

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 関西医科大学医学部 微生物学講座 教授

研究要旨：血液製剤は、ヒトの血液を原料とすることからウイルス等の病原体混入のリスクが存在する。そのため血液製剤の安全性を担保する上で、血液への病原体の混入をいち早く検出、防止し製造過程より病原体を排除することは極めて重要な課題である。近年我が国ではデングウイルスの国内感染例の発生や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等がなされ、国際的な人の移動や新たな病原体の発見等に伴う新興・再興感染症病原体の献血血液等への混入リスクは益々認知されている。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。本年度はこれまでに同定したプライマー・プローブセットを用いたリアルタイムRT-PCR法のマルチプレックス化に向けた検討を行った。

研究協力者

上野孝治 関西医科大学医学部 微生物学講座
助教

（本研究は、国立感染症研究所 ウイルス第1部、日本赤十字社との共同研究である。）

A. 研究目的

輸血用血液を含む血液製剤は、ヒトの血液を原料とすることからウイルス等の病原体混入のリスクが存在するため、血液製剤の安全性を担保する上で、血液への病原体の混入をいち早く検出、防止し製造過程より病原体を排除することは極めて重要な課題である。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おり、一部の発症者では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等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・プローブセットの再検討

これまでの本研究課題の成果として、SFTSVの新規高感度プライマーおよびTaqManプローブのセットを同定している。最終的な候補としてS分節1セット(S-60)しか残らなかったため、M分節とL分節のセットも再検討し追加した。これらのセットのマルチプレックス化に向けて、選択したプローブについて標識蛍光種およびクエンチャーを再検討した。

・選択したセットのマルチプレックス化の検討

既報の検出系との性能比較評価のために、上記で選択した各フラグメントに対するプローブを既報の国立感染症研究所ウイルス第一部が樹立した検出系に合わせて標識蛍光種およびクエンチャーを変更して設計・合成した。また日本赤十字社が設計したプローブに関しても同様に合成した。これらを用いたマルチプレックス化の検討を行った。

C. 研究結果

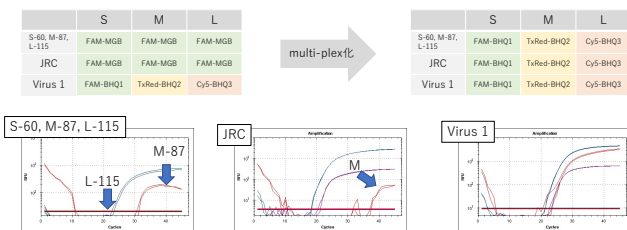
・新規SFTSV核酸検査法開発のためのプライマー・プローブセットの再検討

健常者プール血漿由来RNAを鋳型として、これまでに同定したプライマー・プローブセットの特異性を評価したところ、最終候補としてS分節1セット(S-60)しか残らなかった。そのため、M分節とL分節のセットも再検討し、これらのセットの中で最も増幅効率の良いM-87とL-115を改めて選定した。S-60にこれらを加え、合計3セットとした。これらのセット

トのマルチプレックス化 (3-plex核酸検査系) に向けて、既報の検出系との性能比較評価の必要性から、選択したプローブについて標識蛍光種およびクエンチャーを既報の検出系に合わせることにした。

・選択したセットのマルチプレックス化の検討

選択したプローブを既報の国立感染症研究所ウイルス第一部が樹立した検出系に合わせて3種類の標識蛍光に変更して設計・合成したが、プローブの一部が機能しなかった(下図)。既存の条件と揃えるためにスクリーニング時に付加していたMinor Groove Binder (MGB)を除去したことにより、Tm値が低下したことが原因であると考えられた。MGBを付加できる標識蛍光の種類に制限があるため標識蛍光種を変更する必要があるが、異なる蛍光種で蛍光強度に差があることから直接比較することは困難であった。そこで各プライマー・プローブセットの配列優位性を検討するために、全プローブの標識蛍光をFAMで統一して、クエンチャーおよびMGBに関しては論文およびスクリーニング時の設計に合わせて再合成して、分節ごとに個別に比較することが必要となった。



D. 考察

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と考えられる。

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。本研究のスクリーニングで選択したプライマー・プローブの各セットは配列優位性が高いことが予想され、さらに同一の標識蛍光種で検出することで、3種類の標識蛍光で SFTSV の分節を個別に検出する既存の検出系よりもさらに感度の高い検出系を確立できると期待される。本研究において開発される SFTSV の検査法は、そのような血液スクリーニング用に今後の核酸検査法の1つとして活用が期待される。本研究開発は、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

繋がると思われる。

E. 結論

今回新たに開発される 3-plex PCR は、SFTSV の全ての分節に対するセットを有しており、既存の検出法との配列優位性を比較し、標識蛍光の組み合わせを検討することでより高感度の検出系を確立できると期待される。

本研究により開発される SFTSV 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る。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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