

分担研究報告書

国内におけるシャーガス病疑い例の検査経験および
輸血用血液製剤中における *Trypanosoma cruzi* 原虫の動態について

研究代表者 倉根一郎 国立感染症研究所 副所長

研究協力者 佐山勇輔、三浦左千夫、佐竹正博

日本赤十字社中央血液研究所

研究要旨

シャーガス病の病原体である *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) の感染者（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って患者に *T. cruzi* が伝播する可能性がある。シャーガス病非流行国において、輸血を介した *T. cruzi* 感染例は、ほとんどが血小板製剤の輸血によるとされている。そこで、シャーガス病の可能性のある LA 出身者と日本人から検体を得て、1) 検査方法を評価しつつキャリアの状態を把握し、2) 輸血用血液製剤中に *T. cruzi* を接種して各輸血用血液製剤中の *T. cruzi* の動態を解析した。

研究期間中に LA 出身者 10 名、日本人 10 名から検体が提供された。血清学検査により、LA 出身者 7 名が抗体陽性、その内 6 名が PCR 陽性、3 名から *T. cruzi* が分離された。サシガメとの接触歴が不明な方からも *T. cruzi* 感染者が認められた。日本人には陽性者は確認されなかった。

濃厚血小板 (PC) 中では、増殖可能な *T. cruzi* は接種 2 日目以降から減少し、3 log 程度減少したが、PC の有効期間を通じて増殖可能な *T. cruzi* が認められたことから、輸血による感染リスクが示された。新鮮凍結血漿 (FFP) は一度の凍結融解により、5 log 以上減少し、検出限界以下となった。両製剤とも株による大きな差は認められなかった。

日本国内でも医療関係者におけるシャーガス病の認知度を上げる必要がある。さらに検査機関を含めて、診断・治療が可能な体制の整備が必要であると考えられた。

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り、おもにラテンアメリカ (LA) で流行している。ヒトへの感染は、サシガメを介した感染経路が主であり、感染すると一時的な急性期症状を呈するが、ほとんどの場合一過性の経過を辿り、その後慢性期に至り、キャリアとなる。

近年の人々の往来のグローバル化により、日本国内にもラテンアメリカ出身者が約 25 万人滞在しており、その内、3,000 ~ 4,000 人が *T. cruzi* のキャリアと言われている (Rassi et al. Lancet, Vol 375, Apr, 2010)。しかしながら、日本国内ではシャーガス病は

稀な疾患であるため、的確な診断や検査が困難であり、調査用検体の確保も難しい。

シャーガス病非流行国であるアメリカ、カナダ、スペインにおける輸血を介した *T. cruzi* 感染はこれまで 20 例同定されている。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 (Benjamin et al. Transfusion, Vol 52, Sep 2012)、赤血球製剤および血漿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、輸血用血液製剤の保管条件や組成成分は異なるにも関わらず、各製剤の保存中の *T. cruzi* の動態を詳細に解析した報告は少ない。

本研究では、LA 出身者を含めた日本でのシャーガス病疑い例から血液を採取し、血清

学検査法、遺伝子検査法、そして原虫培養法を実施して検査法を評価した。また、分離された *T. cruzi* を用い、輸血用血液製剤へ接種し、各製剤の保存状態における *T. cruzi* の動態を解析した。

B. 研究方法

(1) シャーガス病疑い例の検査

2012年10月から2014年8月の間に医療機関およびNGOなどから連絡のあった提供者から血液を採取した。提供者は、1) LA出身者、2) サシガメとの暴露歴、3) LA地域に滞在歴のある方を対象とした。提供者から検体採取時に主治医などを介し、十分に本研究の概要を説明後、同意書に署名をいただいた。さらに、提供者にアンケート調査を行い、サシガメとの接触歴などを調査した。検体は、血清学検査法 (ELISA; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay/Ortho *T. cruzi* ELISA Test System, Ortho Clinical Diagnosticsおよびイムノクロマト法/Chagas STAT-PAK Rapid Assay, Chembio Diagnostic Systems)、PCR法 (*T. cruzi* Satellite repeat領域をターゲットとした各プライマー)、N. N. N. (Novy-MacNeal-Nicolle) 培地による血液培養を行った。*T. cruzi*が培養・分離された際は、培養液からDNA精製後、ミトコンドリア領域をターゲットとしたプライマーを用いたPCRを行い、PCR産物からのダイレクトシーケンスによる塩基配列を決定後、系統樹解析による *T. cruzi*における遺伝子型 (DTUs; Discrete Typing Units)の同定を実施した。

(2) 輸血用血液製剤中における *T. cruzi*の動態

*T. cruzi*は南米出身者から分離された2株 (1. JRC Tc-1/DTUs TcV、2. JRC Tc-2/DTUs TcII) を使用した。輸血用血液製剤はそれぞれ4名の献血者由来の濃厚血小板 (PC; Platelet Concentrate) および新鮮凍結血漿 (FFP; Fresh Frozen Plasma) を用いた。培養した *T. cruzi* を各製剤へ接種後 (10^8 parasites/Bag)、PCは20 ~ 24 °C、60 rpm、FFPは凍結 (-20 °C以下) により保存をおこなった。PCは接種後0, 2, 3, 4, 7日経過時、FFPは凍結融解前後を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、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判定した。

(倫理面への配慮)

ヒトの血液材料を用いた実験は、日本赤十字社の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) シャーガス病疑い例における検査結果

期間中、LA出身者10名、日本人10名から検体が得られた (表1)。LA地域出身者は、NGOの健康診断などにより、心疾患や消化器疾患が疑われ医療機関を受診した方や、親類にシャーガス病診断歴がある方などであった。日本人はLA地域への渡航歴またはサシガメとの暴露歴がある方であり、1名は心疾患を患っていた。各検査により、LA出身者のうち7名が抗体陽性であり、その内6名がPCR陽性、3名から *T. cruzi* が分離された。サシガメとの接触歴が不明であった提供者からも *T. cruzi* 感染者が認められた。血清学

検査法に用いた 2 法の結果に差異は認められなかった。分離された *T. cruzi* の DTUs を同定したところ、1 株が DTUs TcV (JRC Tc-1)、残り 2 株が DTUs TcII (JRC Tc-2, JRC Tc-3) であった (図 1A)。DTUs の分布には地域性があるが、各提供者からの出身地域と分離された *T. cruzi* の DTUs はほぼ一致していた (図 1B) (Zingares et al. Infection, Genetics and Evolution, 12, 2012 による)。日本人 10 人はいずれも抗体陰性であった。

(2) 輸血用血液製剤中における *T. cruzi* の動態

PC 中における再増殖可能な *T. cruzi* 数は 2 日目以降から減少し、平均 3 log 程度の減少が確認された (図 2) が、異なる献血者由来の PC において、*T. cruzi* の減少の程度が大きく異なっていた。特に、JRC Tc-2 #3 では、検出限界以下にまで減少していた。しかしながら PC の有効期間内では、いずれの PC においても増殖可能な *T. cruzi* が確認された。一方、FFP は一回の凍結融解により、平均 5 log 以上減少し、検出限界以下となった (図 3)。異なる献血者由来の FFP においてもほぼ同様の結果であった。両製剤とも株による大きな差は認められなかった。

D. 考察

本研究期間中に、*T. cruzi* の感染を疑われた LA 出身者 10 名中 7 名が抗体陽性であり、その 6/7 (85.7%) が PCR も陽性であり、*T. cruzi* が分離された提供者も確認された。これまで日本在住の LA 出身者の一部に、*T. cruzi* 感染者がいることが知られていたが、本研究においてもキャリアが認められた。し

かし、日本在住の LA 出身者のキャリア中に、どのくらいの割合で *T. cruzi* の原虫血症が認められ、さらにシャーガス病の症状を有するキャリアが存在するかについては不明であり、今後規模を大きくした調査が必要と思われる。さらに今回、感染は否定されたが、LA 地域の滞在歴やサシガメに暴露歴がある日本人からも検体の提供があった。近年の人々の往来のグローバル化などにより、流行地出身者だけでなく、日本人による流行地への渡航などによって、シャーガス病などの日本では稀な疾患に罹患する可能性も大きくなっている。日本においてはシャーガス病は稀な疾患であることから、医療機関などにおいても認識しづらく、今後シャーガス病をはじめとした疾患に対しては、国内でも医療関係者における認知度をより上げる必要がある。さらに、検査機関などの充実を図り、診断・治療できる体制の整備も必要と思われる。

また、シャーガス病における検査方法の評価では、血清学検査法に用いた ELISA およびイムノクロマト法の両試験で結果に差異は認められず、PCR 法および血液培養からも *T. cruzi* DNA および *T. cruzi* の検出が確認された。従って、シャーガス病疑い患者に対し、これら検査方法は有効な方法であることが示唆された。さらに、今回、*T. cruzi* の DTUs を解析したところ、各提供者からの出身地域と分離された *T. cruzi* の DTUs の地域との間には矛盾がないことが示された。従って、*T. cruzi* の DTUs を同定することにより、その *T. cruzi* の地域性を推察するには有効な方法であることが示唆された。

これまでシャーガス病の非流行地域において確定された輸血感染では、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ることが報告されている。今回 PC を用い、*T. cruzi* の動態を解析したところ、有効期間を含む 7 日までの全観察期間にわたって増殖可能な *T. cruzi* が認められたことから、PC 輸血による *T. cruzi* の感染リスクが示された。いっぽう、異なる献血者に由来する PC において *T. cruzi* の生存率が異なることも示された。近年、熱帯熱マラリア原虫に対し、血小板に抗原虫活性が存在することが見出されているが、*T. cruzi* に対しても同様の抗原虫活性があるのか、また、その活性が宿主によって異なるのか、今後の研究課題である。一方、FFP では、すべての献血者由来の製剤において検出限界以下にまで減少することが示された。FFP は冷凍状態で保管し、使用時に融解させることから、使用するまでに一サイクルの凍結融解が発生する。この凍結融解により、*T. cruzi* の感染リスクが大幅に減少することが示された。今後は、PC 中における *T. cruzi* の動態を詳細に解析すると同時に、赤血球濃厚液などの他の輸血用血液製剤においても動態を解析する必要がある。

E. 結論

本研究において、日本に滞在する LA 出身者に *T. cruzi* 感染者が認められ、その中に血中に原虫が確認される感染者も見いだされた。また、日本人からもサシガメとの暴露歴などにより、本研究に検体が提供された。国内でも医療関係者におけるシャーガス病の認知度を上げる必要がある。さらに検査機関を含めて、診断・治療が可能な体制の整備が必要であると考えられた。

PC 中では、*T. cruzi* は保存期間中に増殖可能な *T. cruzi* が認められたことから、PC の輸血による感染リスクが示された。一方、FFP は一度の凍結融解により、検出限界以下にまで減少が認められ、FFP 輸血による *T. cruzi* の感染リスクは低いことが示された。

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

1) 佐山勇輔、三浦左千夫、松本千恵子、内田茂治、佐竹正博、田所憲治：日本国内におけるシャーガス病疑い例の検査経験、第 89 回日本感染症学会学術講演会、京都、2015 年

2) 佐山勇輔、松本千恵子、三浦左千夫、内田茂治、佐竹正博、田所憲治：輸血用血液製剤中における *Trypanosoma cruzi* の動態、第 84 回日本寄生虫学会大会、東京、2015 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 シャーガス病疑い提供者における検査結果およびアンケート調査結果

No.	性別	年齢	国籍	血清学	PCR	培養	幼少時代に住んでいた家の在室構造	子供の頃に一番長く過ごした地域は	サンガメという虫を していますか 1: ハイ 2: イイエ	サンガメに刺された ことはありますか 1: ハイ 2: イイエ 3: ワカラナイ	輸血を受けたこと がありますか 1: ハイ 2: イイエ	日本で献血をしたこと がありますか 1: ハイ 2: イイエ 3: ワカラナイ	シャーガス病を していますか 1: ハイ 2: イイエ 3: ワカラナイ	シャーガス病の検 査を受けたことが ありますか 1: ハイ 2: イイエ 3: ワカラナイ	誰か家族でシャー ガス病と診断され た人はいますか 1: ハイ 2: イイエ 3: ワカラナイ	心疾患、消化器疾 患を指摘されたこ とはありますか 1: ハイ 2: イイエ 3: ワカラナイ	
1	F	N.D.	Bolivia	陽性	陽性	陰性											N.D.
2	M	15	Japan (Bolivia)	陽性	陽性	陽性	日本国内	日本	2	2	2	2	1	1	1、母親	1、消化器疾患	
3	M	N.D.	Japan	陰性	陰性	陰性											N.D.
4	F	N.D.	Brazil	陽性	陽性	陽性											N.D.
5	F	N.D.	Brazil	陽性	陰性	陰性											N.D.
6	F	81	Brazil	陰性	陰性	陰性	木造一階建	Sao Paulo	1	3	2	2	2	2	2	1	
7	M	49	Brazil	陽性	陽性	陽性											N.D.
8	M	59	Brazil	陽性	陽性	陰性	木造	Sao Paulo	2	3	2	2	2	1	2	2	
9	m	N.D.	Japan	陰性	陰性	陰性											N.D.
10	M	N.D.	Japan	陰性	陰性	陰性											N.D.
11	M	66	Japan	陰性	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	1	2	2	1	2	2	2	
12	F	63	Brazil	陽性	陽性	陽性	土壁	Turmalina	1	3	2	2	1	1	1、母、姉、従姉妹	2	
13	M	65	Japan	陰性	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	2	2	2	1	2	2	1、心疾患	
14	M	71	Japan	陰性	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	2	2	2	1	2	2	2	
15	M	38	Brazil	陰性	陰性	陰性	Casa de comcoto	Brazilia	1	3	2	2	1	2	2	2	
16	M	37	Japan	陰性	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	2	2	1	1	2	2	2	
17	M	34	Bolivia	陰性	陰性	陰性	Casa de comcoto	La paz	1	3	2	2	3	3	3	3	
18	F	38	Japan	陰性	陰性	陰性	日本国内	日本国内	1	1	2	2	1	2	2	1、幼少期に過敏性腸症候群	
19	F	N.D.	Brazil	陰性	陰性	陰性	農場	Inubia Paulista	2	2	2	3	2	2	2	2	
20	M	60	Brazil	陰性	陰性	陰性	レンガ	Sao Paulo	1	3	2	2	1	2	2	1、心疾患	

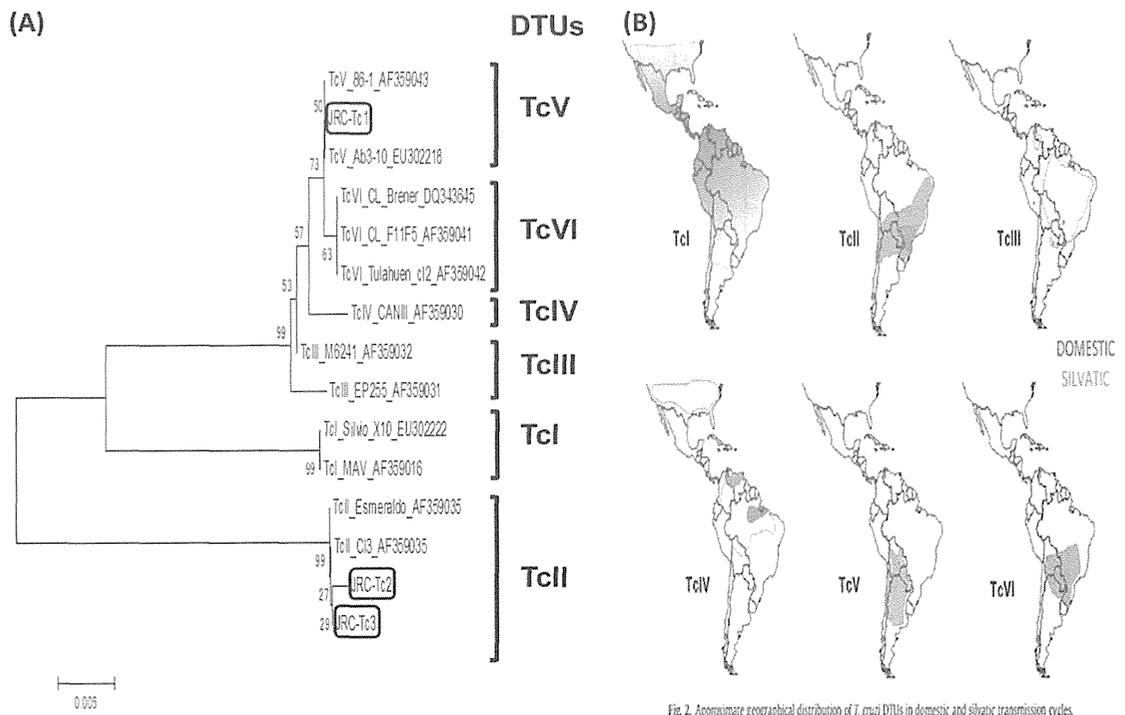


図1 (A) *T. cruzi* ミトコンドリア遺伝子における分子系統樹解析、(B) LA 地域における遺伝子型の分布域 (Zingares et al. Infection, Genetics and Evolution, 12, 2012)

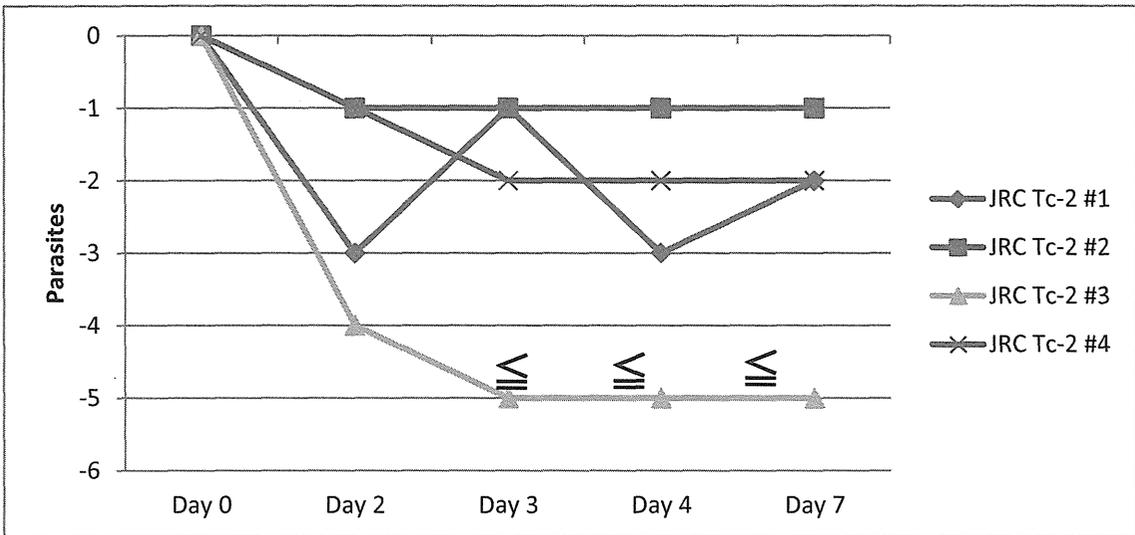
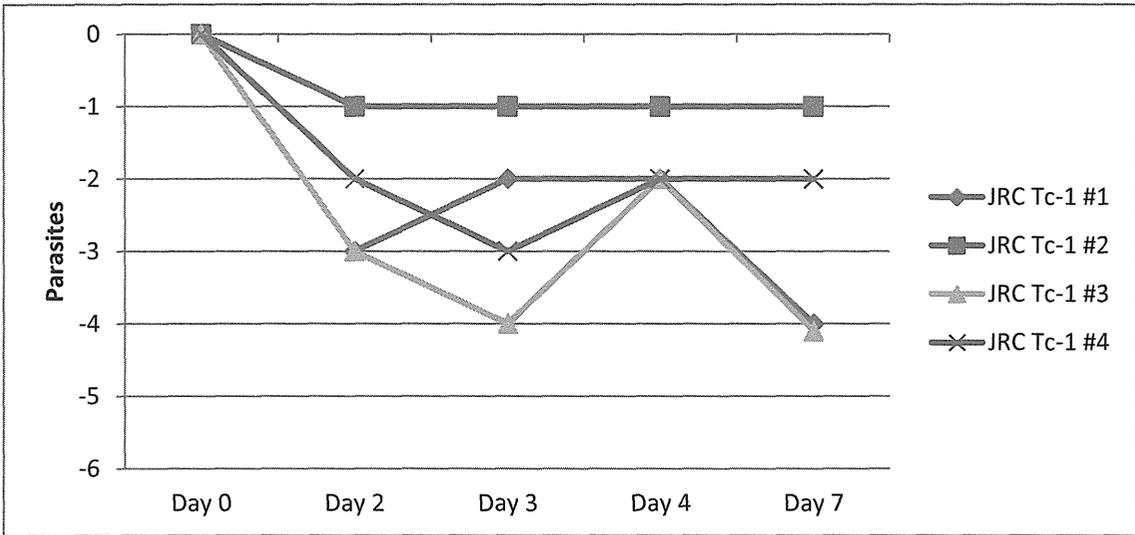


図2 PC 中における *T. cruzi* の動態

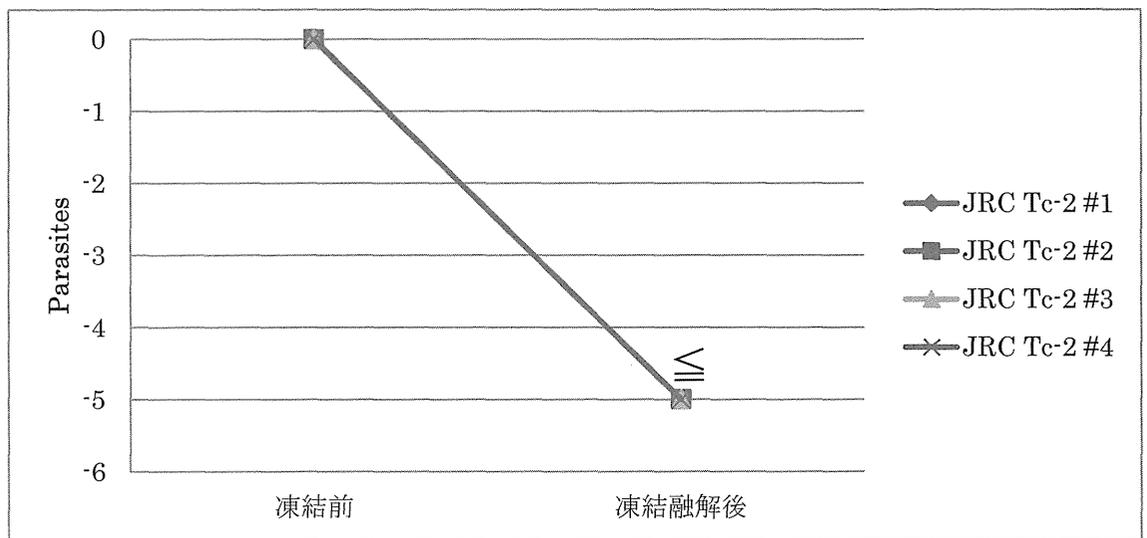
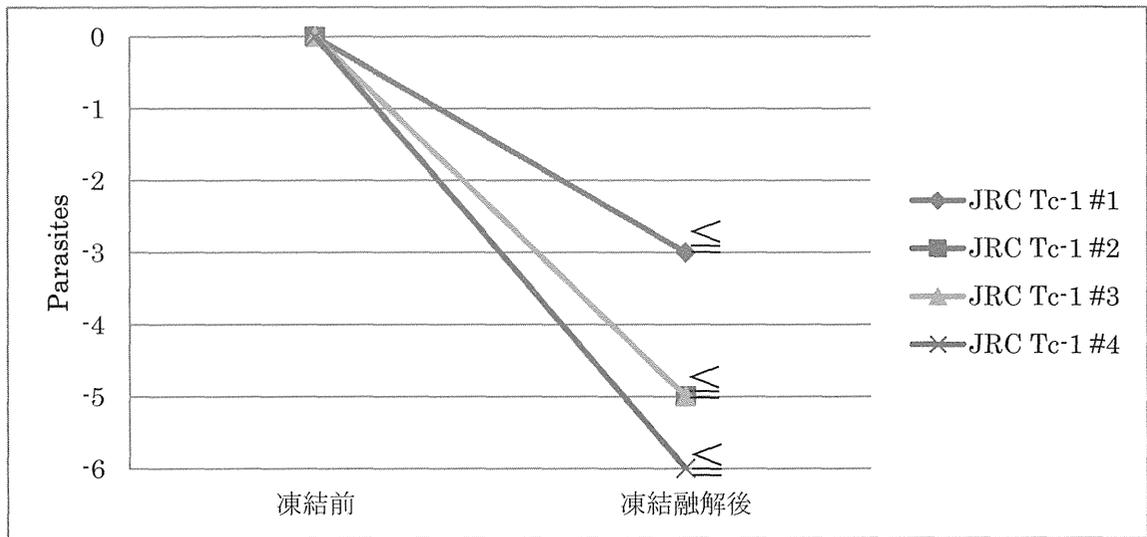


図3 FFP 中における *T. cruzi* の動態

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

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
Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, et al.	Identification of TL-Oml, an Adult T-Cell Leukemia (ATL) Cell Line, as Reference Material for Quantitative PCR for Human T-Lymphotropic Virus 1.	J Clin Microbiol.	53(2)	587-596	2015
Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, Matono T, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N.	Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014.	Euro Surveillence.	19(4)	pii: 20683	2014
朽谷健太郎、清水恒弘、篠原浩、土戸康弘、モイメンリン、高崎智彦	オーストラリア渡航中に発症したロスリバーウイルス感染症の本邦発報告	感染症学雑誌	88(2)	155-159	2014

