

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（埼玉医科大学医学部 准教授）

研究要旨

Leishmania 原虫は、世界に広く分布し、輸血や臓器移植による感染例が報告されている。昨年度までの研究によって感染細胞は、白血球除去フィルターで効率良く除去できることが明らかになった。しかし、感染細胞から放出される無鞭毛型原虫が同様に白血球除去フィルターで除去できるのか明らかにされていない。そこで今年度は、無鞭毛型の培養系を確立し、白血球除去フィルターの除去効率を評価することにした。マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞や肝癌細胞株に鞭毛型 Leishmania を感染させ無鞭毛型原虫を得た。この培養液を THP-1 細胞や胚細胞癌株に添加し、26℃ で培養し鞭毛型原虫の有無で感染性を評価したが、コントロールと比較して有意な感染価は得られなかった。

また、vCJD に関する情報を集め、英国において 2016 年にプリオンの codon129 が MV 型の初めての発症者が報告された。MV 型は MM 型に比べて潜伏期が長いことが推定されており今後の発生動向に注意する情報であった。

## 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。白血球除去フィルターが感染細胞の除去に有効であることを昨年度に明らかにしたので今年度は感染細胞から放出される無鞭毛型原虫も感染細胞と同様に除去できるか評価することにした。しかし、無鞭毛型原虫の培養法は検索した範囲ではないため最初に無鞭毛型原虫の培養法の確立を重なった。また、変異型 Creutzfeldt-Jakob (vCJD) の世界的な発生状況も合わせて調査した。

## 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 添加シヨウジョウバエ細胞培養液で 26、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。また、HepG2 (肝癌細胞株)、HuH7 (肝癌細胞株)、A549 (肺癌細胞株)、NJK (絨毛癌細胞株)、VERO、NEC8 (胚細胞株)、N-TERA (胚細胞株) は無刺激で MOI 10 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、3 日、5 日後に培養液を用いて洗い、添加した鞭毛型原虫を出来るだけ除去した。感染 7 日後に各細胞株を検鏡して細胞中の無鞭毛型原虫の有無を観察した。また、これらの細胞株の培養上清約 10mL を最初に 15 $\mu$ m、次に 5 $\mu$ m のポアサイズのフィルターで濾過し、1300g で 10 分間遠心してペレットを得た。ペレットは 500 $\mu$ L の培養液で溶解した。これを 96 穴マイクロプレートに 1X から 10<sup>5</sup> まで 10 倍ずつ段階希釈し、26 にて 3 週間培養した。また、THP と NEC8 細胞を 1X10<sup>4</sup>/well ずつ 96 穴マイクロプレートに播き、同様に処理して集めた検体を 1X から 10<sup>5</sup> まで 10 倍ずつ段階希釈し、これらの細胞に添加した。37 で 5 日間培養後、26 にて 3 週間培養し、鞭毛型原虫の増殖の有無を解析した。

### (2) 変異型 CJD 発生動向

vCJD の発生状況を英国の National CJD Research & Surveillance Unit と米国 CDC の CJD サーベイランスから経時的に情報を集めた。2016 年のフランスの発生状況は 2015 年度からの増加数で評価した。

## C. 研究結果

### (1) Leishmania の無鞭毛型原虫の培養法

感染させた各種細胞株を検鏡すると THP-1 の他に HuH7 (肝癌細胞株)、A549 (肺癌細胞株)、NJK (絨毛癌細胞株)、NEC8、N-TERA (胚細胞株) の細胞質

に Leishmania の無鞭毛型原虫を観察できた。それらの上清からフィルターを使用することで感染細胞を除去し、遠心によって無鞭毛型原虫が存在すると考えられる沈殿を得た。3 週間、沈殿を溶解した溶液を 25 で培養したところ、THP-1、A549、NJK、NEC8 から鞭毛型原虫の増殖が確認できたが、いずれも原液からであり、希釈した検体からは鞭毛型原虫の増殖は認められなかった。また、沈殿から得られた検体を THP-1 や NEC8 に 37 で感染させ、その後 25 で培養した場合も原液を感染させたウエルに鞭毛型検体が確認できたが、10 以上に希釈した検体からは原虫の増殖は確認できなかった。

### (2) 変異型 CJD 発生動向

図 1 に年度毎の患者数 (死亡者数) を示す。英国では、2016 年に 1 名の死亡例が報告された。死亡数は 2000 年をピークに激減していたが、今回の 1 例の特徴は、codon129 が MV 型の初めての死亡例であった。なお、これまで英国で報告された 177 名の vCJD 発症者は、全て MM 型であった。

## D. 考察

輸血による Leishmania 感染防止に白血球除去フィルターが有用であることを昨年度報告したが、人体内では Leishmania 原虫は、マクロファージに感染し無鞭毛型になる。成書では、サシチョウバエは Leishmania が感染したマクロファージを吸血することで無鞭毛型原虫がサシチョウバエの細胞に感染して鞭毛型原虫になると記載されている。しかし、サシチョウバエが吸血する量程度の中に感染したマクロファージが存在するのか疑問が生じる。また、人体内で原虫の感染が拡大するためには、感染細胞から放出された無鞭毛型原虫が次々にマクロファージに感染することが必要と考えられる。そのため白血球除去フィルターが感染細胞だけでなく無鞭毛原虫も除去できるのか評価することは重要である。感染細胞から放出される無鞭毛型原虫を集め、26 で培養すれば鞭毛型原虫になるものと考え実験を繰り返したが増殖しなかった。そこで THP の実験と同様に無鞭毛型を 1 度細胞に感染させ、それを 26 で培養する方法に変えてみたが有意な感染性は確認できなかった。さらに感染に用いた鞭毛型原虫や感染細胞が培養上清に混入してためし試行錯誤の末、フィルターを組み合わせることによって細胞の混入を少なくすることができた。

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。vCJD の特徴として、これまで vCJD として診断され、プリオンタンパクの codon129 の多型性が解析できた死亡例は全て MM 型であったことである。英国国民の中で MM 型を示す健常人の割合は 44%、MV 型 45%、VV 型 11% であることから MM 型が vCJD に感染し、

発症しやすいと考えられてきた。動物実験から MM 型に比べ MV 型は発症まで長期間を要することが報告されているため、今回の MV 型の報告は、今後 MV 型の発症例が増加する可能性を示すものである。英国での虫垂切除検体を用いた疫学調査において、未発症の MV 型感染者が存在していることが既に分かっており、今後の発症例の動向に注意する必要がある。なお、英国は白血球除去フィルターを導入してから輸血による感染例はない（日本も導入している）。

E. 結論

輸血による Leishmania 感染症を防止するために無鞭毛型原虫の培養系の構築を目指したが目的を達成できなかった。英国の vCJD 死亡例から初めての MV 型症例が報告された。MV 型は発症まで長期間を要することから今後の発生動向に注意する必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kiyoko Nojima, Kazu Okumaa, Masaki Ochiai, Madoka Kuramitsu, Kenta Tezuka, Mieko Ishii, Sadao Ueda, Takashi Miyamoto, Koichiro Kamimura, Enki Koue, Sanae Uchida, Yoshiharu Watanabe, Yoshiaki Okada, Isao Hamaguchi : Establishment of a reference material for

standardization of the anti-complementary activity test in intravenous immunoglobulin products used in Japan: A collaborative study. Biologicals, vol.46. 68-73. 2017

2. 学会発表

- 1) 岡田義昭, 小林清子, 池淵研二: 輸血用血液製剤の保存温度や白血球除去による Leishmania 原虫の不活化及び除去効果に関する研究, 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会, 平成 28 年 4 月, 京都
- 2) 玉栄建次, 青木麻衣子, 鈴木雅之, 内野富美子, 山田攻, 松本慎二, 棚沢敬志, 小林清子, 池淵研二, 齊藤妙子, 岡田義昭: 当院における不規則性抗体陽性患者への不規則カード発行と今後の課題, 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会, 平成 28 年 4 月, 京都
- 3) 山田攻, 鈴木雅之, 内野富美, 小林清子, 池淵研二, 岡田義昭: Ko 解凍赤血球液輸血を経験した抗 Ku 保有症例, 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会, 平成 28 年 4 月, 京都
- 4) 水沢左衛子, 落合雅樹, 草川茂, 内田理恵子, 川村恵理子, 岡田 義昭, 山口照英, 浜口功: HIV-RNA 国内標準品の力価の再評価のための国内共同研究, 第 64 回日本ウイルス学会総会, 平成 28 年 10 月, 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

これはこの111人は全く129M/M

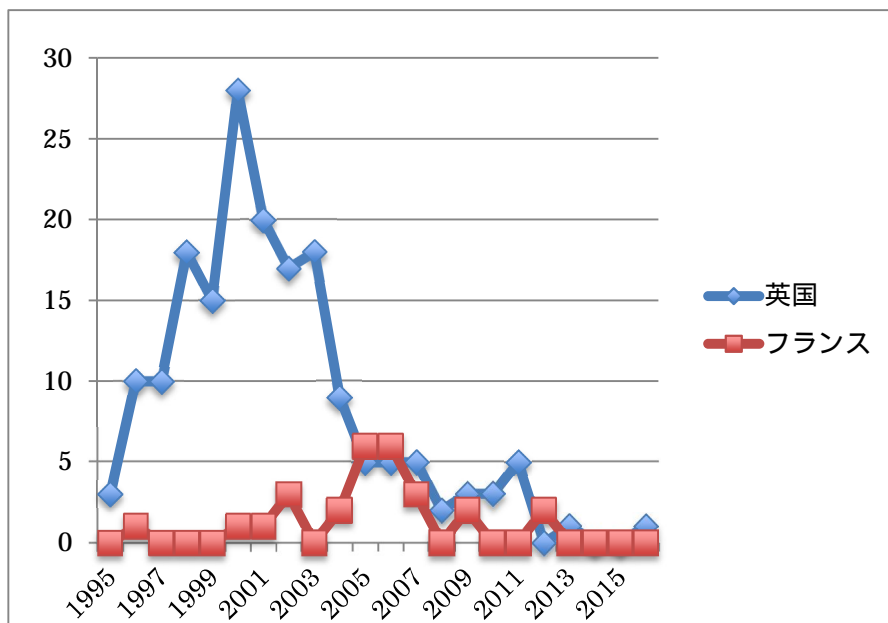


図 1 英国とフランスにおける vCJD 死亡数