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

輸血用血液製剤における*Trypanosoma cruzi*原虫の動態

研究代表者　倉根一郎　（国立感染症研究所　所長）
研究協力者　佐竹正博　（日本赤十字社中央血液研究所　所長）
　　　　　　佐山勇輔　（日本赤十字社中央血液研究所）
　　　　　　松本千恵子（日本赤十字社中央血液研究所）

研究要旨

シャーガス病は、*Trypanosoma cruzi*(*T.cruzi*)原虫の感染により引き起こされる疾患であり、主にラテンアメリカで流行している。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り患者に *T.cruzi* が伝播される可能性がある。シャーガス病非流行国において、輸血を介した *T.cruzi* 感染例の主な原因製剤は、血小板製剤である。本研究において、これまで輸血用血液製剤(血小板製剤および血漿製剤)に *T.cruzi* を接種して各輸血用血液製剤中の *T.cruzi* の動態を解析してきた。今回、(1)白血球除去(白除)フィルターの *T.cruzi* の低減化能、(2)赤血球製剤中での *T.cruzi* の動態、さらに(3)低温環境下での *T.cruzi* の増殖性および感染性を解析した。白除フィルターにより、増殖可能な *T.cruzi* は 4 Log 程度の減少が認められた。赤血球製剤中では、増殖可能な *T.cruzi* は、接種 4 日目から 1～2 Log 程度減少し、21 日目では 2～4 Log の減少が認められたが、減少幅にはばらつきが認められた。低温環境下(4℃)にて培養した *T.cruzi* は増殖が認められず、特に 4 日目から amastigotes の減少が認められ 14 日目では検出限界以下となり、感染性も低下していることが考えられた。本邦で使用されている白除フィルターには、*T.cruzi* を低減化させる効果が認められ、さらに赤血球製剤中では、その保管環境により増殖性および感染性が低下し、赤血球製剤による *T.cruzi* 感染のリスクは低いことが示唆された。

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る。主に、中南米地域で流行している。ヒトへの感染は、サシガメおよび汚染された食品による感染の他、キャリアからの垂直感染および輸血・臓器移植による感染がある。

輸血による感染は、これまでシャーガス病非流行国であるアメリカ、カナダ、スペインにおいて、これまで 20 例が同定されている。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、血漿製剤および赤血球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、保管条件や組成成分の異なる血漿および赤血球製剤の保管中の *T.cruzi* の動態を詳細に解析した報告は少なく、これらの製剤の感染性については不明である。さらに、国内で使用されている白血球除去(白除)フィルターの有効性は不明である。

そこで本研究では、輸血用血液製剤へ *T.cruzi* を接種し、白除フィルターの低減化能および通常の保管状態における赤血球製剤の *T.cruzi* の動態を解析した。

*B.*研究方法

(1) *T.cruzi*原虫

*T.cruzi*は、中南米出身キャリアから分離した①JRC Tc-1 (DTUs TcV)および②JRC Tc-2 (DTUs TcII)を用いた。各*T.cruzi*は、Schneider 's Drosophila Mediumに最終濃度が30%になるようにFBSを添加し、25°Cで培養した。原虫数は、顕微鏡下にて細胞計算盤により計測した。

(2) 白除フィルターによる低減化能の解析

白除フィルターは、セパセル・インテグラCA(旭化成メディカル)を用いた。培養した*T.cruzi*(10^8 parasites/Bag)を採血翌日の3名の異なる献血者由来の全血製剤に接種し、白除フィルター前後の血液を一部採取した。採取した血液は、QIASymphony DNA MIDI Kit(QIAGEN)を用い、DNAを抽出後、*T.cruzi*核タンパク質DNAをターゲットとしたプライマー・プローブを用い、qPCRにより*T.cruzi*量を計測した。また、*T.cruzi*混入による白血球除去能への影響をみるため、CD81 DNAをターゲットとしたプライマー・プローブを用い白血球数をqPCRにより計測した。培養は、採取した血液を培養液にて段階希釈後培養を行い、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した。

(3) 赤血球製剤における*T.cruzi*の動態解析

輸血用血液製剤は異なる3名の献血者由来の赤血球液を用いた。培養した*T.cruzi*を各製剤へ接種(10^8 parasites/Bag)後、4°Cにて保管をおこなった。接種後0,4,7,14,21日経過時に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、(2)と同様の方法でおこなった。

(4) 低温環境下における*T.cruzi*の増殖性および感染性の評価

培地に*T.cruzi*(10,000 parasites)を接種し、25°Cおよび4°Cにて培養をおこなった。接種後0,4,7,14,21,28,35,42日経過時にそれぞれ一部採取し、qPCRによる*T.cruzi*量の測定および感染性を評価した。感染性の評価は、採取した*T.cruzi*を段階希釈後、MRC-5細胞(ヒト線維芽細胞、ATCC)に接種し、37°Cにて培養を行った。7日後に細胞を固定後、間接蛍光抗体法によりamastigotesの観察を行った。

*C.*研究結果

(1) 白除フィルターによる *T.cruzi* の除去

qPCR による *T.cruzi* 量では、JRC Tc-1 および JRC Tc-2 は、それぞれ 2 および 3 log 程度の減少が認められた(図 1A)。また、白除フィルター通過後における増殖可能な *T.cruzi* は、両株とも 4 Log 以上減少し、検出限界以下であった。*T.cruzi* 混入により白血球除去能が低下することはなかった(図 1B)。

(2) 赤血球製剤における *T.cruzi* の動態

赤血球液中での再増殖可能な *T.cruzi* 数は、JRC Tc-2 Bag#3 を除き 4 日目以降から減少が認められ、21 日目には 2～4 Log 程度の減少が確認された(図 2)。JRC Tc-2 Bag#3 は、14 日目まで *T.cruzi* の減少は認められなかった。赤血球液の有効期間内である 21 日では、いずれの赤血球液においても増殖可能な *T.cruzi* が確認された。

(3) 低温環境下での *T. cruzi* の増殖性および感染性

25℃で培養を行った *T. cruzi* は、時間の経過と共に増殖が認められたが、4℃では *T. cruzi* の増殖は認められなかった(図 3)。同様に 25℃で培養を行った *T. cruzi* では、amastigotes の増殖が認められたが、4℃での *T. cruzi* は、4 日目から amastigotes の減少が認められ、14 日目以降では検出限界以下であった。両株とも同様の結果であった。

D. 考察

白除フィルターにより*T. cruzi*は、2～3 Log程度の減少が認められ、さらに培養による再増殖可能な*T. cruzi*は、4 Log以上の減少が認められた。これはフィルターがそのトラップ能によって*T. cruzi*を低減化するだけでなく、*T. cruzi*の増殖にも影響を与えていることを示唆するが、詳細は不明である。

また、赤血球製剤は低温(2～6℃)に保管されているため、今回赤血球液中における *T. cruzi*の動態だけでなく低温環境下（4℃）での*T. cruzi*の増殖性および感染性を評価した。その結果、赤血球液中での*T. cruzi*は、製剤有効期限である21日目においても2～4 Log程度の減少を示すだけであったが、低温環境下にて*T. cruzi*を培養すると*T. cruzi*の増殖は認められず、さらに感受性細胞への感染性が低下することが示された。これにより、これまで非流行地域における赤血球製剤を介した*T. cruzi*感染が認められていないのは、低温保存条件により感染性が低下していることが一因であると考えられた。

これまで非流行地域での血液製剤を介した*T. cruzi*感染においては、血漿製剤および赤血球製剤による感染は認められていない。昨年度の本研究において血漿製剤中における*T. cruzi*は、一度の凍結融解により5 Log以上減少し、検出限界以下となることを報告した。さらに本年度の研究にて、白除フィルターによる*T. cruzi*のトラップ能および増殖能の減少、そして赤血球製剤の低温保存による増殖可能な*T. cruzi*の減少および感染性の低下が認められたことから、本邦にて製造される全血採血由来輸血用血液製剤を介した *T. cruzi*の感染は、非常に低いリスクであると考えられた。

E. 結論

白除フィルターにより *T. cruzi* の低減化が認められた。赤血球液中では、*T. cruzi* は保管期間中に増殖可能な *T. cruzi* が認められたが、低温環境下に保管することでその増殖性および感染性が減少することから赤血球液による *T. cruzi* の感染リスクは低いことが示唆された。

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

国内学会

1. 佐山勇輔、松本千恵子、三浦左千夫、渕崎晶宏、内田茂治、佐竹正博、田所憲治．輸血用血液製剤における *Trypanosoma cruzi* (シャーガス病)の

動態．第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会．2015 年 5 月 28 日-30 日(東京都)

2．佐山勇輔、山岸尚仁、松本千恵子、内田茂治、永井正、佐竹正博：輸血用血液製剤における製造および保存条件による *Trypanosoma cruzi* (シャーガス病)の動態．- 白血球除去フィルターおよび赤血球製剤を中心に-．第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会．2016 年 4 月 28 日-30 日(京都市)

***H*.知的財産権の出願・登録状況**

なし