

分担研究報告書

日本の献血者における *Trypanosoma cruzi* 抗体陽性率の調査

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 (日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所 所長)
佐山勇輔 (日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)
高倉明子 (日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)
松本千恵子 (日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)
古居保美 (日本赤十字社血液事業本部)
平 力造 (日本赤十字社血液事業本部)

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、主に中南米諸国で流行している。感染者(キャリア)の末梢血や臓器には原虫が存在するため、キャリアからの輸血や移植などにより患者に *T. cruzi* が伝播する可能性がある。これまで、シャーガス病非流行地域であるカナダやスペインでは、中南米諸国出身献血者からの輸血により *T. cruzi* の感染が報告されている。日本国内には中南米諸国出身者や中南米諸国長期滞在者が多数居住しているが、それらの人々の献血血液の *T. cruzi* 抗体陽性率などは不明である。そこで本研究では、シャーガス病のリスクがあると考えられた献血者(中南米諸国出身者や中南米長期滞在者)を対象に抗体検査を実施した。検体は、2002年4月1日から2012年10月14日までは、日本赤十字社の献血者情報データベースに保管されていた中南米滞在歴を有する献血者のうち、血小板製剤の製造履歴がある献血者を対象とした。また、2013年1月8日から2016年8月21日までの期間に上記の有リスク献血者によって献血された血液を検体として用いた。抗体検査法は、ELISA(オーソ社)でスクリーニングを行い、陽性検体は同ELISAで二重試験を行った。ELISAで2/3以上陽性を示した検体は、CLIA(アボット社)を用いて確認試験を行った。確認試験で陽性を示した検体を抗体陽性と判定した。のべ18,487検体を検査し3検体(0.016%)が抗体陽性と判定された。抗体陽性者3名は、全て中南米諸国出身者であった。1名の抗体陽性者は、複数回献血歴があったため遡及調査を行った。検査可能であった5名の受血者は、全て抗体陰性であった。日本での献血血液においては、*T. cruzi* 抗体陽性者は中南米諸国出身者に限られたが、一定の感染者が認められた。しかしながら、これまで日本国内では、輸血を介した *T. cruzi* 感染は確認されていない。

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、主に、中南米諸国地域で流行している。

ヒトへの感染は、ベクターであるサシガメによる刺咬および汚染された食品による感染の他、*T. cruzi* 感染者(キャリア)からの垂直感染や輸血および臓器移植による感染が

ある。

シャーガス病非流行地域であるカナダやスペインでは、これまで中南米諸国地域出身献血者由来の血液を介し感染が報告されている。原因となった血液製剤は、主に血小板製剤であった。

日本国内にも、中南米諸国出身者や中南米諸国への長期滞在者が多数居住し、その中には *T. cruzi* 感染者が存在していることがすでに報告されている。また血液センターでは中南米出身者・長期滞在者による献血も多数受け入れている。そのため、シャーガス病にリスクがあると考えられる上記の献血者の血液は、2012年10月15日から血漿分画製剤用の原料血液への使用に制限する安全対策を実施している。しかしながら、シャーガス病にリスクがあると考えられる日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率は不明である。

そこで本研究では、シャーガス病にリスクがあると考えられる日本の献血者における *T. cruzi* 抗体陽性率を調査した。

B. 研究方法

(1) 国際標準品を用いた *T. cruzi* 抗体検査試薬の感度の評価

WHO国際標準品(NIBSC, 11/216, TcIおよびTcII)は、*T. cruzi*抗体陰性血漿を用い段階希釈を行った。段階希釈した標準品を用い、各抗体検査試薬の感度を求めた。抗体検査試薬は、(1)ELISA(オーソ社)、(2)CLIA(アボット社)、(3)ESA(アボット社)、(4)IFA(in-house)、(5)PA(富士レビオ)、(6)ICT-1(Chembio社)、(7)ICT-2(Inbios社)、(8)ICT-3(Inbios社)を用いた(表1)。IFAは、

当施設で培養した *T. cruzi* を抗原として作成した。作成したIFAのカットオフ値は、80倍希釈とした。IFAを除いた検査試薬は、添付文書の方法に準じて行った。

(2) シャーガス病のリスク因子および献血者検体

2013年1月8日から2016年8月21日に「中南米諸国で生まれた、又は育った」、「母親が、中南米諸国で生まれた、又は育った」、「中南米諸国に通算4週間以上滞在、または居住したことがある」をシャーガス病のリスク因子とし、問診時に献血者に伺い、該当した献血者のうち、調査への同意が得られた献血者の血液を採取した。

(倫理面への配慮)

本研究は、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2012-009)

(3) 保管検体

2002年4月1日から2012年10月14日に採血され、日本赤十字社の献血者情報データベースに保管されていた献血者のうち、過去に中南米諸国への滞在歴等を申告され、血小板製剤を製造した献血者の保管されていた血液を採取した。

(4) 抗体検査法および遺伝子検査法

抗体検査法は、ELISAを用いスクリーニングを行った。反応が認められた検体は、同じELISAを用い二重試験を行った。ELISAにより2/3以上陽性を示した検体は、CLIAを用い、確認試験を行った。確認試験で陽性を示した検体を、抗体陽性と判定した。

遺伝子検査法は、まず1mLの血液を用い QIASymphony DNA MIDI Kit(QIAGEN)により

DNA抽出をおこなった。抽出したDNAを用い、TaqMan PCR法(*T. cruzi*サテライトDNAをターゲットとした各プライマー・プローブ)で *T. cruzi* DNAの増幅を試みた。

C. 研究結果

(1) 国際標準品による *T. cruzi* 抗体検査試薬の感度評価

段階希釈した各国際標準品を用い、計 8 種類の試薬の感度評価を行った。その結果、TcI 標準品においては、CLIA が最も感度が高く 0.016 IU/mL であった。次いで ELISA および ESA の感度が高かった(表 2)。TcII 標準品においても TcI と概ね同様の結果であった。

(2) リスク因子に該当した献血者検体における *T. cruzi* 抗体陽性率および遺伝子検査の結果

2013 年 1 月 8 日から 2016 年 8 月 22 日までに該当した献血者検体は 13,709 本、2002 年 4 月 1 日から 2012 年 10 月 14 日に該当した献血者検体は 4,778 本、合計 18,487 検体について抗体検査を行った。その内、ELISA により複数回陽性 (2/3 以上) を示した検体は、12 検体(0.065%)であった。また、ELISA および CLIA で陽性を示し、抗体陽性と判定された検体は、3 検体(0.016%)であった。3 名とも中南米諸国出身者による 2013 年以降の献血であり、その内 2 名は、リスク因子の + に該当し、1 名は のみに該当した。TaqMan PCR 法により 3 名の抗体陽性献血者のうち、1 名から *T. cruzi* DNA の増幅が認められた。あとの 2 名の血液からは *T. cruzi* DNA は検出されなかった。

(3) 遡及調査

T. cruzi 抗体/*T. cruzi* DNA が陽性であった 1 名は、過去に複数回の献血歴があり、11 本の輸血用血液製剤が医療機関に供給されていたため、遡及調査を実施した。その結果、受血者 5 名はすでに多病死していたが、検査可能であった 5 名の受血者は、全て抗体陰性であった。残り 1 名は高齢のため、承諾が得られなかった。

D. 考察

入手可能であった *T. cruzi* 抗体検査試薬について、国際標準品を用いて感度評価を行った。CLIA および ELISA は、高い感度を有しており、本研究で使用した抗体検査試薬は、適切な検査法であったと判断された。

シャーガス病のリスクがあると考えられた国内の献血者検体を用いて *T. cruzi* 抗体検査を行った。その結果、該当した 18,487 検体中、ELISA のみ陽性は 12 検体、ELISA および CLIA 両検査で陽性を示したのは 3 検体であった。異なるメカニズムの二つの方法を用いることによって高い特異度も実現されていると考えられた。カナダやアメリカなどのシャーガス病スクリーニング検査でも異なる二種類の方法により *T. cruzi* 抗体検査を行い、結果を確定している。今回、シャーガス病に関する安全対策を実施した 2012 年 10 月 15 日以前の献血で、中南米諸国に滞在歴がある献血者から採血され、血小板製剤に使用された血液について抗体検査を行ったが、抗体陽性者は認められなかった。そのため、安全対策以前の輸血を介した *T. cruzi* 感染の可能性は、限りなく低いと考えられた。

*T. cruzi*抗体陽性/DNA陽性の1名には、複数回献血歴があったため、遡及調査を実施した。検査が可能であった受血者5名は、全て抗体陰性であり、当該献血者由来の血液製剤を介した*T. cruzi*感染は、認められなかった。これら5名に使用された血液製剤は、全血採血由来の新鮮凍結血漿および赤血球液であった。これまで非流行地域での輸血を介した*T. cruzi*感染の原因製剤は、主に血小板製剤であり、一部全血製剤が原因であるとされている。昨年度の我々の報告では、全血採血由来の製剤に使用される白血球除去フィルターおよび新鮮凍結血漿、赤血球液の保存条件は、*T. cruzi*の数および細胞への感染能を低下させることを示した。今回、輸血を介した*T. cruzi*感染が認められなかったのは、使用されていた製剤の種類も一因であった可能性もある。

シャーガス病のキャリアを原因とした輸血感染は、非流行地域においては重要な問題の一つである。実際、カナダおよびヨーロッパ諸国などの輸血に関する安全対策では、中南米諸国出身であることおよび滞在歴があることなどをリスク因子として献血者を選択し、スクリーニング検査を実施している。これまで日本国内のシャーガス病にリスクがあると考えられた献血者の*T. cruzi*抗体陽性率は不明であったが、本研究により、リスクのある献血者の0.016%が抗体陽性であった。これは、カナダ(0.089%)やスペイン(0.622%)に比べ低い結果であった。また今回、本人もしくは母親が中南米諸国出身者であった献血者からのみ陽性者が認められた一方、中南米諸国に滞在歴がある人からは抗体

陽性者は認められなかった。日本においては、シャーガス病のリスク因子としては、中南米諸国滞在歴よりも、本人もしくは母親が中南米諸国出身者であることの方が重要であることが示唆された。

以上の結果から、日本の献血者全体での*T. cruzi*抗体の陽性率は極めて低いものの、陽性者は確実に存在することから、有リスク献血者についてはスクリーニングをする必要性が確認された。現在の献血の検診では、「中南米諸国で生まれた、又は育った」、「母親および母方の祖母が、中南米諸国で生まれた、又は育った」、「中南米諸国に連続して4週間以上滞在、または居住したことがある」に該当する献血者を対象に*T. cruzi*抗体スクリーニング検査を実施している。

E. 結論

シャーガス病にリスクがあると考えられた日本の献血者における*T. cruzi*抗体陽性率は、3/18,487 (0.016%)であった。遡及調査により、*T. cruzi*抗体陽性/DNA陽性献血者由来の血液を介し、検査可能であった受血者5名は、*T. cruzi*の感染は認められなかった。国内における輸血による*T. cruzi*感染はこれまでのところ確認されていない。

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) Furui Y, Ishinoda M, Sayama Y et al.
THE RISK OF TRANSFUSION-TRANSMITTED
CHAGAS ' DISEASE IN JAPAN, 33rd
International Congress of the
International Society of Blood
Transfusion. Seoul, 2014.

(2) SAYAMA Y, MATSUMOTO C, SOBATA R et
al. EVALUATION OF SEROLOGICAL AND PCR
METHODS FOR DIAGNOSIS OF CHAGAS DISEASE
CAUSED BY *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION.
33rd International Congress of the
International Society of Blood
Transfusion. Seoul, 2014.

(3) 古居保美、輸血感染症とその安全対策
シャーガス病、第 39 回日本血液事業総会、
大阪府、2015 年

H.知的財産権の出願・登録状況
なし