

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、アフリカ、地中海沿岸、南アジア、南米など世界に広く分布し、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、海外で感染した献血者を介して輸血用血液製剤に混入する可能性がある。日本の現行の輸血用血液製剤の製造工程や保存条件が Leishmania 感染症を予防するのにどの程度有効なのか解析した。

Leishmania 原虫はヒトの体内では、無鞭毛型原虫となるためマクロファージ様細胞に分化させた TPH 細胞株に Leishmania を感染させ、無鞭毛型原虫として使用した。

1) 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。

2) Leishmania 原虫を感染させた THP 細胞をアルブミン液、ヒト血漿、全血に添加し、白血球除去フィルターを用いて除去効率を評価した。アルブミン液では 5Log、血漿では 4Log、全血では 3.6Log の除去が認められた。白血球除去フィルターは、ヒト血中に存在する Leishmania に感染した感染細胞を除去するために非常に有効であることが示された。

3) 変異型 Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) の疫学情報を集め、評価した。vCJD 発症者は激減したが、2016年に codon129 が MV 型の初めての発症例が報告された。MV 型はプリオン病の発症に長期間を要すると推定されており、今後 MV 型の発症例が増加する可能性がある。

## 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も知られており、これまで海外では、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)は、どの程度 Leishmania 原虫の感染予防効果が期待できるのか評価した。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、実験で証明した報告はごく少数しかない。

また、vCJD の発症例は 2000 年をピークに激減したが、少数ながら認められている。その一方で、未発症の vCJD 感染者の存在が予想されているため英国の National CJD Research & Surveillance Unit (NCJD-RSU) や米国の CDC から疫学情報を収集し、血液製剤に与える影響を評価した。

## B. 研究方法

### (1) Leishmania 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、CO<sub>2</sub>5% 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 TCID<sub>50</sub> 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、

5% アルブミン液とヒト血漿 200mL にそれぞれ添加した。3 mL 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 を遠心した。それぞれのペレットを 1mL に溶解して 10 倍ずつの段階希釈を行い、96 穴プレートにまいて 25 で 4 週間培養し、鞭毛型原虫の増殖の有無によって感染価としての TCID<sub>50</sub> を計算した。それぞれ 3 つの検体で感染価を評価した。また、全血は 200mL に感染後 5 日目の THP-1 と cell free 無鞭毛型原虫を遠心で集め添加した。4.5mL を白血球除去フィルター濾過前の検体として採取した。白血球除去フィルター処理後の血液は、4.5mL の血液を溶血させ 300G X 10 分の遠心し、上清はさらに 1,300g X 10 分の遠心を行い 2 つの沈殿を 1 つにまとめてアルブミンや血漿と同様に感染価を測定した。

### (4) 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<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、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。

### (5) 変異型 CJD 発生動向

変異型 CJD の発生状況を英国の NCJD RSU や米国の CDC から疫学情報を収集し、血液製剤に与える影響を評価した。フランスの発生状況は 2013 年度から経時的にその年度毎の発生件数を加算して発症者数の推移を評価した。

## 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 1 Log、3 週間で 2 Log 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。-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。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

ヒト血漿を用いた評価では、白血球除去フィルター濾過前の総感染価は 1.7X10<sup>7</sup> と 2.0X10<sup>7</sup> あったが、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。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  $1.2 \times 10^3$ 、2 回目は濃縮後も検出限界以下であった。白血球除去フィルターによる除去効率はそれぞれ約  $10^4$  と  $10^5$  以上であった。また、全血からの白血球除去効率は 3.6Log であった。

### (3) 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、2 種の *L. donovani* と *L. amazonensis* の検出を行なった。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。

### (4) 変異型 vCJD 発生動向

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。英国で 2016 年に 1 名の死亡例が報告されたが、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

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。現行の我が国で実施されている輸血用血液の製造工程や保存条件によって Leishmania 原虫の感染リスクがどの程度減少するのか評価した。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期間で死滅することが明らかになり、新鮮凍結血漿や血漿分画製剤の感染性は低いと考えられた。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。

変異型 vCJD 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 型を示す健康人の割合は 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。2016 年に英国で報告された 1 例は MV 型であり、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

現行の輸血用血液製剤の製造工程と保存条件による Leishmania 原虫の除去・不活化効率を評価したところ、白血球除去フィルターによる Leishmania 原虫の除去は非常に効果的であることが明らかになった。また、-20℃ に凍結したヒト血漿からは感染性が検出できなかった。

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、発症例が増加することも考えられるため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) 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) 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) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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、斉藤妙子、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

11) 山田攻、鈴木雅之、内野富美子、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

12) 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