

氏 名 (本籍地)	長 峯 正 泰 (北海道)
学 位 の 種 類	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	甲 第 249 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月24日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (医学研究科博士課程修了者)
学 位 論 文 題 目	Comparison between Polymorphism of Thymidine Kinase Gene and Res- triction Fragment Length Polymor- phism (RFLP) of Genomic DNA in Herpes Simplex Virus Type 1 (単純ヘルペスウイルス 1 型における チミジンキナーゼ遺伝子多様性とゲノ ムDNA中の制限酵素切断点の多様性と の比較)
	(審査委員長)
論 文 審 査 委 員	教授 原 渕 保明、教授 羽田 明、教授 塩野 寛 教授 東 匡伸

## 学 位 論 文 の 要 旨

### 研究目的

感染症の疫学を研究する上で、原因となる微生物の株を識別することがしばしば必要とされる。単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) では、これまで全ウイルスゲノムの restriction fragment length polymorphism (RFLP: 制限酵素切断点の多様性) による株の識別が行われ、ウイルスの感染ルートや再感染の有無などの解析に利用されてきた [1]。しかしながらその解析には、手法、設備、解析プログラムの違いなどにより、施設間での再現性に格差があることが指摘されている。

一方、DNA塩基配列の決定は、オートシーケンサーの開発により簡便な手技となり、広く普及されつつある。その解析結果は客観的かつ正確で、データベースに登録することにより、数多くの研究に広く活用出来るといった利点もある。

HSV-1 のチミジンキナーゼ (TK) はウイルスのチミジンリン酸化酵素であり、抗ウイルス剤であるアシクロビルに耐性を示す株では、TK遺伝子の変異が認められると報告されている。またTK遺伝子はウイルス株間において、他の酵素 (deoxyribonuclease、protein kinase、virion-associated host protein synthesis shutoff function) をコードする遺伝子と比べ、1 kbp当たりの塩基置換の頻度が2.5~4.3倍高いこと、すなわち高い多様性を有していることが報告されている [2]。

以上の事実から、本研究ではHSV-1 全ゲノムのRFLP解析に代えて、TK遺伝子の塩基配列に基づく株の識別が、HSV-1 の簡便な株同定法として疫学研究において有効な手段となりうるかどうかを、RFLPに基づく株の識別と比較し、検討した。

## 材料・方法

ウイルス：ウイルス株は、疫学上関係のない日本人患者63名から得られた臨床分離株63株で、内訳は角膜炎由来41株、皮膚炎由来19株、性器ヘルペス由来2株、脳髄膜炎患者由来1株である。分離した63株を、Vero細胞にて増殖させた後、proteinase K処理にて細胞を破壊、遊離したウイルスDNAをフェノール・クロロホルム抽出法にて精製し、鋳型DNAとして使用した。

アシクロビル感受性試験：63株の臨床分離株の中からTK変異株を除外するためアシクロビル感受性を50%プラーク抑制法により調べた。ウイルスをVero細胞に感染させた際のプラーク数を50%に抑制するアシクロビル濃度が5  $\mu$ g/ml以下の株を感受性株と判定した。

TK遺伝子塩基配列の決定：TK遺伝子の5'端から135塩基上流、および3'端から72塩基下流にそれぞれ位置する2個のプライマー (20bpと21bp) を用い、全63株のウイルスDNAについて、TK遺伝子領域をpolymerase chain reaction (PCR) 法にて増幅した。得られたPCR産物を鋳型として、TK遺伝子の塩基配列をPCR-directed sequencing methodにて決定した。塩基配列の決定には、TK遺伝子3'端より290塩基上流に位置するプライマー (20bp) も加え、計3種類のプライマーを用いた。計189回 (63株×3プライマー) の塩基配列解析作業にて得られたTK遺伝子塩基配列およびそのアミノ酸配列に基づき、63株を多重整列ソフトclustal Wを用いて分類した。

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)：ウイルス株の制限酵素切断点を詳細に決定するため、PCR法にて得られたDNA増幅産物を用いてRFLPを決定した。HSV-1 ゲノム中、long unique領域の85% (93kbp) をカバーするそれぞれ異なる11組、計22個のプライマーを設計した。全63株について、これら11組のプライマーを用いたPCRを施行し、計693個の増幅産物を得た。各々の増幅産物を、さらに3種類の制限酵素 (*Bam*H I、*Kpn* I、*Sal* I) で切断し、アガロース電気泳動で分離した。得られた計2,079レーンの泳動像から、各制限酵素での切断点を決定した。これら切断点の血がいに基づいて63株を分類した。

## 成 績

アシクロビル感受性：63株すべてアシクロビル感受性株であった。

TK遺伝子塩基配列の決定：63株のTK遺伝子すべてが1,131bpの長さを有し、欠失、挿入は認めなかった。それぞれの株の塩基配列を解析した結果、最も多いもので63株中15株が同じ塩基配列を有し、ひとつのグループに分類された。次に11、9、3、2、2、2、2株がそれぞれひとつのグループに分類され、残り17株はそれぞれ異なる塩基配列を有していた。したがって、検索した63株は計25グループに分類された。株間での平均塩基置換は1,131bp中4.3bpであり、TK遺伝子の多様性は0.0038 (=4.3/1131) と判定した。アミノ酸配列に基づく分類では12グループに分類され、最も多いもので35株が

同じアミノ酸配列を有していた。

RFLP法による分類：63株のPCR法にて得られた693個の増幅産物を *Bam*H I で切断した結果、29個所の切断点が同定され、10グループに分類された。 *Kpn* I および *Sal* I の切断点は25および38個所で、それぞれ9および18グループに分類された。さらに *Bam*H I と *Kpn* I の切断点を合わせて検討した結果、17グループに分類された。 *Bam*H I と *Sal* I では27グループ、 *Kpn* I と *Sal* I では26グループに分類され、 *Bam*H I、 *Kpn* I および *Sal* I の3者の切断点を合わせた検討では、33グループに分類された。

TK遺伝子の多様性とRFLPとの比較：RFLP法で得られた制限酵素切断点の数と分類されたグループ数には極めて高い正の相関がみられた ( $r=0.93$ )。その回帰直線からは、制限酵素切断点66個所のRFLPを調べた際、25グループに分類できると判定された。TK遺伝子配列に基づく分類(25グループ)と3種類の制限酵素を用いたRFLPに基づく分類(33グループ)を合わせて検討した結果、41グループに分類された。63株中任意の2株間(計1,953組)において、TK遺伝子の異なる塩基数およびRFLPでの異なる切断点数の相関を検討したところ、両者には高い相関を認めなかった ( $r=0.48$ )。

## 考 案

63株のTK遺伝子塩基配列を解析した結果、株間での平均塩基置換は1,131bp中4.3bpであり、TK遺伝子の多様性は0.0038と判定した。この値は、これまでに報告のあった日本人より分離されたHSV-1臨床分離株48株を用い、全ゲノムを対象として225個所の切断点をみたRFLPの解析により推測された値(0.0037) [3] とほぼ同等であり、TK遺伝子は、株の判別法として十分な多様性を有していると考えられた。

ウイルス株間でのTK遺伝子の多様性とRFLPの相関を、TK遺伝子の異なる塩基数とRFLPでの異なる切断点数を指標に検討したところ、両者には高い相関を認めなかった。加えて、TK遺伝子配列に基づく分類とRFLPに基づく分類を合わせて検討することによって、より多数の株が識別されたことを考慮すると、両者は互いに独立した株の識別法と考えられた。

RFLP法による制限酵素切断点の数と分類されたグループ数には高い相関がみられ、その回帰直線からは、RFLP法にて66個所の切断点を調べることにより、TK遺伝子塩基配列による分類と同等である25グループに分類することができると推察した。このことは、TK遺伝子の配列に基づく株の分類が、RFLP法において66個所の切断点を検討した際の分類と同等の識別能を有すると考えられた。

## 結 語

HSV-1 TK遺伝子の塩基配列決定に基づく株同定が、RFLPによる解析とは独立した識別法で、しかも制限酵素切断点66個所を検討したRFLPによる解析と同等の感度を有することが示唆された。さらに、その簡便性、正確性を考慮するとHSV-1の臨床疫学研究における有用な手段になる可能性が示唆された。

## 引 用 文 献

1. Roizman B, Togonon M: Restriction enzyme analysis of herpesvirus DNA. Stability of restriction endonuclease patterns. *Lancet* i:677, 1982.
2. Chiba A, Suzutani T, Saijo M, Koyano S, Azuma M: Analysis of nucleotide sequence variations in herpes simplex virus types 1 and 2, and varicella-zoster virus. *Acta Virol* 42: 401-7, 1998.
3. Kudo E, Shiota H, Naito T, Satake K, Itakura M: Polymorphisms of thymidine kinase

gene in herpes simplex virus type 1: analysis of clinical isolates from herpetic keratitis patients and laboratory strains. J Med Virol 56:151-8, 1998.

## 参 考 論 文

Saijo M, Suzutani T, Itoh K, Hirano Y, Muroso K, Nagamine M, Mizuta K, Niikura M, Morikawa S: Nucleotide sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 isolates recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: Evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus. J Med Virol 58:387-93. 1999.

## 学位論文の審査結果の要旨

ウイルスの感染ルートや再感染の有無など、感染症の疫学上、原因となる微生物の株識別が重要である。単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）では、従来、restriction fragment length polymorphism (RFLP) による株識別が行われてきたが、その手法、設備、解析プログラムの違いによる再現性の問題が指摘されていた。近年、DNA塩基配列の決定は、オートシーケンサーの開発で簡便化し、その客観性、正確性並びにデータベース上での活用などの利点が示されている。一方、HSV-1のチミジンキナーゼ（TK）遺伝子はウイルス株間において、他の遺伝子より高い多様性を有していることが知られている。

本論文は、これらの背景を基に、従来のRFLP解析に代えて、TK遺伝子の塩基配列の解析が、HSV-1の株識別において有効な手段となり得るかどうかを、アシクロビル感受性の臨床分離株63株を用いて検討したものである。その結果、TK遺伝子塩基配列の解析によって、63株の臨床分離株は25グループに分類され、株間での平均塩基置換は1,131bp中4.3bpであり、TK遺伝子の多様性は0.0038であった。この値は、これまでに報告のあった全ゲノムを対象として225個所の切断点をみた値（0.0037）とほぼ同値であり、TK遺伝子は、株の判別法として十分な多様性を有していると考えられた。

一方、63株の臨床分離株をRFLP法で解析した結果、*Bam*H I、*Kpn* Iおよび*Sal* Iの3者の制限酵素によって33グループに分類され、各制限酵素の組み合わせによる切断点の数と分類グループ数の間には、極めて高い正の相関が認められた。その回帰直線からは、制限酵素切断点66個所のRFLPを調べた際、TK遺伝子塩基配列による解析と同等の25グループに分類されることが推定された。換言すると、TK遺伝子の塩基配列決定に基づき株同定は、制限酵素切断点66個所を検討したRFLP法による解析と同等の感度を有していた。

以上の結果は、TK遺伝子の塩基配列決定による株同定法が、RFLP法に比べて、その感度、簡便性、および正確性の面から、HSV-1の臨床疫学上、有用な手段であることを示すものである。

論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的解答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値すると判定した。