

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

輸血血液におけるデングウイルスおよび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：輸血用血液を含む血液製剤は、ヒトの血液を原料とするためウイルス等の病原体混入のリスクが存在する。一方本邦で製造される血液製剤は、抗体検査やNATなど極めて精度の高い方法によって病原体スクリーニングが実施され、その安全性が担保されてきた。しかしながら、新興・再興感染症の原因ウイルス等に対する検査体制については十分な整備がなされておらず、日本国内への移入に備え早急な対応が求められている。特に、デング熱の原因となるデングウイルスは昨年約70年ぶりに国内感染が確認され、今後も感染の拡大及び血液製剤への混入が危惧されている。血液製剤の安全性を確保するためには原料血漿や血液製剤などに微量に混入した病原体を高感度に検出できる方法が不可欠であるが、現存の検査系においては感度が不十分であり改善が必要であった。そこで本研究では、血液製剤の安全性評価への適用を想定し、マルチプレックスPCR法を用いたデングウイルスの新規高感度検出系を確立した。本年度は特にデングウイルスの検出法開発を優先的に推し進め、HTLV-2の検出法開発は昨年の研究を継続した。

研究協力者

倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
研究員
手塚健太 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
任期付研究員
浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
部長
高崎智彦 国立感染症研究所 ウイルス第一部
室長

A . 研究目的

血液製剤の安全性を担保する上で、病原体の混入を防止及び製造過程より排除することは極めて重要な課題である。国内の献血血液に対して日本赤十字社でこれまでにHBV, HCV, HIV 等々の様々な病原体に対して高感度なスクリーニング検査を実施しており、本邦における血液製剤のこれらの病原体に対する安全性は極めて高く管理されている。しかしながら、海外への渡航者などを介して、本来は国内に存在しなかった病原体の輸入症例が増加しており、新規感染症の本邦での定着が危惧されている。実際、デング熱やデング出血熱の原因となるデングウイルス (DENV)においては、約 70 年ぶりに東京を中心として国内感染事例が発生した。DENV の感染者は無症候である場合も多く、献血血液を介した DENV の血液製剤への混入を検出し、感染の拡大を未然に防止する高感度検査法が必要である。

これまで、国立感染症研究所において DENV の輸

入症例等に対して依頼検査を行ってきたが、DENV 核酸検査に用いられる Primer 及び Probe セットが、献血血液や血液製剤の原料血漿などに混入した DENV を高感度に検出可能であるかについてはこれまで十分に検討されていなかった。血液製剤の製造過程で大幅に希釈されると想定される DENV を検出するためには、極めて高感度な検出法が必要であり、既存の手法を再検討・改善する必要があると考えられる。

そこで本研究においては、デングウイルス各血清型の RT-PCR 用 Primer 及び Probe を大規模スクリーニングすることにより、新規高感度 Primer 及び Probe を同定し、これらの Primer 及び Probe を用いて検出系を最適化した後、全血清型の高感度同時検出が可能な新規マルチプレックス PCR 法を確立することを目的とした。

B . 研究方法

・ DENV特異的Primer及びProbeの大規模スクリーニング

Primer Express ver3 ソフトウェア (Life Technologies) を使い Primer 及び Probe を設計した。Primer のスクリーニングには SYBR Green PCR Master Mix の推奨プロトコルに従い、Probe (FAM 標識) のスクリーニングには RNAt0Ct One-Step RT-PCR キットの推奨プロトコルに従って、real-time RT-PCR を行った。各血清型で最も効率良く PCR が実施されるオリゴセットを同定した。

・DENVゲノムRNAの精製

Vero細胞で増やした培養上清中のDENVゲノムRNAは、QIAasymphony DSP virus/pathogen kitを用いて、QIAasymphonyにプログラムされた抽出プロトコルで抽出した。

・新規マルチプレックスPCR検出系の構築

マルチプレックスPCR法は、同定したPrimer及びProbeを用い、QuantiTect Multiplex RT-PCR kitの推奨プロトコルに従い検討・実施された。各血清型のProbeはそれぞれ異なる蛍光色素で標識した(DENV-1: FAM, DENV-2: VIC, DENV-3: NED, DENV-4: Cy5)。

C. 研究結果

・DENV特異的高感度Primer及びProbeの同定

DENV-1, 2, 3, 4の各血清型について、ForwardおよびReverse Primerセットをそれぞれ108, 80, 72, 71セット(合計約350セット)を設計した。SYBR Greenを用いたreal-time RT-PCRの結果、各血清型についてそれぞれ17, 14, 18, 18セットの優良なPrimerセットを同定した。同定したPrimerセットについて、Taqman MGB Probeを設計した。それぞれの血清型について11~13セットのProbeを準備し、同じ分離株を用いてTaqman PCRを行った。その結果、各3~4セットのプロープが極めて優れた増幅を示した。さらに、同定したPrimer及びProbeを用いて、国立感染症研究所ウイルス第一部で解析された輸入症例の核酸(全52株)を検体として、各オリゴセットの検出能を検討した。その結果、最も検出域、感度、特異性に優れると考えられる各オリゴセットの組み合わせを決定した。

・マルチプレックスPCRによる4血清型の同時検出

DENVは4つの血清型が存在するため、DENVの検出及び血清型判別のためには、これまで数回のPCR反応が必要であった。しかし、1回のPCR反応で全ての血清型が検出可能であれば、コスト面の改善や煩雑な作業が簡略化されることでコンタミネーションのリスクも低下し、より有用性が高まると期待される。そこで、今回同定した新規オリゴセットを用いて、マルチプレックスPCR法による新規DENV検出系の構築を試みた。QuantiTect Multiplex RT-PCR kitと同定したオリゴセットを用いてマルチプレックスPCR反応を実施したところ、非特異的な反応が見られず、かつ異なる蛍光色素で標識された各血清型に特異的なシグナルの検出が可能であった(Figure 1)。また、DENV臨床分離株を鋳型として各血清型のシングルプレックスPCRとマルチプレックスPCRの検出感度を比較したところ、2つの検出系は各血清型において同等のCt値を示した(Table 1)。さらに、DENV以外の種々の核酸を鋳型として検討したところ、非特異的な反応は見られなかった。

以上のことから、構築した新規マルチプレックス

PCR法は、感度・特異性共にシングルプレックスPCRと同等であり、かつ1反応当たりのコストが低く、より簡便で有用な手法であると考えられた。

Serotype	Strain	Ct value	
		Singleplex	Multiplex
DENV-1	01-44	27.2	27.3
DENV-2	12-26	26.2	26.6
DENV-3	00-40	25.9	26.1
DENV-4	08-11	26.0	27.1

Table 1. シングルプレックスとマルチプレックスPCRの比較

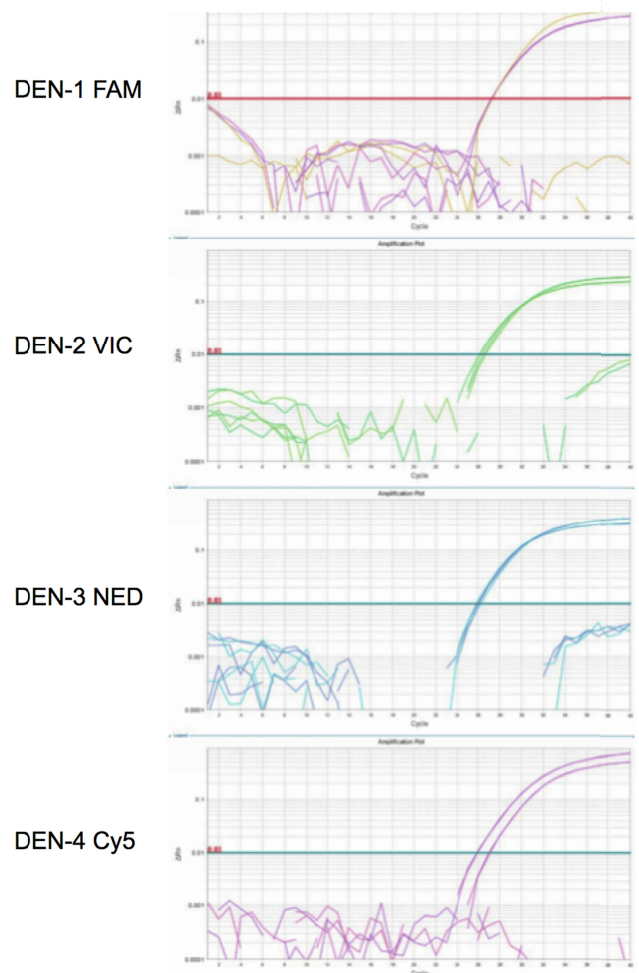


Figure 1. 各血清型におけるマルチプレックスPCRの特異性

D. 考察

DENVは昨年8月に約70年ぶりに国内感染例が発生し、当該ウイルスに対する血液製剤の安全性確保は喫緊の課題となった。

本研究では、DENV特異的なPrimer及びProbeの大規模スクリーニングによって、多数の新規オリゴセットを得ることが出来た。これらのオリゴセットの中から、さらにDENVの臨床分離株を用いて選

定を行うことで、感度・特異性そして検出域の非常に優れたオリゴセットを同定した。

国立感染症研究所を中心に、これまで DENV の検査・検出に用いられてきた PCR 法は主にシングルプレックス PCR 法であったが、DENV は 4 つの血清型が存在するために複数の PCR が要求されるなどアッセイ系が煩雑になっていた。本研究においては、1 反応の PCR で全ての血清型を高感度・特異的に検出するマルチプレックス PCR 法の確立に成功した。この新規手法は、アッセイ当たりの実質コストが半減以下になるだけでなく、簡便で、かつこれまでの手法よりも高感度であると考えられた。今後は、血液製剤や原料血漿などにおいて、微量な DENV の混入をスクリーニングする手法として有用と考えられ、血液製剤の安全性確保に寄与することが期待される。

さらに、今回の研究で確立した Primer 及び Probe の大規模スクリーニング、その後の高感度マルチプレックス PCR 法の確立は、DENV に限らず多くの病原体についても応用可能であると考えられる。新興・再興感染症など、検査法の十分な検討が進んでいない分野について、画期的な手法を提供する可能性がある。

E . 結論

本研究により、DENV 全血清型特異的な高感度マルチプレックス PCR 法を確立した。本検査法は、特にこれまで困難であった血液中の微量な DENV の検出に有用であり、献血血液などのスクリーニングに適していると考えられる。本検査法の開発は、今後の血液製剤の安全性確保に繋がることが期待される。

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
なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特願 2015-215906

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

