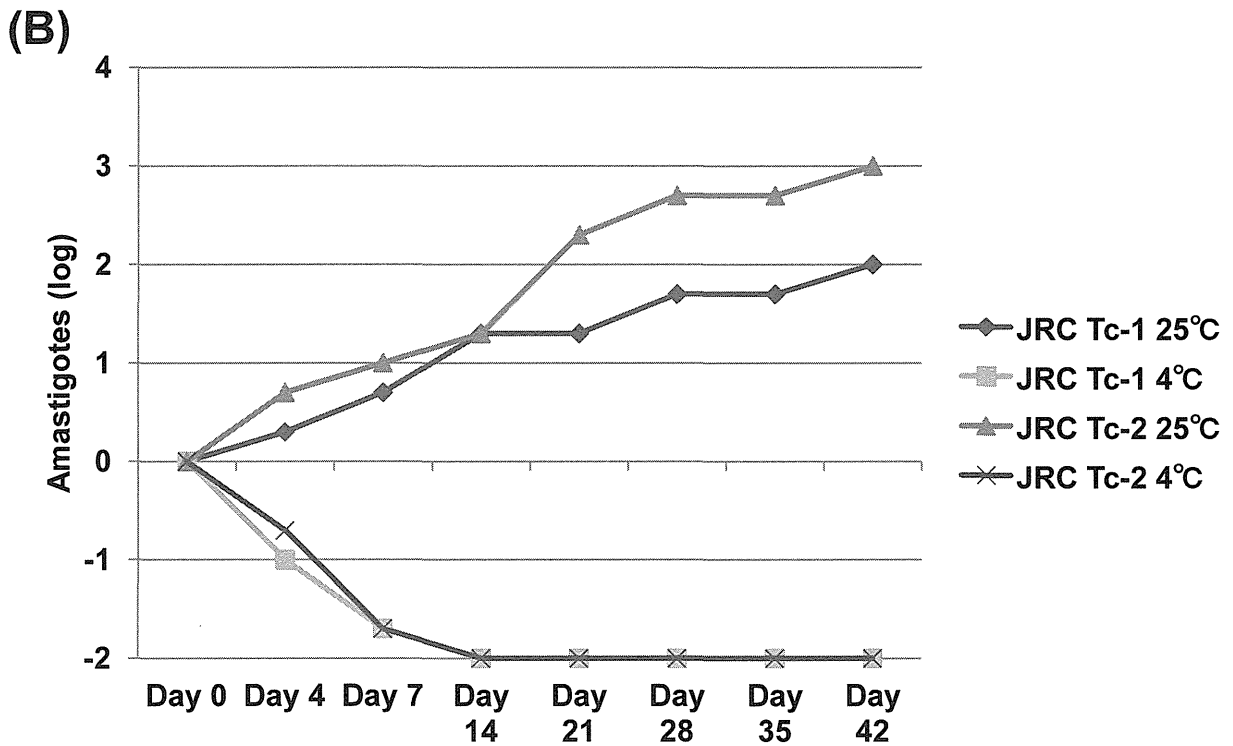
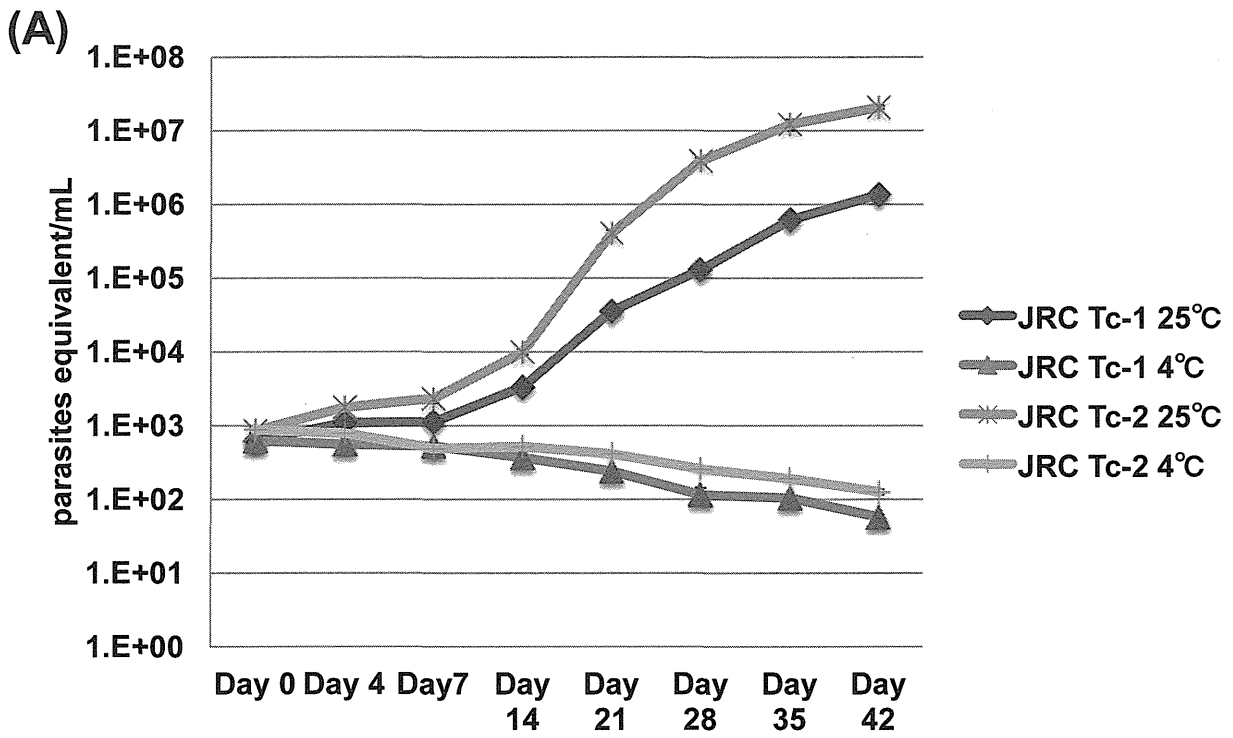


図3. 低温環境下における*T.cruzi*の増殖性および感染性

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
五十嵐郁男	バベシア症	木村哲、木田宏	人獣共通感染症（改訂3版）	医薬ジャーナル社	大阪	2016	430-434

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Terkawi MA, Cao S, Herbas MS, Nishimura M, Li Y, Moumouni PF, Pyarokhil AH, Kondoh D, Kitamura N, Nishikawa Y, Kato K, Yokoyama N, Zhou J, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X	Macrophages are the determinant of resistance to and outcome of nonlethal Babesia microti infection in mice	Infection and Immunity	83(1)	8-16	2015
Tuvshintulga B, Sivakumar T, Battsetseg B, Narantsatsaral SO, Enkhtaivan B, Battur B, Hayashida K, Okubo K, Ishizaki T, Inoue N, Igarashi I, Yokoyama N	The PCR detection and phylogenetic characterization of Babesia microti in questing ticks in Mongolia.	Parasitology International	64(6)	527-532	2015

