

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

血液製剤による Leishmania 感染予防のための研究

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。我が国には存在しないが、海外から持ち込まれ輸血用血液製剤に混入した場合のリスクを解析した。マクロファージ様細胞に分化させた TPH 細胞株に鞭毛型 Leishmania を感染させ無鞭毛型原虫を得た。これを血漿に添加し、4℃、室温、-20℃ の各温度で保存し、生存率を解析した。4℃、3 週間保存で約 2 Log 感染価が低下した。一方、-20℃ では生存は確認できなかった。また、白血球除去フィルターを用いて除去するとアルブミン液では 5Log、血漿では、4Log の除去が認められた。白血球除去フィルターがヒト血中に存在する Leishmania 原虫を除去するために非常に有効であることが示唆された。

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。不顕性感染の献血者が献血した場合に現行の製法（白血球除去や保存温度）で製造された血液製剤の感染リスクを明らかにすることを目的とした。Leishmania 原虫は、マクロファージに主に感

染することから白血球除去フィルターが感染防御に有用であるとの報告があるが、詳細に解析した報告はない。

B. 研究方法

(1) Leishmania の無鞭毛型原虫の培養法

Leishmania donovani (以下 L. donovani と略) は 10% FCS 添加 ショウジョウバエ細胞培養液 で 25℃、炭酸ガス濃度 5% で培養した。この条件では鞭毛型原虫が増殖する。ヒト単球細胞株である THP-1 にホルボールエステルを最終濃度 100nM になるように添加し、24 時間 37℃ で培養し、マクロファージ様細胞株を誘導した。これに MOI 10~20 になるように鞭毛型原虫を添加し、37

で培養した。感染1日後と3日後に培養液を交換し、鞭毛型原虫を取り除いた。感染5日後に THP-1 細胞と cell - free の無鞭毛型原虫を集めた。

(2)血液製剤中での生存率の解析

感染させた THP-1 細胞と cell-free の無鞭毛型原虫をヒト血漿に添加し、赤血球製剤を想定して 4 で4週間保存、血小板を想定して室温で1週間保存、新鮮凍結血漿を想定して -20 で2ヶ月冷凍保存した、その間に経時的に検体採取して L.donovani 原虫の生存率を検討した。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、25℃、CO₂5%で4週間培養後増殖してくる鞭毛型原虫の有無を顕微鏡下に観察した。各希釈で増殖が観察できたウエル数を用いてウイルス感染価と同様に TCID₅₀を計算し、生存していた原虫数とした。

(3)白血球除去フィルターによる Leishmania 原虫の除去効果の解析

L.donovani を THP-1 に感染させ、感染後5日目の THP-1 と cell free 無鞭毛型原虫を遠心で集め、ヒト血漿 200mL に添加した。3mL を白血球除去フィルター濾過前の検体として採取した。白血球除去法は添付文書に記載された手順で実施した。白血球除去フィルター濾過後の検体は、チューブやバッグに残存したが約 185mL 回収できた。濾過検体は、1)そのまま感染価を測定、2)遠心してペレットの感染価を測定、3)100mL を遠心し、ペレットを 1mL に溶解して感染価を測定、の3つの方法で感染価を評価した。

(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。2014年のフ

ランスの発生状況は2013年度からの増加数で評価した。

C. 研究結果

(1)血液製剤中での生存率の解析

4 保存では、2週間で1Log、3週間で2Log

以上感染価は減少した。4週間では感染価は検出感度以下に減少した(図1)。-20℃保存では、評価した1~8週間の何れでも感染性は確認できなかった(図1)。室温保存では、感染価の低下は認められなかった。

(2)白血球除去フィルターによる Leishmania 原虫の除去効果の解析

白血球除去フィルター濾過前では、総感染価は 1.7×10^7 であった。濾過したそのままの検体からは感染性は確認できなかったが、100倍に濃縮した検体から感染性が検出され、濾過後の総感染価は 1.2×10^3 であった(図2)。白血球除去フィルターによる L.donovani の除去効率は約 10^4 と評価された。

(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。英国では、2012年と2014年は0名だが、2013年に1名、フランスでは2013年と2014年にそれぞれ1名感染者の報告があった。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ていない。

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

等の献血者が感染している可能性がある。発症している場合には、皮膚病変や網内系の病変によって献血の問診で献血を阻止できると考えられる。一方、無症候性感染者の場合には献血する可能性がある。地中海沿岸の国々ではこのような感染者からの輸血による感染例が報告されている。そこで現行の我が国で実施されている輸血用血液の製造や保存によって Leishmania 原虫の感染リスクがどの程度減少するのか評価することは、輸血の安全性確保の為に重要である。人体内では Leishmania 原虫は、無鞭毛型として主にマクロファージに感染し、一部は cell free で存在するとされている。今回の検討で凍結によって原虫は短時間で死滅すること、4 や室温では血液製剤の有効期間内は生存することが明らかになった。また、白血球除去フィルターは、leishmania が感染した細胞や原虫を効率良く除去できることを示すことができた。無症候性の感染者には、最大 400mL の血液中に約 2000 個の感染細胞や無鞭毛型原虫がいると推定されており、白血球除去フィルターは感染防止に非常に有効であることが示された。来年度は、赤血球製剤の白血球除去による有効性を評価する予定である。

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。フランスは英国に 6 年遅れて変異型 CJD の死亡件数がピークとなり、この 2 年間でそれぞれ 1 名の死亡例が報告されている。死亡例は、0 とはならず未発症の感染者が存在していることから疫学調査と長期的に対策を取り続ける必要がある。

E. 結論

輸血による Leishmania 感染症を防止するために保存温度における生存率を検討した。-20 では感染価は検出感度以下にまで低下したが、4 や室温では感染性が残存していた。一方、白血球除去フィルターによる Leishmania 除去効率は約 4 Log と非常に感染防止に有効であることが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

岩尾 憲明、加藤 栄史、小高 千加子、高本 滋、佐川 公矯、藤井 康彦、米村 雄士、田中 朝志、岡崎 仁、岡田 義昭、他 10名:輸血副作用サーベイランスにおける underreporting、日本輸血細胞治療学会誌、61巻、561-566、2015年

2. 学会発表

1) 山田 攻、鈴木 雅之、内野 富美子、小林 清子、池淵 研二、岡田 義昭: Polyagglutination が一過性に認められた交通外傷の一症例、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 27 年 4 月、東京

2) 池淵 研二、武内 信一、山田 攻、小林 清子、岡田 義昭: 血液保冷庫・冷凍庫用温度管理システムの提案、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 27 年 4 月、東京

3) 岡田 義昭、小林 清子、池淵 研二: パルボウイルス B19 の in vitro 感染系を用いた中和活性の測定と血漿分画製剤の原料血漿規格への応用、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 27 年 4 月、東京

4) 内田理恵子、水沢左衛子、岡田義昭、皆木隆男、高倉明子、他6名:血液製剤のウイルス安全性確保;パルボウイルス B19 DNA 参照パネルの樹立に関する共同研究、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成27年4月、東京

5) 水沢左衛子、落合雅樹、内田茂治、高倉明子、内田理恵子、山口照英、浜口功、岡田義昭:パルボウイルス B19 DNA 国内標準品作製のための共同研究、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成27年4月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし