

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HTLV-2については、近年日本で使用されるHTLV-1抗体検査法にも取り入れられ、今後はHTLV-1およびHTLV-2の同時検査が主流となることが予想される。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、HTLV-2の新規高感度検出系を確立し、検出感度について検討した。

研究協力者

倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
主任研究官

手塚健太 同上 任期付研究員

浜口 功 同上 部長

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, HTLV-1 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、近年の抗体検査法の発展により HTLV-1 抗体検査に HTLV-2 抗体検査も含むことができるようになり、今後は HTLV-1/2 同時測定となることが期待されている。これまで日本では献血や妊婦のスクリーニング検査、その他 HTLV-1 関連疾患疑い等において、HTLV-2 抗体検査は行われておらず、HTLV-2 の感染が検出される事は極めて稀であった。よって、HTLV-2 抗体陽性例に対して感染を確定するための 1 つの重要なツールである核酸検査法についても十分に整備されていない。

そこで本研究においては、HTLV-2 核酸検査用の高感度 Primer & Probe を大規模スクリーニングすることにより、新規に高感度 Primer & Probe を多数同定し、同定した HTLV-2 Primer & Probe にこれまで同定した HTLV-1 高感度 Primer & Probe を組み合わせ、HTLV-1/2 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

・HTLV-2 Primer & 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 I PCR Master Mix (Takara) 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 Taqman Fast Advanced master mix qPCR キット (Applied Biosystems) の推奨プロトコルに従って行った。最も効率良く PCR が実施されるオリゴセットを同定した。

・HTLV-2 ゲノム DNA の精製

HTLV-2 感染細胞株 Ton1 および MoT 細胞から、QIASymphony DSP Blood DNA midi kit を用いて、QIASymphony にプログラムされた抽出プロトコルで抽出した。

C. 研究結果

・HTLV-2 特異的高感度 Primer 及び Probe の同定

Forward および Reverse Primer セットを 183 セット設計した。HTLV-2 感染細胞 MoT 細胞株および Ton1 細胞株より抽出した genomic DNA と pH6neo (HTLV-2 分子クローンプラスミド) を用いて SYBR Green I で qPCR による Primer スクリーニングの結果、52 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、登録配列との相同性を考慮し、Taqman MGB Probe を設計した。その結果 27 セットの Probe の設計が可能であった。MoT 細胞 genomic DNA を用いて Taqman qPCR を行った。その結果、27 セット中 5 セット (008, 026, 071, 088, および 100) が極めて優れた核酸増幅を示した (Figure 1)。同定した 5 セットのそれぞれの HTLV-2 のターゲット遺伝子領域は、008: LTR, 026: gag, 071: pol, 088: pol, 100: env であった。

Figure 1. HTLV-2 高感度核酸検査用 Primer & Probe のスクリーニング

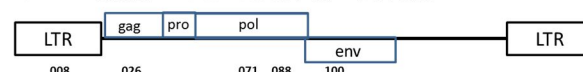
A. HTLV-2 高感度 Primer & Probe スクリーニング結果のフロー

Primer 設計	配列チェック (登録株との比較)	SYBR Screening	Probe 合成	Probe Screening
183	140	52	27	5

B. HTLV-2 高感度 Primer & Probe セット

- FAM-MGB 3セット : 008, 026, 071
- FAM-TAMRA 2セット : 088, 100

C. HTLV-2 高感度 Primer & Probe セットのターゲット領域



・ Multiplex qPCRによるHTLV-1/2核酸検出系の検討

抗体スクリーニング検査では、核酸検査によりHTLV-1およびHTLV-2の判別を行うことが予想されることから、1チューブでHTLV-1/2を判別できるMultiplex化が必要である。そこで、これまでにHTLV-1核酸検査用に同定した高感度Primer & Probeと本研究で同定したHTLV-2核酸高感度Primer & Probeを組み合わせ、Multiplex qPCR系を作製した。HTLV-1は、高い相同性でHTLV-1ゲノムと一致する2セット (pX2, 084)を使用した。HTLV-2については、登録配列数が少ないことから遺伝子多型による取りこぼしを防止するために、同定した5セットの中から3セット (008, 026, 071)を選び、HTLV-1および2を合わせて5-plex qPCRとした。HTLV-1陽性例については、HTLV-1のみが検出され、HTLV-2感染細胞ではHTLV-2のみが検出されることを確認した。また非感染者PBMCから抽出したgenomic DNAでは、HTLV-1/2のどちらも検出されないことを確認した (data not shown)。

5-plex qPCRについて、それぞれのsingle qPCRと既報のHTLV-2核酸検査法と感度比較した。MoT genomic DNAをPBMC genomic DNAで超低濃度に希釈した検体を使用して、HTLV-2核酸の検出を試みたところ、5-plex法の検出限界の濃度は、それぞれのsingle qPCRの検出限界濃度とほぼ同等であり、また既報の2つの方法 (Moens et al. 2009およびQater et al. 2011) と同等以上であることが明らかとなった (Table 1)。特にPrimer & Probe 008は、LTRに設定されており、HTLV-2 genome内に2コピー存在する領域であることから高感度であることが期待できる。

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や既報の方法と同等以上の高感度法であり、HTLV-1/2の判別にも簡便で有用な手法であると考えられた。

Table 1. HTLV-2核酸検査法の感度比較結果

MoT / PBMC % (W/W)	HTLV-2 concentrate*	008	026	071	NIID 5-plex	Moens	Water
0.001%	1 copies/ 1.E+05	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
0.0005%	5 copies/ 1.E+06	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
0.000125%	1 copies/ 1.E+06	3/3	3/3	1/3	2/3	3/3	2/3
0.000031%	3 copies/ 1.E+07	4/10	1/10	1/10	6/10	1/10	2/10
human gDNA		-	-	-	-	-	-

* MoTの細胞あたりのHTLV-2感染コピー数を1コピーとして換算した場合の検体中のHTLV-2コピー数。(1μgは約1.5x10⁸細胞であることから、実際には、MoTの細胞あたりの感染コピー数は1コピー以上と予想される。)

D. 考察

HTLV-2抗体検査は、近年日本でもHTLV-1抗体検査に含まれるようになったが、陽性時の確定診断

のための核酸検査等の方法の整備が整っていない。現時点では、HTLV-1/2抗体陽性例に対する確認検査用に日本で使用されているWestern Blot法にはHTLV-2抗体の検出が含まれおらず、HTLV-2抗体陽性確定例は、直ちに発見されるとは考えにくい。WB法を改良した高感度なHTLV-1/2検出法も開発されており、近い将来には高感度なHTLV-2核酸検査は必須となると考えられる。

今回の研究で行ったPrimer及びProbeの大規模スクリーニングで同定したSYBR Green I用Primer、およびその後の高感度Taqman qPCR Probeは、極めて優れたPrimerおよびProbeが同定されていると考えられることから、今後のHTLV-1/2抗体スクリーニング検査陽性例の確定診断法の1つとして応用が期待される。

E. 結論

本研究により、HTLV-1/2高感度Multiplex qPCR法を確立した。献血血液などの抗体スクリーニング検査の確定診断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を期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Kazu Okuma, Isao Hamaguchi, et al. Development of a novel dengue virus serotype-specific multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for blood screening. Transfusion 2016;56:3094-100.

2. 学会発表

手塚 健太, 倉光 球, 大隈 和, 野島 清子, 荒木 久美子, 篠原 直也, 松本 千恵子, 佐竹 正博, 浜口 功. Multiplex RT-qPCRによるデングウイルス4血清型の高感度同時検出法の開発: 第64回日本輸血・細胞治療学会総会、京都、2016年4月28日~30日

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

