

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およびHTLV-2の新規高感度検出系を確立した。

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  
高崎智彦 元国立感染症研究所 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, 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、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。

また、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、DENV 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。また、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

・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RNAtoCt 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、QIAasympyphony DSP virus/pathogen kitを用いて、QIAasympyphonyにプログラムされた抽出プロトコルで抽出した。

#### ・DENV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)。

#### ・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、QIAasympyphony DSP Blood DNA midi kitを用いて、QIAasympyphony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

#### ・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) 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 セットのプローブ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PT-PCRによるDENV4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。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。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。

#### ・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。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。

#### ・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。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。

#### D．考察

DENV は約 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。

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が

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。

これらの新規手法は、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 および HTLV-1/2 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 や HTLV-1/2 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全血清型およびHTLV-1/2に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およびHTLV-1/2の検出に有用であり、献血血液などのスクリーニング（確認検査）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

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 Dengue 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

発明の名称： Dengue ウイルス検出用プライマー対、Dengue ウイルス検出用プローブ及び Dengue ウイルス検出用キット、出願番号：特願2015-215906、出願年月日：平成27年11月2日、発明者：手塚 健太、倉光 球、大隈 和、浜口 功、高崎 智彦

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

