

血液からの重症熱性血小板減少症候群ウイルス等の検出法確立に関する研究

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：我が国では近年、海外での重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)の同定に伴う国内感染例の確認がなされた。SFTSVはウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある。そのため、このウイルスの血液への混入状況をいち早く察知し血液製剤のリスクを低減化する必要がある。そこで本研究では、血液製剤の安全性確保と安定供給に貢献することを目的に、既に国内感染が認められ献血血液等におけるスクリーニング法の整備が急がれるSFTSVの高感度核酸検査法の確立を目指す。本年度は、大規模スクリーニング用に作製したプライマーセットをリアルタイムRT-PCRによりスクリーニング(SYBR)し、増幅効率が良好なオリゴセットを同定した。これらの候補プライマーに対してTaqManプローブを検討後作製し、再度リアルタイムRT-PCRによりスクリーニング(TaqMan)を実施した。最終的に増幅効率が最良で検出範囲の最も広いオリゴセットを同定し、マルチプレックス核酸検査法として開発した。

研究協力者

手塚健太 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
研究員

浜口 功 同上 部長

(本研究は、国立感染症研究所 ウイルス第一部、
日本赤十字社との共同研究である。)

A. 研究目的

本邦で製造される血液製剤は、抗体検査や NAT 等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。

ダニ媒介性のウイルス感染症である重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は、国内では西日本を中心に存在していることが近年分かってきた。しかも、感染報告は少ないものの重篤化することが知られている。原因ウイルスである重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)はウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある。現在既に感染者診断のための検査法は確立されているが、SFTSVが血液に微量に混入した場合に検出が可能な、より高感度の検出法はまだ確立されていない。

そこで本研究では、血液製剤の安全性強化に向けた、SFTSV に対する新規高感度マルチプレックス核酸検査法を開発することを目的とした。具体的には、核酸検査用の高感度プライマー・プローブセットをデザイン後作製し、大規模スクリーニングすることにより、新規に高感度プライマー・プローブセットを複数同定し、新規マルチプレックス PCR 法を確立することを目指す。

B. 研究方法

・新規SFTSV核酸検査法開発のためのプライマーセットの大規模スクリーニング

新規高感度マルチプレックス核酸検査法の開発のために、大規模スクリーニング用のプライマーセットを、J1 株に対し、S 分節を 80 セット、M 分節を 110 セット、L 分節を 160 セット(合計 350 セット)デザインして合成した。これらのオリゴセットをリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング(SYBR)し、増幅効率の良好なセットを選別した。

・新規SFTSV核酸検査法開発のためのTaqManプローブのデザインと作成

SFTSVの新規高感度プライマーを大規模スクリーニングにより同定した。これらの同定した15セットのプライマーに対してTaqManプローブのデザインを試みた。

・SFTSV Japanese株を用いたTaqManスクリーニングによる高感度プローブの決定

上記で作成したTaqManプローブと高感度プライマーを組み合わせ、SFTSV Japanese株由来RNAパネル (J1 : 4株、J2 : 2株、J3 : 2株) を鋳型としてreal-time RT-PCRによるスクリーニングを実施した。

・SFTSV Chinese株を用いたTaqManスクリーニングによる高感度プローブの決定

Japanese株と同様に、SFTSV Chinese株由来RNAパネル (C3 : 1株、C4 : 2株、C5 : 2株) を鋳型としてreal-time RT-PCRによるスクリーニングを実施した。

・マルチプレックスPCRによるSFTSV高感度核酸検査系の確立

SFTSV Japanese株とChinese株を全て高感度に検

出する検査法の確立のため、これまでのスクリーニングで同定したオリゴセットを用いたマルチプレックスPCR法を検討した。

C. 研究結果

・新規SFTSV核酸検査法開発のためのプライマーセットの大規模スクリーニング

合成したプライマー合計 350 セットをリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング(SYBR)し、J1 株に対して増幅効率の良好な 96 セットを選別した。これらのオリゴセットを再度同様にスクリーニングし、J2 株及び J3 株に対して増幅効率の良好な 15 セットを選別した。

・新規SFTSV核酸検査法開発のためのTaqManプローブのデザインと作成

大規模スクリーニングにより同定した、15 セットのSFTSVの新規高感度プライマーに対してTaqManプローブをデザインしたところ、このうち12セットに対してプローブ作成に成功した。

・SFTSV Japanese株を用いたTaqManスクリーニングによる高感度プローブの決定

SFTSV Japanese株由来RNAパネルを鋳型として real-time RT-PCRによるスクリーニングを実施した結果、12セットのプライマー・プローブのうち、全てのSFTSV Japanese株に対して極めて優れた増幅シグナルを示すものを1セット (S-62) 同定した。

・SFTSV Chinese株を用いたTaqManスクリーニングによる高感度プローブの決定

Japanese株と同様に、SFTSV Chinese株由来RNAパネルを鋳型として real-time RT-PCRによるスクリーニングを実施した結果、12セットのプライマー・プローブのうち、C3株及びC4株に対して極めて優れた増幅シグナルを示すものを1セット (S-62)、C5株に対して極めて優れた増幅シグナルを示すものを1セット(S-60) それぞれ同定した。C3株及びC4株を高感度に検出するオリゴセットは、全てのJapanese株を高感度に検出するオリゴセットと同一であった。一方、C5株を高感度に検出するオリゴセットは他の株では十分な感度が得られなかった。

・マルチプレックスPCRによるSFTSV高感度核酸検査系の確立

これまでのスクリーニングで同定したオリゴセットを用いたマルチプレックスPCR法を検討した結果、S-60及びS-62オリゴセットによるマルチプレックスPCRは、全てのSFTSV株に対して、それぞれのシングルプレックスPCRと同等の感度を示し、阻害的な反応は見られなかった。さらに、このマルチプレックスPCR法はヒト血漿由来RNAに対して非特異的な反応を示さなかった。

スクリーニング最終結果

	Primer Design	SYBR Screening		Taqman screening	
		Strain J1	Strain J2 & J3		
S-segment	80	23	3	2	2
M-segment	110	28	3	2	0
L-segment	160	45	9	8	0

D. 考察

SFTSV に対する核酸検査法は、診断用には確立されているものの、血液スクリーニング用としては整備されていない。そのため、SFTSV が血液に僅かに混入した場合でも検出が可能な高感度の検出法の開発を早急に行う必要がある。

本研究で実施する核酸検査法の確立手法は、網羅的な大規模プライマースクリーニングと、ウイルスパネルを用いた広範囲の検出域を示すプローブのスクリーニングから成り立っている。これらの多段階のスクリーニングを経ることで、高感度オリゴセットを同定し、極めて優れた核酸検査法の確立が可能であると考えられる。本研究において開発されるSFTSVの検査法は、今後の血液スクリーニング用の核酸検査法の1つとして活用が期待される。

E. 結論

本研究により開発されるSFTSVの高感度検出系は、供血者の血液へのウイルス混入を高感度に検出することで、受血者の感染リスクを軽減することが可能と考えられ、献血血液等のスクリーニングへの活用が期待される。本開発は、SFTSVに関する血液安全対策の準備・整備の一環となり、この活用は血液製剤の安全性強化と安定供給の確保に繋がると考えられる。

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

(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