

分担研究報告書

ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応及び  
国内献血におけるシャーガス病の感染リスクの把握

研究分担者 百瀬俊也（日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター製剤一部長）  
研究協力者 五十嵐滋（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課長）  
沖 学（日本赤十字社血液管理センター 検査課長）  
高松純樹（日本赤十字社東海北陸ブロック血液センター所長）  
鬼束惇義（岐阜県赤十字血液センター所長）  
南澤孝夫（静岡県赤十字血液センター所長）  
濱口元洋（愛知県赤十字血液センター所長）  
岡田昌彦（三重県赤十字血液センター所長）  
内田茂治（日本赤十字社血液事業本部  
中央血液研究所 感染症解析部長）  
三浦左千夫（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所客員研究員）  
平 力造（日本赤十字社血液事業本部 検査管理課長）  
古居保美（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）  
石野田正純（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）  
高橋 勉（日本赤十字社血液事業本部 安全管理課）  
古澤秀明（日本赤十字社血液管理センター 検査課）

研究要旨：

ウエストナイルウイルス（以下、WNV という）の国内発生に備えて現在備蓄している TMA 法の WNV-NAT 試薬（Procleix® WNV Assay）と日本赤十字社 4 カ所の NAT 施設が保有している cobas®s401 システムを用いた TaqMan PCR 法の WNV-NAT 試薬（TaqScreen® WNV assay）について、感度の比較検討を行った。TMA 法の WNV-NAT 試薬の方が、TaqMan PCR 法の同試薬と比べ高く安定した結果が得られたが、両者とも製造各社が示している感度とほぼ同等であり、十分な結果が得られた。また、WNV 国内感染発生時に WNV-NAT を組み入れた場合、現行の NAT スクリーニングの検査所要時間、完了時刻にどの程度影響するかについて、実検体を用いてシミュレートした。WNV 対象 NAT 検体が先行して検査できる場合は、通常検査の平均所要時間 9 時間 20 分に比べ 40 分程度の延長で対応できることが確認できた。

日本赤十字社では、平成 24 年 10 月 15 日から献血時のシャーガス病の安全対策として、本人又は母親が中南米出身である、あるいは通算 4 週間以上の中南米滞在歴のある献血者の血液は、輸血用血液として用いず、血漿分画製剤の原料として用いることとした。これら中南米滞在歴等を有する献血者数は、全国で 1 年間 9,392 人であった。そのうち「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」者は 2,149 人（23%）であった。

中南米地域からの定住者が多い東海 4 県（愛知県、静岡県、岐阜県、三重県）の「本人

が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者に対して、同意を得た上で、*Trypanosoma cruzi* 抗体検査とシャーガス病に関するアンケート調査を行うパイロットスタディを実施した。平成 25 年 1 月 8 日～11 月 30 日で、対象者は 457 人で、男性 335 人（73%）、女性 122 人（27%）、平均年齢 35.1 歳、67%が 40 歳未満の若い世代であり、献血回数については、初回献血者が 42%であった。対象者の 88%がブラジル出身、日本滞在年数は平均 15.3 年であった。また、幼少時の家の構造が土壁と回答した件数が 3%、家族にシャーガス病と診断された者が 1.5%と、シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。対象者 457 人のうち 1 人が *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性であった。*Trypanosoma cruzi* 抗体陽性リスクを推計すると、全国で 1 年間に *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性となる献血者は 5 人以下と考えられた。献血時のシャーガス病の安全対策を講じている日本では、輸血を介したシャーガス病の感染リスクはきわめて低いと考えられる。

## A．研究目的

現在、WNV 国内発生に備えて TMA 法の WNV-NAT 試薬（Procleix® WNV Assay：ノバルティス社）を 5000 テスト分血液管理センターに備蓄している。本試薬は TMA 法の試薬であり、測定機器 eSAS を保有しているのは京都府福知山市の血液管理センター及び東京都江東区の関東甲信越ブロック血液センターである。

日本赤十字社では、HBV、HCV、HIV の 3 ウイルスの NAT スクリーニングのために、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社（以下、ロシュ社）製 cobas®s401 システムを全国 4 カ所の NAT 施設に導入している。この cobas®s401 システムを用いた TaqMan PCR 法の同社製 WNV-NAT 試薬（TaqScreen® WNV assay）の感度及び特異性について、WNV 国際標準品の候補となる非感染性の WNV 液 2 種の提供を受け、TMA 法の WNV-NAT 試薬と比較検討した。

両社の WNV-NAT を日常検査に組み入れた場合、現行の NAT スクリーニングの検査結果のタイムスケジュールにどの程度影響するかをシミュレートした。

また、国内献血におけるシャーガス病の感染リスクを把握することは、日本において、献血血液の重要な安全対策上の課題と言える。日本赤十字社では、平成 24 年 10 月 15 日から献血

時のシャーガス病の安全対策として、本人又は母親が中南米出身である、あるいは通算 4 週間以上の中南米滞在歴（以下、中南米滞在歴等）のある献血者の血液は、輸血用血液として用いず、血漿分画製剤の原料として用いることとした。（図 1）これら中南米滞在歴等を有する献血者数を都道府県別カテゴリー別に明らかにし、リスク評価のための基礎資料にすることとした。

ブラジルからの定住者が数多く居住する愛知県、静岡県、岐阜県、三重県の東海 4 県において、「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」（カテゴリー 1）献血者に対して、同意を得た上で、*Trypanosoma cruzi*（以下、*T. cruzi*）抗体検査とシャーガス病に関するアンケート調査を行うパイロットスタディを実施し、抗体陽性者への健康管理に繋げていくようにした。

## B．研究方法

### 1．WNV-NAT

#### 1) 感度試験

日本赤十字社の製品検査で合格した献血血漿について、国立感染症研究所作成の「ウエストナイルウイルス病原体マニュアル(第 4 版)」に規定されている RT-PCR 法で WNV が陰性であることを確認し、陰性対象及びウイルス液希釈用血漿とした。

非感染性とした WNV 国際標準品の候補である WNV 液 2 種 (FDA WN02 lineage 1、以下 WNV-USA) と (the Roche secondary WNV standard, lot 72805: high titer sample、以下 WNV-ITA) を希釈用血漿で希釈し、100、50、10、5、1、0.5copies (以下 cps) /mL 濃度のウイルス添加血漿を各々 6 本作製し、同一検体で TaqScreen®WNV assay 試薬及び Procleix® WNV Assay 試薬を用いて NAT を各々 4 回実施した。各々の濃度における 24 重測定の結果から試薬感度を評価した。

## 2) 特異性試験 (実検体による試験)

献血血液の NAT 用検体を用いて作製した 20 本プール NAT 検体で、HBV、HCV 及び HIV のスクリーニング NAT (以下、MPX 検査) 陰性の 80 検体について、TaqScreen®WNV assay 試薬を用いて NAT を 2 回実施した。

## 3) 実検体を用いた検査シミュレーション

1 日の献血件数が約 800 件である地域で WNV 国内感染が発生したと想定して、前日到着済み検体の 800 本を WNV - NAT 対象検体と仮定しプール検体を作製する。現行の MPX 検査に加え WNV-NAT を同じ検体で実施した。それ以外は通常通りプール検体を作製し、順次 MPX 検査を行った。

WNV-NAT 対象検体は前日に血液管理センターに到着済で選別済であり、WNV-NAT と MPX 検査が実施できる状況を想定し、プール検体の作製から WNV-NAT 及び MPX 検査の両方の検査結果の確定に要する時間を通常時と比較検討した。

## 2. シャーガス病の感染リスク

献血受付時に、図 1 のカテゴリー 1~3 の中南米滞在歴等に該当し、血液事業統一コンピュータシステムに当該情報が入力された受付者数・献血者数を、都道府県別カテゴリー別に抽出・集計した。

中南米地域からの定住者が多い東海 4 県 (愛知県、静岡県、岐阜県、三重県) の中南米滞在歴等のある献血者のうち、カテゴリー 1 に該当す

る献血者に対し、本調査研究のインフォームドコンセントが得られ同意書に署名した者を対象とし、献血時の検査用検体を 1 本追加して初流血から採取した。併せて出身地、シャーガス病に関する認知度等の質問票に回答いただいた。検体は中央血液研究所に送付され、ELISA 法 (ORTHO® *T. cruzi* ELISA TEST System) 及びイムノクロマト法 (InBios 社 Trypanosoma Detect® and/or Chembio 社 CHAGAS STAT-PAK®) による *T. cruzi* 抗体検査を実施した。

## (倫理面への配慮)

中南米滞在歴カテゴリー 1 の献血者に対するシャーガス病の感染リスク調査については、本調査研究の説明書及び同意書を渡し、インフォームドコンセントが得られ同意書に署名した成人を対象とした。*T. cruzi* 抗体検査結果を通知し、抗体陽性者に相談医療機関を紹介するなど健康管理に活かすこととしたので、調査対象者に不利益はない。本調査に関して、別途個人情報管理者を指名し個人情報を適切に管理することとした。本調査研究は、日本赤十字社血液事業研究倫理審査委員会において承認された。(研究倫理審査番号 2010-006)

## C. 研究結果

### 1. WNV-NAT

#### 1) 感度試験

TaqMan PCR 法 (表 1)

各測定濃度で 24 重測定を実施した結果、95% 検出感度 (PROBIT 分析) は WNV-USA で 11.0cps/mL、WNV-ITA で 33.4cps/mL であった。

また、検出感度のばらつきは、WNV-USA では低濃度域でばらつきがみられたが、WNV-ITA の方は濃度による差はみられなかった。(図 2)

TMA 法 (表 2)

と同様に、各測定濃度で 24 重測定を実施した結果、95% 検出感度 (PROBIT 分析) は WNV-USA で 1.2cps/mL、WNV-ITA で 13.3cps/mL であった。また、検出感度のばらつ

きは、WNV-USA、WNV-ITA 共に 1cps/mL 以下の濃度でばらつきがみられた。(図3)

WNV-USA に関しては 0.5cps/mL でも陽性率が 62.5%となったため、追加で両法の低濃度域の検討を行った。TaqMan PCR 法は 0.5cps/mL 以下の濃度では陽性率が極端に下がるのに対し、TMA 法は 0.05cps/mL の濃度まで陽性率が 25%を上回り、95%検出感度で 10 倍の差が出た。(表3)

なお、両者の感度は、各社の参考資料によると TMA 法 8.2copies /mL (95%検出感度)、TaqMan PCR 法で 23.0copies /mL(95%検出感度)である。

## 2) 特異性試験(実検体による試験)

TaqMan PCR 法で、80 検体を用い 2 回 WNV-NAT を実施した結果、8 本が Invalid となったが、他の 152 本は全て陰性で、陽性及び偽陽性は検出されなかった。

Invalid となった 8 本のうち 4 本は機器エラーによるもので、残りの 4 本はそのエラーに付随して発生した消耗品のハンドリングエラーであり、検体由来のものではなかった。

20 プールした献血者検体それぞれ 240 本について、NAT を実施したが、TaqMan PCR 法及び TMA 法共に全て陰性で、陽性又は偽陽性は検出されなかった。

## 3) 実検体を用いた検査シミュレーション

(図4)

両法の検査結果確定までの時間を、現行の MPX 検査における検査対象検体数 5300 本～5600 本の平均所要時間9時間20分と比較した。

### TaqMan PCR 法

WNV 対象検体のプール検体作製後 TaqMan PCR 法で MPX 検査を行い、検体のサンプリングが終了後 TaqMan PCR 法で WNV-NAT を実施した。WNV-NAT 対象以外の NAT 対象検体は WNV-NAT 対象検体のプール作業終了後、順次プール検体を作製し、MPX 検査を行った。

WNV 対象検体のプール検体作製からすべての検査結果確定までの所要時間は9時間32分

あり、通常の MPX 検査と比べ若干の遅延であった。

### TMA 法

WNV-NAT 対象検体のプール検体作製後 eSAS による TMA 法で WNV 検査をし、検体のサンプリングが終了後 TaqMan PCR 法で MPX 検査を実施、WNV 検査対象以外の NAT 対象検体は WNV 対象検体のプール作業終了後、順次プール検体を作製し、MPX 検査を実施した。

WNV 対象検体のプール検体作製からすべての検査結果確定までの所要時間は10時間3分となり、通常の MPX 検査より 40 分程度の遅延となった。

## 2. シャーガス病の感染リスク

1) 中南米滞在歴等を有する受付者数及び献血者数(図5)

平成 24 年 10 月 15 日～平成 25 年 10 月 14 日の 1 年間の中南米滞在歴等を有する受付者数は全国で 10,973 人、献血者数は 9,392 人であった。中南米滞在歴等を有する献血者数のカテゴリー別の内訳は、「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」カテゴリー1は 2,149 人(23%)、「母親が中南米諸国で生まれた、又は育った」カテゴリー2が 301 人(3%)、「カテゴリー1以外で、通算 4 週間以上中南米諸国に滞在した」カテゴリー3が 6,935 人(74%)、分類不明 7 人であった。

都道府県別の献血者数では、東京都の 1,925 人が最も多く、次いで神奈川県 1,021 人、愛知県 584 人と続いた。カテゴリー1の献血者数では、愛知県の 345 人が最も多く、東京都 280 人、静岡県 208 人、神奈川県 151 人、埼玉県 132 人の順であった。中南米滞在歴等を有する献血者数の全体の献血者数に対する割合は、沖縄県が 0.38%と最も高く、東京都、神奈川県、静岡県及び三重県が 0.36%、滋賀県が 0.34%と続いた。全国平均 0.19%であった。東海 4 県の中南米滞在歴等を有する献血者数のうちカテゴリー1の構成比は、岐阜県 37%、静岡県 47%、愛知県 59%、三重県 35%であり、全国平均の 23%に

比べ高かった。

## 2) 東海4県におけるパイロットスタディ

平成25年1月8日から東海4県における同意を得たカテゴリー1の中南米出身の献血者に対し、*T. cruzi*抗体検査とシャーガス病に関するアンケート調査を実施した。

平成25年1月8日～11月30日で、対象者は457人、男性335人(73%)、女性122人(27%)であり、年齢別では、10代29人、20代121人、30代154人、40代104人、50代42人、60代7人で、平均35.1歳であった。(図6)

国籍別では、ブラジル380人と最も多く、ペルー27人、アルゼンチン、ボリビア、コロンビアが各4人、チリ2人、エクアドル、パラグアイ、ホンジュラス、メキシコが各1人、日本20人、不明12人であった。出身国別では、ブラジルが401人、88%を占め、次いでペルーが32人(7%)であった。(図6)ブラジル国籍380人の出身州は、サンパウロ州251人(66%)、パラナ州54人(14%)と多く、その外12州に及んだ。(図7)対象者の日本滞在年数は平均15.3年(5ヶ月～43年)であった。献血回数は、初回献血者が42%、2回目が18%であった。(図6)

シャーガス病に関する7項目のアンケート調査(図8)については、1.幼少時の家の構造は、合計509件(複数回答あり)のうちコンクリートが56%と最も多く、次いでレンガが28%、木造9%で、サシガメが息息する可能性があると考えられる土壁は13件3%であった。2.サシガメを知っていると答えた者は56%、3.刺された経験のある者は1人(*T. cruzi*抗体陰性)。4.シャーガス病を知っていると答えた者は65%、5.シャーガス病の検査経験がある者は59人(13%)で、その検査結果が陽性であった者はいなかった。6.家族にシャーガス病と診断された人がいる者は、7人(1.5%)で全員ブラジル人であった。その家族内訳は、母2、兄弟姉妹2、祖父、いとこ、その他であった。7.心疾患、消化器疾患を指摘されたことがある者は5人であったが、シャーガス病との関連性は認められな

かった。

パイロットスタディ対象の457検体のうち、1検体が*T. cruzi*抗体陽性であった。また、1検体はイムノクロマト法STAT-PAK®の偽陽性で、残る455本は全て陰性であった。この*T. cruzi*抗体陽性の献血者は40代男性、日本滞在13年のボリビア人で、今回が初回の献血であった。アンケート調査への回答は、サシガメやシャーガス病は知っているとの回答だったが、その外シャーガス病のリスクを想起させる回答はなかった。

なお、パイロットスタディとは別に、並行して実施している東海4県におけるカテゴリー2・3の疫学調査(同一期間335件)から陽性者は認められていない。

## D. 考察

### 1. WNV-NAT

今回実施した2種のWNV国際標準品の候補WNV液を用いたTaqMan PCR法及びTMA法の感度は、TMA法の方が高く安定した結果が得られたが、両法とも、ロシュ社、ノバルティス社両社が示している感度とほぼ同等であり、TaqMan PCR法も十分な結果が得られたと考える。

国内感染発生時のWNV-NATを加えたNATスクリーニングの検査所要時間は、WNV対象NAT検体が先行して検査できる場合は、通常検査に比べ40分程度の延長で対応できる事が確認できた。しかし、WNV-NATの先行検査ができない場合は、別途対応する必要がある。また、eSASによるTMA法は実施施設が現在2施設に限定されており、用手手法であるため手技の熟練を要することから、完全自動化による検査体制を構築する必要があると考える。

### 2. シャーガス病の感染リスク

平成24年10月15日からのシャーガス病の安全対策により、献血受付時に中南米滞在歴等の確認を行い、確認票により該当者情報を血液事業統一コンピュータシステムに入力すること

になったことから、中南米滞在歴等を有する受付者数・献血者数が正確に把握できるようになった。1年間の集計値は、受付者数は約11,000人、献血者数は約9,400人である。このうち、約3/4は「中南米諸国に通算4週間以上滞在した」人でほとんどが日本人と考えられる。「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」人は約1/4、3-4%の人は「母親が、中南米諸国で生まれた、又は育った」人であった。「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者は約2,100人であり、都道府県別の分布では関東地方、東海地方に多く、地域的な偏在が認められた。東海4県では、中南米出身者である献血者の割合が高かった。

東海4県のパイロットスタディのアンケート調査により、「本人が中南米諸国で生まれた、又は育った」献血者の背景は、男性が73%、女性が27%と男性が多く、平均年齢35.1歳、67%が40歳未満の若い世代であり、献血回数は42%が初回献血であった。大多数の88%がブラジル出身であり、日本滞在年数は平均15年であることが明らかとなった。

また、幼少時の家の構造が土壁と回答した件数が3%、家族にシャーガス病と診断された者が1.5%と、シャーガス病の感染リスクのある環境にあった献血者がわずかではあるが存在することも明らかとなった。

東海4県の中南米出身献血者(カテゴリー1)の対象457名中 *T. cruzi* 抗体陽性者は1名のみであったこと、全国で中南米出身献血者(カテゴリー1)は2,149人/年であったこと、東海4県の他のカテゴリー(2・3)での疫学調査から陽性者は認められていないことから、全国で1年間に *T. cruzi* 抗体陽性となる献血者は5人以下と推計された。

一方、中南米滞在歴等を有する献血者の約3/4を占め、ほとんど日本人と考えられるカテゴリー3「中南米諸国に通算4週間以上滞在した」の滞在期間等の基準については、今後の調査、検討により見直しが必要であると考えられる。

## E．結論

## 1．WNV-NAT

TMA法のWNV-NAT試薬(Procleix® WNV Assay)とTaqMan PCR法のWNV-NAT試薬(TaqScreen® WNV assay)の感度試験を実施し、TMA法試薬の方が、TaqMan PCR法試薬と比べ高く安定した結果が得られたが、両者とも各社が示している感度とほぼ同等であり、十分な結果が得られた。国内感染発生時のWNV-NATを加えたNATスクリーニングの検査所要時間をシミュレートしたところ、WNV対象NAT検体が先行して検査できる場合は、通常検査に比べ40分程度の延長で対応できる事が確認できた。

## 2．シャーガス病の感染リスク

本研究の対象である東海4県の中南米出身献血者の中から1名の *T. cruzi* 抗体陽性者が認められた。中南米滞在歴等を有する献血者数から推計すると、全国で *T. cruzi* 抗体陽性となる献血者は5人以下/年と考えられた。

献血時のシャーガス病の安全対策を講じている日本では、輸血を介したシャーガス病の感染リスクはきわめて低いと考えられる。

## <謝辞>

今回のWNV-NATの研究にWNV液を分与いただいたイタリア National Center for Immunobiologicals Research and Evaluation (CRIVIB) の Dr. Giulio Pisani と米国 CBER/FDA の Dr. Maria Rios に深謝いたします。

## 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) 古澤秀明、森安浩之、後藤康仁、増田久美

子、馬場明美、沖 学、山中烈次、平力造、  
百瀬俊也、河敬世：我が国におけるウエスト  
ナイルウイルス（WNV）感染発生時の  
献血血液の検査、第 37 回日本血液事業学  
会総会、札幌、2013 年

- 2 ) S. Momose, Y. Furui, M. Ishinoda,  
T. Takahashi, S. Igarashi, Y. Sayama,  
S. Miura, C. Matsumoto, S. Uchida,  
S. Hino, A. Onitsuka, T. Minamizawa,  
M. Hamaguchi, M. Okada,  
J. Takamatsu, M. Satake, M. Minami,  
K. Tadokoro : ANTI-*TRYPANOSOMA*  
*CRUZI* TEST AND QUESTIONNAIRE  
SURVEY IN JAPAN FOR BLOOD  
DONORS NATIVE OF LATIN  
AMERICA、24<sup>th</sup> Regional Congress of  
the ISBT、Kuala Lumpur、2013

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし