



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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【2】

氏名・(本籍)	山 ^{やま} 本 ^{もと} と し こ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 7 3 7 9 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—带状疱疹ウイルス 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—带状疱疹ウイルス (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、带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、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；患者の水痘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、エチジウムブロマイドで染色後、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, 24 h の条件で hybridization させ、1×SSC, 65°C, 3 hr 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。HpaIを用いて、ワクチン株、野性株の cleavage pattern を比較すると、HpaI-F, G, K断片で移動に差がみられた。しかし、HpaI-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、HpaI-Fで300bp, HpaI-Gで50bp, HpaI-Kで150bp程度であった。
- 2) 次に、in vitro継代培養で、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、HpaI-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、HpaI-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、HpaI-F, Gは株により異なり、HpaI-Kのみ、安定していた。
- 4) 水痘、带状疱疹共に発症した患者の水疱より継時的に分離した株間同士、又、別の患者で、血中と水疱のそれぞ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。HpaI-K (Variable region I ; VR I) は、マップユニット0.16付近に、HpaI-F (VR II) は、0.3付近に、HpaI-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 (HpaI-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 (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カーとして有用である。

以上より、HpaI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-带状疱疹ウイルス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 (HpaI-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。

VRⅡ (HpaⅠ-F), VRⅢ (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
カ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。