

分担研究報告書

輸血血液におけるHTLV-2の検出法開発に関する研究

研究分担者 大隈 和 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨：近年我が国ではHTLV-1感染者が感染率の高いとされる九州・沖縄地方から大都市圏に拡散する傾向にあり、全国的な対策が進んでいるが、HTLV-1の近縁株のHTLV-2の国内感染の報告はこれまでほとんどなく、HTLV-2の感染対策は充実していない。しかしながら海外ではHTLV-1だけでなくHTLV-2の感染が問題となっており、供血スクリーニングにHTLV-2検査を実施する国も少なくない。HTLV-2が将来的に日本の国内に侵入し蔓延することが懸念される。そこで本研究では、HTLV-2を検出できるPCR primerセットを新規に複数準備し、PCRを用いたHTLV-2核酸検査法を確立することを目的とした。最も増幅効率の良いprimerセットを選択し、HTLV-2感染細胞株を用いて本検査法の感度を調べた。その結果、 10^4 コピー/ 10^4 細胞程度の感度を確認できた。現在、本検査法の有効性をさらに評価するための、臨床検体の準備を進めている。今後もHTLV-2の国内侵入・感染の発生に備えて、核酸検査法などを整備、充実させていくことが必要と考えられた。

研究協力者

相良康子 日本赤十字社九州ブロック血液センター
課長

倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
研究員

せる必要がある。

本研究では、HTLV-2の国内感染の発生に備えて、感染を確認することができるHTLV-2核酸検査法を確立することを目的とした。

A．研究目的

ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)は、1986年に献血スクリーニング検査が導入されて以来、日本国内で輸血感染例はなく輸血の安全性が高いレベルで保たれている。またHTLV-1のスクリーニング検査が2010年末に妊婦健診項目に追加され、日本国内の検査体制が充実しつつある。HTLV-1の近縁株であるHTLV-2については、国内感染の報告はこれまでにほとんどなく、献血や妊婦健診においても抗体スクリーニングは実施されていない。

しかしながら世界的にはHTLV-1に加えHTLV-2の感染が問題となっており、海外で使用される主なHTLV抗体検査の体外診断薬では、HTLV-1およびHTLV-2の両方の抗体を検出するシステムが組まれている。例えば、米国では供血スクリーニングでHTLV-1/2の抗体検査が実施され、HTLV-2感染者はHTLV-1感染者の約3倍多く、14.7人/100,000人と報告されている。またブラジルにおいてもHTLV-1/2の感染率は0.4～10/1,000人と多く、1993年から献血スクリーニングにHTLV-1/2両方の抗体検査が導入されている。

これまでHTLV-2の主な流行地域は、アフリカや北アメリカ、中央アメリカ、南アメリカと考えられてきたが、人類社会がグローバル化した現代において、日本国内にHTLV-2が侵入しないことは想定しにくく、HTLV-2感染が国内で蔓延する前に検査体制を充実さ

B．研究方法

・HTLV-2 PCRとアガロース電気泳動

HTLV-2を検出可能な複数のPCR primerセットを用意し、キット添付のプロトコルに従って、HTLV-1感染細胞株(TL-Om1)又はHTLV-2感染細胞株(Ton1)のgenomic DNAを非感染者の末梢血単核球(PBMC)のgenomic DNAで希釈したものをを用いてPCRを行った。PCR断片は、0.8%アガロース電気泳動で検出した。

・臨床検体の準備

日本赤十字社九州ブロック血液センターの献血スクリーニング検査においてHTLV-1陽性であるものの、確認検査のWestern blot (WB)法で判定保留となった検体のうち、HTLV-1核酸検査を実施しプロウイルスDNAが検出されなかった検体を選択した。

（倫理面への配慮）

HTLV-1判定保留臨床検体を用いたHTLV-1核酸検査の実施については、国立感染症研究所の倫理審査で承認されている。

C．研究結果

・HTLV-2 primerのスクリーニング

Primerの設定については、HTLV-1 (NCBI Accession No. J02029), HTLV-2 (NC_001488), HTLV-3 (DQ093792), HTLV-4 (NC_011800) 遺伝子の相同性を解析し、特に相同性の高い遺伝子領域(nts

7,000-8,000bps)で複数の候補Primerを設定した(Table 1)

Table 1 Primerリスト

Forward Primer	HTLV-2 nt NC 001488
Fwd1: GCCCAYTTCCCAGGWTTYGGACAGAG	7213-7238
Fwd2: GCGAYTGTGTACARGCCGAYTGGTG	7271-7295
Fwd3: ACCTGGGACCCCATCGATGGACG	7372-7394
Fwd4: SCTCTMCAATTCTTATCCCTCG	7408-7430
Fwd5: CTCCGKCCCAAAACRTGTACACC	7621-7644

Reverse Primer	HTLV-2 nt NC 001488
Rev1: CGTCCATCGATGGGGTCCAGGT	7394-7372
Rev2: GGTGTACAYGTTTTGGGGMCGGAG	7644-7621
Rev3: CYTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT	7999-7975
Rev4: GAYTGTAGYACYAAAGATGGCTG	8027-8005

HTLV-1遺伝子およびHTLV-2遺伝子がそれぞれ染色体にインテグレートされている細胞株TL-Om1およびTon1から genomic DNAを抽出し、設定したForward primerとReverse primerを組み合わせて、それぞれのウイルス遺伝子のPCR増幅を検討した。その結果、15パターンのPrimerセットの組み合わせのうち、Fwd1-Rev4, Fwd3-Rev3, Fwd5-Rev3の3セットが高いPCR増幅効率を示した。この中で、PCR増幅が最も良好であったFwd3-Rev3を増幅Primerとして選択した。

・HTLV-2 primerの感度確認

次に、TL-Om1およびTon1から抽出した genomic DNAを非感染者PBMCから抽出した genomic DNAで段階希釈し、増幅Primer Fwd3-Rev3を用いたPCRの感度を調べた。その結果、TL-Om1では、感染細胞のゲノムが2 pg/reaction (希釈率で 10^{-3} %)まで検出が可能であった。またTon1では、20 pg/reaction (希釈率で 10^{-2} %)まで検出可能であった。これらの結果から、Fwd3-Rev3 primerでは、HTLV-1は1コピー/ 10^4 細胞、HTLV-2は10コピー/ 10^4 細胞までの低い割合で末梢血中に存在した場合に検出が可能であると考えられた (Figure 1)。

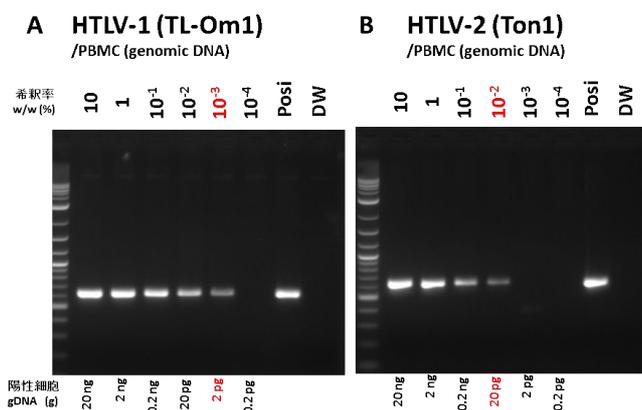


Figure 1 新規HTLV-2検出Primerの感度確認

・臨床検体の準備

日本赤十字社から供与された、献血スクリーニングにおけるHTLV-1抗体検査のWB法判定保留検体のうち、HTLV-1核酸検査で検出感度以下となった検体が複数得られた。これらの検体について、Fwd3-Rev3を用いた本核酸検査法により、HTLV-2の検出を試みる。

D. 考察

将来的に国内にHTLV-2の感染例が発生した場合を想定して、HTLV-2を検出できるPrimerをスクリーニングし、良好にPCR増幅を示すPrimerセットを同定した。今回新規に検討したPrimerでは、PBMC 10^4 細胞中に10コピー程度の感染細胞を検出できることが予測されたが、この感度は1反応で使用したDNA量(200ng)から推測した場合、PCRの検出限界付近の感度であると考えられる。よって新規Primerは、HTLV-2に対しても比較的高い感度を持っていると考えられる。

またHTLV関連・近縁株との相同配列の解析の結果、新規に同定したPrimer Fwd3-Rev3は、HTLV-2のみならず、HTLV-3/4, STLV-1/2とも高い相同性を示すことが明らかになった (Figure 2)。

	Forward primer	Similarity	Reverse primer	Similarity
HTLV-1	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 23	100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 25	100%
	Sbjct 7483 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 7505		Sbjct 8110 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 8086	
HTLV-2	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 23	100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 25	92%
	Sbjct 7374 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 7396		Sbjct 7999 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 7975	
HTLV-3	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 23	100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 25	96%
	Sbjct 7403 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 7425		Sbjct 8030 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 8006	
HTLV-4	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 23	100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 25	92%
	Sbjct 7278 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 7300		Sbjct 7905 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 7881	
STLV-1	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 23	96%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 25	92%
	Sbjct 7456 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 7478		Sbjct 8059 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 8035	
STLV-2	Query 1 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 23	100%	Query 1 CTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 25	92%
	Sbjct 7326 ACCTGGGACCCCATCGATGGACG 7348		Sbjct 7953 GTTTRGGGCARGGCCCGAAATCAT 7929	

Figure 2 Fwd3およびRev3のHTLV近縁株とのHomology

このことから、HTLV-1抗体検査では判定不能であるもしくは判定が困難な検体などを用いて本PrimerによるPCRで検討することにより、既知・未知のHTLV関連・近縁株を網羅的に検出できる可能性があると考えられた。

E. 結論

本年度の検討により、将来的なHTLV-2国内感染の発生に備えて、HTLV-2核酸検査法の整備・充実に取り掛かることができた。今後は臨床検体を用いて検討を進め、正確にHTLV-2または近縁株を検出できるか評価し、本検出系の有用性について明らかにしていく。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, et al.
Identification of TL-Om1, an Adult T-Cell Leukemia
(ATL) Cell Line, as Reference Material for Quantitative
PCR for Human T-Lymphotropic Virus 1.
J Clin Microbiol. 2015;53(2):587-596.

2. 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

