



Title	水痘一帯状疱疹ウイルスDNA (VZV-DNA) の制限酵素 Hpa Iを用いた解析
Author(s)	山本, としこ
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35284
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	山 本 と し こ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 7379 号
学位授与の日付	昭 和 61 年 6 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	水痘-帯状疱疹ウイルスDNA (VZV-DNA) の制限酵素Hpa I を用いた解析
論文審査委員	(主査) 教授 高橋 理明 (副査) 教授 加藤 四郎 教授 羽倉 明

論文内容の要旨

〔目的〕

水痘-帯状疱疹ウイルス (VZV) は、初感染時には水痘を発現し、年余にわたる潜伏感染後には、帯状疱疹として再発する。近年、制限酵素を用いた、DNAのcleavage patternの解析がヘルペス属ウイルスでも試みられ、分離された株により、そのパターンに差異のあることが明らかになってきた。VZVにおいても各種制限酵素を用いた、cleavage patternの分析が行われるようになった。このcleavage patternの違いを利用して、種々の野性株やワクチン由来株の同定、in vitro継代培養のVZV-DNA patternに及ぼす影響、人から人への感染がVZV-DNAに与える影響、及びVZV-DNAの多様性について検討した。

〔方 法〕

細胞：3%から10%の牛血清を加えた199+MEM溶液により培養した人胎児細胞 (HEL cell) 使用。ウイルス：野性株；患者の水疱または血中より分離した20株。ワクチン由来株；ワクチン接種後発症した者より分離したもの14株。

DNA精製：早川らの方法により、DNase I, RNase Aを含むlysis buffer中でVZV感染HEL cellの融解、host DNAの除去、ウイルスDNAの抽出、精製を行った。精製されたDNAは各種制限酵素によりdigestionし、tris-borate-EDTA buffer, 0.5% agarose水平ゲル上で電気泳動を行い、エチジウムプロマイドで染色後、transluminator上で発光させた。又、水平ゲル上に電気泳動されたDNAフラグメントは、Southern法により、ニトロセルロースフィルターにtransferし、6×SSC, 65°C, 24hの条件でhybridizationさせ、1×SSC, 65°C, 3hrの洗浄後、X-ray filmに感光させた。

[結 果]

- 1) 10種の制限酵素を用い、分離株のそれぞれを digestion してみたところ、5種同時にモニターできることがわかった。Hpalを用いて、ワクチン株、野性株の cleavage pattern を比較すると、Hpal-F, G, K断片で移動に差がみられた。しかし、Hpal-Kはワクチン株間同士では全く同じであり、ワクチンマーカーになる事が判明した。それらの変動の大きさは、Hpal-Fで300bp, Hpal-Gで50bp, Hpal-Kで150bp程度であった。
- 2) 次に、in vitro 繼代培養で、変動断片がどのように変化するかを調べてみた。継代がすすむにつれ、Hpal-Fは、次第に不鮮明になり、heterogeneousなDNAに分散したことより、不安定な断片であることがわかった。逆に、Hpal-G, Kは、分子量が変化せず、in vitro で、安定していた。
- 3) 同一室内で次々に罹患下患者たちの水疱より分離した株を比較検討してみたところ、Hpal-F, Gは株により異なり、Hpal-Kのみ、安定していた。
- 4) 水痘、帯状疱疹共に発症した患者の水疱より継時に分離した株間同士、又、別の患者で、血中と水疱のそれより同時に分離した株を比較してみた。その結果、同じ患者より得られたウイルスの cleavage pattern に、まったく差はみられなかった。
- 5) これらの変動領域を Southern-hybridization 法で mapping した。Hpal-K (Variable region I ; VR I) は、マップユニット 0.16 付近に、Hpal-F (VR II) は、0.3 付近に、Hpal-G (VR III) は、terminal repeat sequence 部の、0.94-1.0 に存在することが判明した。

[総 括]

120kb の巨大なゲノムからなる VZVにおいて、DNA の分子多様性の原因となる、変動しやすい DNA 領域が、限定された 3 つの領域に存在することがわかった。

VR I (Hpal-K) は、異なる流行でえられた殆どすべての野生株で異なり、かつ、in vitro 及び in vivo の継代でも安定しているので、株を同定する第一番目のマーカーとして利用できると思われる。

VR II (Hpal-F), VR III (Hpal-G) は、同一患者においては変動しないので、株判定の第二のマーカーとして有用である。

以上より、Hpalを用いてゲノムを解析することは、疫学調査の有効な手段として利用できることが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

本論文はDNA制限酵素を用いて水痘-帯状疱疹ウイルスDNAを解析しその分子多様性と関連性のある変動しやすいDNA領域が限定された3つの領域に存在することを明らかにした。(Variable Region : VR I, II, III)

VR I (Hpal-K) は異なる流行でえられた殆どすべての野生株で異なりかつ in vitro 及び in vivo の継代でも安定しているので株を同定する第一のマーカーとして利用しうる。

VR II (HpaI-F), VR III (HpaI-G) は同一患者においては変動しないので株判定の第二のマークーとして有用である。

以上 HpaI を用いてゲノムを解析することは水痘の疫学調査の有効な手段として利用できることが明らかになり臨床ウイルス学に寄与するところも大きいと思われる。