

Title	単純疱疹ウイルスのDNA診断による型別
Author(s)	松本, 俊也
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37174
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	まつ 松	もと 本	とし 俊	や 也
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9681	号	
学位授与の日付	平成3年3月26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	単純疱疹ウイルスのDNA診断による型別			
論文審査委員	(主査) 教授	栗村	敬	
	(副査) 教授	高橋	理明	教授 上田 重晴

論文内容の要旨

(目的)

単純疱疹ウイルス(HSV)はヒトの知覚神経節に潜伏し、一度感染すると回帰発症を繰り返す。HSVには1型と2型があり、型によって回帰発症率や、薬剤に対する感受性が異なる事からHSVの型別は重要な問題である。HSV感染症のもっとも確実な診断はウイルスの分離であるが、この方法では培養細胞等の準備が必要であり、また判定まで数日間を要し適切な治療に反映できない。蛍光抗体法により判定する方法もあるが、この方法では、必ず患部細胞を必要とする。これまでわれわれは患者検体をドットプロット法で型特異的に選別するDNA断片をプローブとして検査していたが、この方法ではHSVであることは識別できるが型別できない場合があった。またサンプル量も200-500 μ lを必要とした。本研究はこれまでドットプロット法で不可能であった検体についてHSV1型、2型の型特異的な塩基配列を増幅するPolymerase Chain Reaction(PCR)法の系を確立し、微量の検体でDNA診断によるHSVの型別を目的として行ったものである。

(方法)

1. 検体

患者水疱内容液、咽頭ぬぐい液等を2mlのハンクス液に懸濁したものを50 μ l使用した。

2. ウイルスリファレンス株

1型 WT51-3-4 (角膜ヘルペス患者からの分離株)

2型 UW268

3. ウイルスDNA

CV-1細胞にウイルスを感染させ蔗糖法 (Pignatti et al., Virology 93 : 260-264, 1979) によってDNAを抽出・精製したものをを用いた。

4. ドットプロット法

1型, 2型を型特異的に選別するDNA断片をプローブとし200-500 μ lの検体をドットプロットしたものとサザンハイブリダイゼーションにより型別を行った。

5. プライマーとプローブ

プライマーとプローブの塩基配列は, 1型, 2型とも, ドットプロット法で使用した型特異的選別プローブの塩基配列中から選択を行った。HSV-1ではプライマーは遺伝子地図上0.75map unitにある。BamHI Bフラグメント (Roizman et al., J. Virol. 44 : 939-949, 1982) の5'端の31base上流から12base上流まで20baseのTM11とBamHI Bフラグメント5'端から212base下流からの193base下流までの相補鎖20base TM12を使用した。プローブはBamHI Bフラグメント5'端から下流50baseから89baseまでの40baseのTM13を用いた。HSV-2ではa'シーケンス (Wilkie et al. J. Gen. Virol. 55 : 315-331, 1981) の5'端の96base下流から20base下流までの20baseのTM21とa'シーケンスの5'端から221base下流から202base下流までの相補鎖20base TM22を使用した。プローブはa'シーケンスの5'端から148base下流から187base下流までの40baseのTM23を用いた。

6. 反応液

PCRの反応液は, 125 μ MのdATP, dCTP, dTTPと31.25 μ M dGTP, 93.75 μ Mのc'dGTP 0.01%ゼラチン, 20mM Tris-HCl (pH8.8), 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10%, DMSO, 2 μ Mプライマーと2.5unitのTaq polymeraseを用いて行った。

7. 検体DNAの抽出

咽頭ぬぐい液等50 μ lでグラスパウダー法によってDNAの抽出・精製を行った。

8. PCR反応

HSV-1では92 $^{\circ}$ C 1分, 60 $^{\circ}$ C 1分, 72 $^{\circ}$ C 1分で30サイクル行った後72 $^{\circ}$ C 5分の反応を行った。HSV-2では93 $^{\circ}$ C 1分, 65 $^{\circ}$ C 1分, 73 $^{\circ}$ C 1分で30サイクル行った後73 $^{\circ}$ C 5分の反応を行った。これらの反応液を4%アガロースで電気泳動を行い, これをTM13,12をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

(成績)

1. HSV野生株での検定: ドットプロット法, 及びHSV-1型, 2型のPCR法によってHSV野生株DNAについて検定を行ったところ, 何れの方法を用いても1型, 2型を正確に型別することができた。
2. 臨床材料での検査: ヘルペス感染症が疑われる患者の水疱内容液, 咽頭ぬぐい液を用いて行った。水疱内容液の場合, ドットプロット法では, 18検体中12検体が1型, 6検体が2型となり型別不能はなかった。咽頭ぬぐい液の検体では, ドットプロット法では36検体中10検体が1型と判定でき型別不能が10検体, 陰性が16検体であった。このドットプロット法での型別不能の原因として, われわれは, 検体中の唾液が関与しているのではないかと考え, 1型, 2型既知のウイルスDNAに健常人の唾液

を加えてドットプロット法による型別を行ったところ、どちらの型か判定出来ない型別不能となる場合があった。したがって、咽頭ぬぐい液の検体で検体中のウイルスDNA量が非常に微量の場合は、ドットプロット法では型別不可能な場合があることが分かった。次に、同じ検体についてPCR法による型別を行った。その結果、36検体中1型が32検体、陰性が4検体となり高い識別能を示し、ドットプロット法において不可能であった臨床検体においても極微量の検体から型別可能となった。

(総括)

単純疱疹ウイルス(HSV)の1型、2型を識別できるドットプロット法、及びPCR法の系を確立した。後者の方法ではドットプロット法において不可能であった臨床検体においても、極微量の検体から高い成功率で型別を行う事が可能となった。

論文審査の結果の要旨

単純疱疹ウイルス(HSV)はその血清型が2種類あり、塩基配列より見ると約50%のホモロジーがありサブタイプ特異的な塩基配列はないとされていた。一方、血清型によって回帰発症のおこりやすさ、薬剤に対する感受性に差があることもよく知られており、型別けをすることは臨床的にも重要である。これまでは分離されたウイルスの核酸の制限酵素消化による切断パターン、単クローン抗体による感染細胞中の型特異抗原の検出などを用いていたが、種々の制約により、十分な検索が行えない場合が多かった。本論文では1、2型それぞれに特異的な塩基配列を見つけ、ドット・ハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法の何れかをを用いると、ほとんど治癒したような病巣由来の材料でも型別を行うことができることを証明した。

本研究は、これまで存在しないとされていたHSVの型特異的塩基配列を見つけ、それを臨床応用まで持ってきたもので、学位に値するものといえる。