

単純ヘルペスウイルスの家族内分離株の 異同に関するDNA分析

小澤 茂 跡部 里香 寺本 輝代*¹ 松田 和子*²

Epidemiologic Analysis of DNA's of Herpes Simplex
Virus Isolates Obtained from Family Members

Shigeru OZAWA, Rika ATOBE, Teruyo TERAMOTO
and Kazuko MATSUDA

単純ヘルペスウイルス (HSV) はヒトの口唇や外陰部などの粘膜に水疱性疾患や角膜炎などを起こし、さらに脳炎、カポジ水痘様発疹症、新生児の全身感染のような重篤な疾患を起すことで注目されている。

他方、HSV や EB ウイルス、サイトメガロウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルスなどのヘルペスウイルスは潜伏感染を起し、生涯感染が持続する点で、肝炎ウイルスやエイズウイルスと似た特性を有し、近年、欧米では最も多く研究されているウイルスの1つで、かつ重要視されているウイルスでもある。このような活発なヘルペス研究がウイルス学の分子疫学に先駆的役割を果たした。1975年 Hayward¹⁾ は、HSV DNA の制限酵素消化産物を電気泳動で分析するいわゆる DNA フィンガープリント法が分離株間の識別に有効であることを報告した。これは分子疫学という新しい分野の誕生を予告する重要な基礎ウイルス学の成果であった。この方法は、直ちに HSV の新生児の院内感染の可能性の推定、ヘルペス脳炎の集中発生が同一の HSV 株による流行であるかどうかの判定などの疫学的事例²⁾ に試され、その有効性が実証され、医学ウイルス学における画期的転換点となった。

単純ヘルペスウイルスには1型 (HSV-1) と2型 (HSV-2) があり、ともに初感染後、神経節に潜伏し、これが再活性化することにより、密接な接触を行った者へ伝播していく。そのため1つの家族においては同一の HSV 株の感染が起こっている可能性が大きいと考えられる。しかし血清学的手法では、ウイルス分離株の異同の鑑定は不可能であった。我々は長期にわたり HSV DNA の分子疫学的研究を遂行してきており^{3~6)}、既に

日本の6組の家族について、家族構成員から分離された株が同一であるかどうかについて DNA フィンガープリント法により検討し報告⁷⁾ した。本報では家族感染例をさらに詳しく解析するために、新たに得られた7組の家族感染例、および2家族間にまたがって集団発生したカポジ水痘様発疹症の事例について、DNA フィンガープリント法により検討したので報告する。

材料および方法

1. ウイルスと細胞

HSV-1 の標準株として F 株、RK 株を使用した。F 株はシカゴ大学の B. Roizman 博士より分与されたものである。RK 株は日本のカポジ病患者から分離された株で、相互生物医学研究所 吉野亀三郎博士より分与された株である。HSV 新鮮分離株の1部は、徳島大学歯学部 伊賀弘起博士より分与を受けた。

ウイルスの増殖は Vero 細胞を用いた。増殖培地には5% 新生児仔牛血清添加イーグル MEM 培地を用い、維持培地には2% 新生児仔牛血清添加イーグル MEM 培地を使用した。

2. DNA フィンガープリント法

前報の方法⁴⁾ で感染細胞より細胞の DNA を除いて得られた粗精製 HSV-1 DNA に制限酵素 (宝酒造製) を加え、37°C、2時間消化した後、アガロースゲル電気泳動を行った。泳動終了後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線下で観察、撮影した。

* 1 : 寺本内科皮膚科医院 * 2 : 山梨県立中央病院

結 果

1. 同一家族内で分離された HSV-1 の DNA 分析

表に示すように7組の家族から分離された17株の HSV-1 新鮮分離株について、制限酵素による DNA フィンガープリント分析を行い、各家族における分離株の制限酵素切断像の異同について解析した。

第2例は歯肉口内炎の姉と弟と口唇ヘルペスの母親、第3例は歯肉口内炎の姉と弟と無症状の母親、第5例は歯肉口内炎の子供と無症状の母親、第6例は歯肉口内炎の姉と妹と無症状の母親から各々分離された HSV-1 株である。この4組の親子から分離された11株の HSV-1 の DNA を *Bgl* II, *Sal* I, *Bam* H I, *Hpa* I, *Hind* III の5種の制限酵素で消化し、その切断像を比較したところ、各々の家族の親子間、兄弟間では、どの制限酵素を使用しても全く同一の切断像を示した。Roizmanら^{2, 8)}は HSV 分離株のゲノムは多様性に富み、ほとんどの場合疫学的関連性のない株は多種類の制限酵素を用いると相互に識別が可能であることを示した。このことは逆に、これらの例のように同じ家族から分離された分離株間で多くの制限酵素切断像が全く一致した場合は同一株と判断してほぼ間違いないと考えられる。

第1例は歯肉口内炎を起こした兄弟、第4例は再発性口唇ヘルペスの母親と歯肉口内炎を起こした娘から各々分離された HSV-1 株である。これらの分離株の DNA の *Bgl* II, *Sal* I, *Bam* H I, *Hpa* I, *Hind* III 切断像を比較したところ、第1例では *Sal* I-J または K 断片, *Bam* H I-K 断片, *Hind* III-M 断片、第4例では *Hind* III-M 断片のサイズが同じ家族内分離株間で異なっていた(表, 図1)。これらの断片は、共に図2の制限酵素切断地図に示すように HSV-1 DNA の末端反復配列部に由来する断片あるいは L-S 接合部由来断片である。これらの断片はサイズが変動しやすいことが以前から知

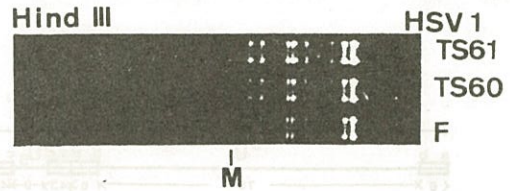


図1 母親と娘から得られた HSV-1 分離株 DNA の *Hind* III 切断像

— TS60 : 母親から分離した株, TS61 : 娘から分離した株

表 7 家族内で得られた HSV-1 分離株 DNA の制限酵素切断像の比較

家族 No.	ウイルス株名	家族内関係	症 状	制 限 酵 素 切 断 像*				
				<i>Bgl</i> II	<i>Sal</i> I	<i>Bam</i> H I	<i>Hpa</i> I	<i>Hind</i> III
1	TS11	兄弟	歯肉口内炎 歯肉口内炎	S	D	D	S	D
	TS50							
2	TS51	母親 姉 弟	口唇ヘルペス 歯肉口内炎 歯肉口内炎	S	S	S	S	S
	TS52							
	TS53							
3	TS57	母親 姉 弟	無症状 歯肉口内炎 歯肉口内炎	S	S	S	S	S
	TS58							
	TS59							
4	TS60	母親 娘	口唇ヘルペス 歯肉口内炎	S	S	S	S	D
	TS61							
5	TS62	母親 娘	無症状 歯肉口内炎	S	S	S	S	S
	TS63							
6	TS64	母親 姉 妹	無症状 歯肉口内炎 歯肉口内炎	S	S	S	S	S
	TS65							
	TS66							
7	TS67	父親 姉	無症状 歯肉口内炎	D	D	D	D	D
	TS68							

* S : 同一家族内で分離された HSV-1 株 DNA の制限酵素切断像が全く同じもの

D : 同一家族内で分離された HSV-1 株 DNA の制限酵素切断像が互いに異なるもの

られている^{9,10)}。それゆえ、本例の場合のように、末端由来断片や L-S 接合部由来の断片のみが異なっている場合、それらの分離株が互いに異なった株であると結論することは出来ない^{9,10)}。むしろ、この両株のユニーク領域由来断片の切断像が全く一致することから、第1例、第4例も同一の HSV-1 株が家族内に伝播したものと推定できる。

第7例は歯肉口内炎の娘とその父親から同時期に分離された HSV-1 株である。この2株の HSV-1 DNA の BglII, SalI 切断像を図3に示した。父親のほうは、ユニーク部由来の BglII-K 断片が標準株 F 株, RK 株と同じサイズであったが、娘からの分離株は BglII-K 断片のサイズが標準株より大きかった。この娘からの分離株は著者らが日本の疫学的に関連性のない多数の分離

株の DNA を解析する過程で見出した変異型^{3~6)}の1つで、西日本に多く偏在している安定した変異型であった。一方、SalI 切断像では娘からの分離株のみに J-F および J-C 断片間の切断点の消失のために生じた JF, JC, JFK, JCK の融合断片が認められた。従って父

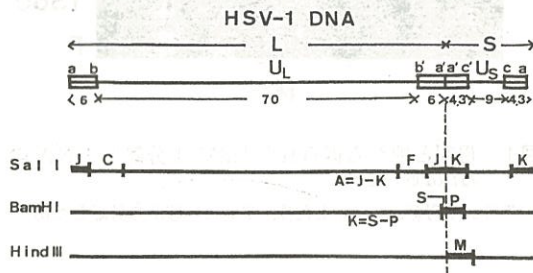


図2 同一家族内分離株間でサイズの違いが見られた HSV-1 DNA の制限酵素切断片

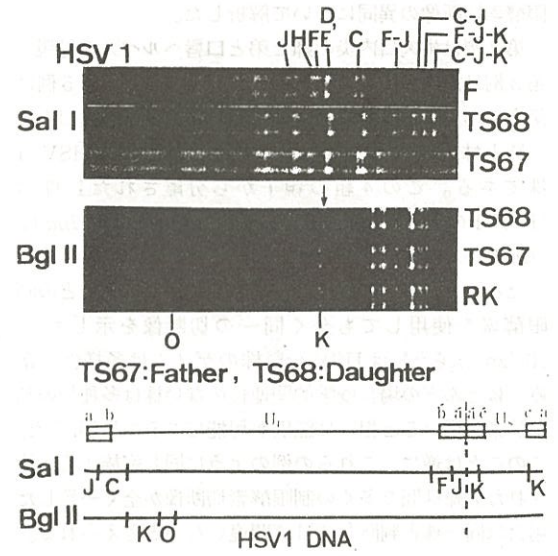


図3 父親と娘から得られた HSV-1 分離株 DNA の制限酵素切断像

TS67: 父親から分離された株, TS68: 娘から分離された株

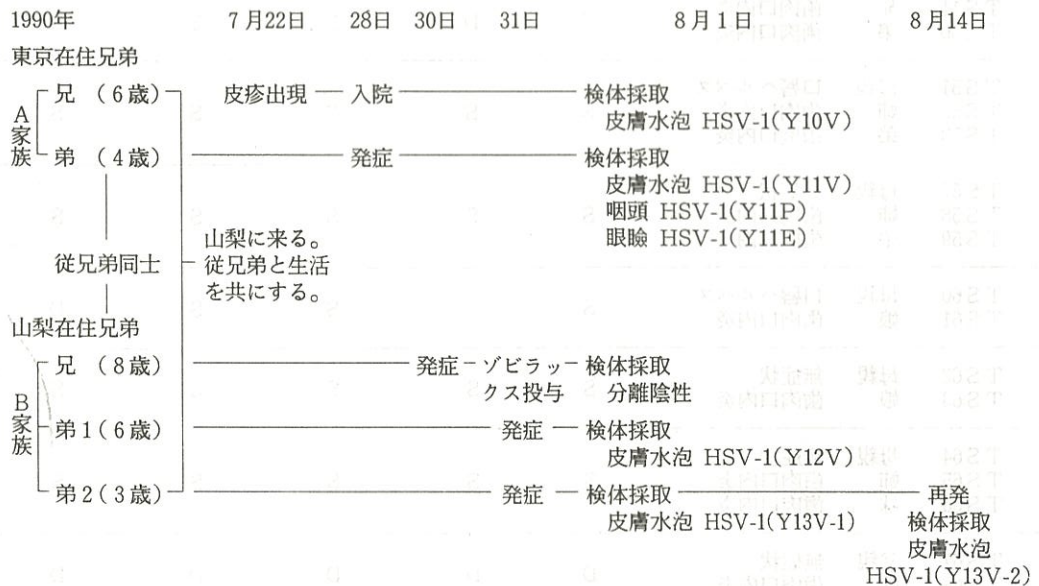


図4 2家族で発生したカポジ水痘様発疹症の発症経過

と娘からの分離株は互いに違った株であった。

以上の分析から、7家族中6家族の各々の家族構成員から分離された株は同一株であり、1家族のみ互いに異なった株であった。

2. カポジ水痘様発疹症の集団発生事例

この事例は東京に住むA家族の6才の兄が皮疹が出たその日に弟と共に山梨にある親戚のB家族の従兄弟3名の所に遊びに来て、A、B家族の子供全員がカポジ水痘様発疹症を発症した症例である(図4)。A家族の兄が発症した日から6日後に弟が、8、9日後にB家族の3名の従兄弟がそれぞれ発症した。A家族の兄の発病11日目の皮膚水疱、弟の発病5日目の皮膚水疱、口腔、眼瞼からHSV-1(各々Y10V, Y11V, Y11P, Y11E株)が分離された。一方、B家族の6才と3才の従兄弟の発病2日目の皮膚水疱からもHSV-1(各々Y12V, Y13V-1株)が分離され、さらに一旦治癒した後に新たに再発した3才の従兄弟の皮膚水疱からもHSV-1(Y13V-2株)が分離された。8才の従兄弟の皮膚水疱からはウイルスが分離されなかったが、皮膚病巣を直接塗抹した検体から蛍光抗体法でHSV-1の感染が証明された。

以上のようにここで分離された7株のHSV-1のDNAを*Bgl*II, *Sal*I, *Bam*HI, *Hpa*I, *Hind*III, *Kpn*I, *Eco*RIの7種の制限酵素で消化し、その切断像を比較した。図5にはこの7株の分離後2代継代したDNAの*Sal*I切断像を示した。兄弟分離株間、同一個人の異なった部位から得られた株間、同一個人の時期を異にして得られた株間で、ユニーク部由来断片は全く同じであったが、末端由来断片(J, K断片)、L-S接合部由来断片(A1, A2断片)、末端からユニーク部にまたがる領域由来断片(C, F断片)のサイズに変動が観察された。*Sal*I以外の制限酵素切断像でも末端やL-S

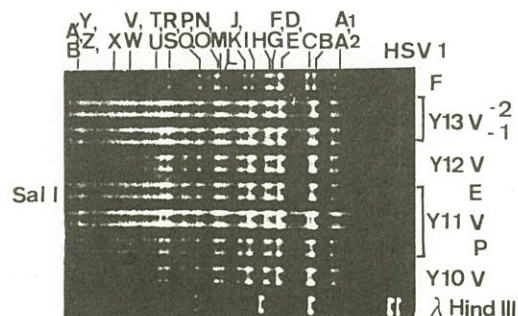


図5 カポジ水痘様発疹症の患児4名(Y10~Y13)から得られたHSV-1分離株DNAの*Sal*I切断像

V, P, E: 各々皮膚水疱、口腔、眼から分離された株

接合部由来断片のサイズの変動が分離株間で比較的多く認められるもののユニーク部由来断片は全く同じであった。さらにこの7株のすべての分離株は、我々が疫学的に関連性のない多数の分離株のDNAを解析する過程で見出した変異型^{3, 4, 6)}の1つで、日本の分離株の約5%に存在する*Bgl*II-0断片のサイズの大きくなる変異型であった。以上の結果から、この事例では、同一のHSV-1株がA家族の兄からその弟とB家族の3名の従兄弟へ伝播してカポジ水痘様発疹症の集団発生が起ったものと推定された。

考 察

HSV分離株間の異同を制限酵素によるDNAフィンガープリント法で識別する時、留意しなくてはならないことがある。その1つはHSV DNAの末端反復配列部、およびL領域とS領域の接合部に由来する断片のサイズが変化しやすく^{9, 10)}、この断片の変動が同一株由来のクローン間でもみられることである^{4, 12, 13)}。実際、本報告で述べた同一家族での感染例やカポジ水痘様発疹症の感染例のように疫学的にみて同一株であろうと考えられる分離株間でも、末端、およびL-S接合部由来の断片のサイズのみが異なっている例が多く認められた。このような場合、互いに異なった株と結論づけることが正しくないことは、以前、米国における基礎研究^{2, 8)}から示唆され、またその後我々も実際の分析例^{34, 11)}なかでも終始一貫して述べてきた点である(我が国においては一部に混乱がみられた)。本報告の同一家族内分離株の第1例、第4例やカポジ水痘様ヘルペスの感染例では、多種類の制限酵素で切断してもユニーク領域由来断片のサイズや断片数に差異がないので、互いに同一株であると推定した。

分離株間の異同を解析する上でもう1つ留意する点は、制限酵素によるDNAフィンガープリント法では、分離株の全塩基配列のほんの一部(数%以下)を比較分析しているに過ぎないということである。それゆえ、理論的には、たとえ多種類の制限酵素切断像が互いに異ならないからと言っても同一株であると決して断定はできない。それは、制限酵素の数を無限に増加した場合、互いに違うことが明らかになる可能性があるからである。このように本法には株の識別に際し、ほとんどの場合、非常に有効性であるが限界もあり、解釈には注意が必要である。実際の疫学的状況証拠からも同じ株の感染であることが予想されうる場合でなくては、本法におけるDNA分析の結果だけでは、同一株である断定することは適当ではないと考えられる。

以上のような本法が持ちうる有効性と限界を認識した

うえて、家族内分離株の分析をした結果、前報⁷⁾で分析した6例と本報での分析例を合わせた13組の中で1家族だけ、家族構成員から分離された株が異なっていた。これは本報告で述べた歯肉口内炎の娘とその父親から同時期に分離されたHSV-1株の分析例で、父から娘への感染が予想される場合であっても、娘は別の経路より感染を受けたことが明確に示された。近年、個人から時期を異にして得られたHSV分離株や異なる部位から得られたHSV分離株が必ずしも同一株ばかりでないことが報告^{14, 15)}されているが、この分析例のように同じ家族内に異なったHSV分離株が存在しているとき、家族構成員に異なる2つのHSV-1株が同時、あるいは時期を異にして感染するものであるか否かは興味のある問題である。今回の分析例では、娘は父親以外の直接的接触の多い人から感染をうけた可能性があるが、母親や兄弟などからの分離株や時期を異にした分離株が得られなかったため、感染経路などの詳細な検討はできなかった。

一方、親戚関係にある2家族間にまたがったカポジ水痘様発疹症の集団発症例において、同一のHSV-1株に感染した子供全員がカポジ水痘様発疹症を発症したのは、A家族の父親の実家がB家族で、両家族の子供はみなアトピー性皮膚炎の体質を持っており、皮膚には掻き傷がたえないためこの様に一斉に感染が起きたものと考えられる。

以上の結果から、日本においては、多くの場合1つの家族において1つのウイルス株が伝播して家族内感染を起こしていること、また同一家族内ばかりでなく、非常に近い親戚間でも同一HSV株の感染が起り得ることが示唆された。

以上に述べたように分子疫学的研究は病原体の感染経路の解明に威力を発揮し、そのうえバイオテクノロジーの日進月歩の進展とあいまって、ワクチン株と野生株との区別、ウイルスの遺伝子と病原性との関連性の検討、疾病の遺伝子診断などにも役立ち、公衆衛生や医療の分

野において今後ますます重要性をおびてくるものと考えられる。

謝辞：ウイルス株の御分与頂いた徳島大学歯学部 伊賀弘起博士に深く感謝致します。また、終始御指導を賜った国立予防衛生研究所 柳 壹夫 博士、元当研究所長 吉野亀三郎博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) Hayward, G. S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**, 1768~1772 (1975)
- 2) Buchman, T. G. et al. : Ann. N.Y. Acad. Sci., **354**, 279~289 (1980)
- 3) 柳 壹夫：臨床とウイルス, **12**, 379~386 (1984)
- 4) 小澤 茂ら：感染症誌, **62**, 590~598 (1988)
- 5) 小澤 茂ら：感染症誌, **63**, 39~43 (1989)
- 6) 小澤 茂ら：感染症誌, **63**, 822~826 (1989)
- 7) 小澤 茂ら：感染症誌, **64**, 674~680 (1990)
- 8) Roizman, B. & Tognon, M. : Cur. Top. Microb. Immunol., **104**, 273~286 (1983)
- 9) Hayward, G. S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**, 4243~4247 (1975)
- 10) Skare, J. et al. : J. Virol., **15**, 726~732 (1975)
- 11) 柳 壹夫：医学のあゆみ, **142**, 592~596 (1987)
- 12) Wagner, M. M. & Summers, W. C. : J. Virol., **27**, 374~387 (1978)
- 13) Lonsdale, D. M. et al. : Ann. N.Y. Acad. Sci., **354**, 291~308, (1980)
- 14) Buchman, T. G. et al. : J. Infect. Dis., **140**, 295~304 (1979)
- 15) Maitland, N. J. et al. : Infect. Immun., **38**, 834~842 (1982)

