

図 3. ニホンザル血清における B ウイルス抗原と SA-8 抗原に対する OD 値の相関

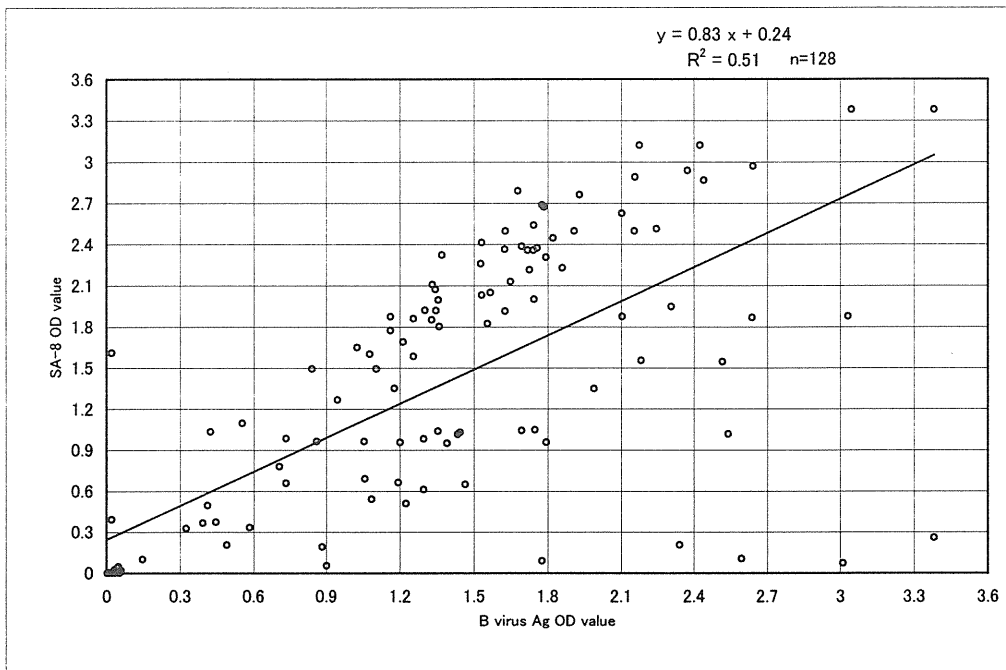


図 4. アフリカミドリザル血清における B ウイルス抗原と SA-8 抗原に対する OD 値の相関

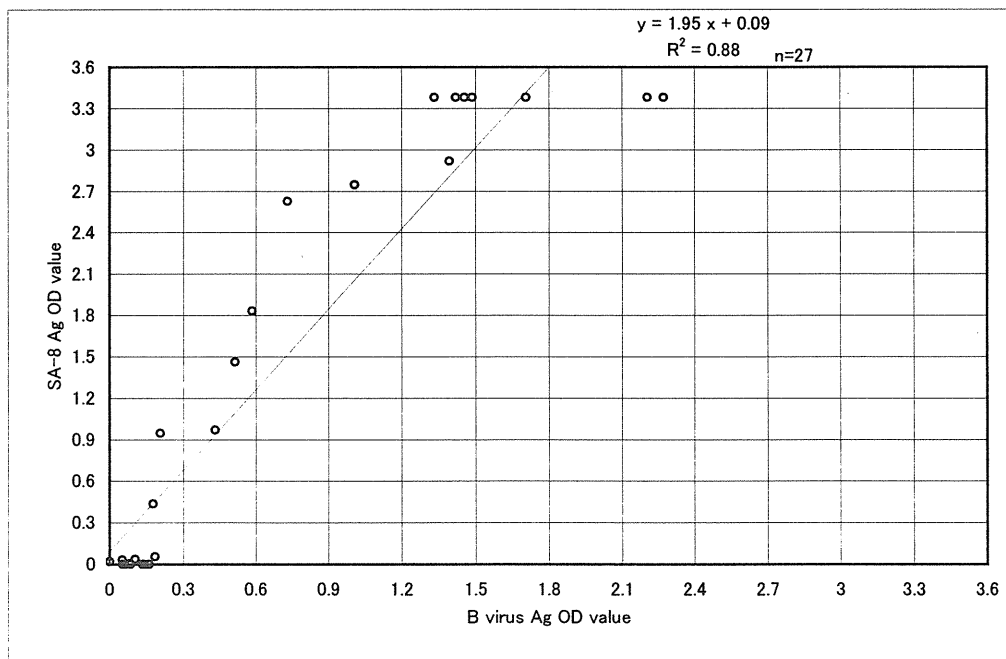


表1. カニクイザル、アカゲザル、ニホンザル血清における B ウイルス抗原と SA-8 抗原を用いた B ウイルス抗体検査結果の比較

B virus antigen	SA-8 antigen	Cynomolgus	Rhesus	Japanese
— (Negative)	—	15	34	29
	±	0	0	1
	+	1	0	1
Total		16	34	31
± (Equivocal)	—	3	1	0
	±	1	0	1
	+	0	0	0
Total		4	1	1
+ (Positive)	—	3	2	7
	±	3	1	4
	+	74	19	85
Total		80	22	96
Relative Sensitivity		0.96	0.92	0.93
Relative Specificity		0.94	1.00	0.97
Predictive Value, Positive Test		0.99	1.00	0.99
Predictive Value, Negative Test		0.84	0.94	0.82

アジア産マカク属サルBウイルスの特異的検出法に関する基礎研究 III

分担研究者 向井鎌三郎 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター
研究協力者 小松原博文 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター
棚林 清 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター
R. Eberle 米国オクラホマ州立大学、獣医学部、感染症学科
山田 章雄 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター

研究要旨 アジア産マカク属サルBウイルスはヒトに感染すると致死性である。従って、抗Bウイルス抗体の検出及び、PCR法によるBウイルスDNAの検出を通じて、Bウイルス感染サルを個体レベルでの日常から把握しておくことは、万が一ヒトへの感染の可能性が考えられるような事態に対応するために必要である。本研究では、第1にnested PCR法を用い霊長類（ヒト・サル）の α ヘルペスウイルスゲノムの高感度・特異的検出法を確立し、第2にこの検出系を用いて臨床検体の確定診断を行ったこと、第3には、カニクイザル5頭のうち1頭の三叉神経節からカニクイザルのBウイルスゲノムの検出を行えたことを報告する。

A. 研究目的

アジア産マカク属サルBウイルスはヒトに感染すると致死性である。従って、抗Bウイルス抗体の検出及び、PCR法によるBウイルスDNAの検出を通じて、Bウイルス感染サルを個体レベルでの日常から把握しておくことは、万が一ヒトへの感染の可能性が考えられるような事態に対応するために必要である。本研究では、nested PCR法を用い霊長類（ヒト・サル）の α ヘルペスウイルスゲノムの高感度・特異的検出法を確立し、実際の臨床検体の確定診断や、筑波医学実験用霊長類センターの退役繁殖用親サルの中から抗Bウイルス抗体陽性の個体5頭の神経節を選び、カニクイザルのBウイルスゲノムの検出を試みることを目的とした。

B. 研究方法

1) PCR法による霊長類（ヒト・サル）のヘルペスウイルスゲノムの高感度・特異的検出法の確立

Bウイルス糖蛋白質gB全領域を含むプラスミッドpMKC2をlinearizeしたものを鋳型DNAとして用いた。試みた耐熱DNAポリメラーゼはTaq Pol (PE社, Amplitaq), Tth Pol (PE社), Tth Pol (Toyobo) Ex Taq, La Taq (Takara), Tbr DNA Pol (Finnzames社)の6種類である。反応条件はBlackら1)の報告に従い、Bウイルス糖蛋白質gB領域のプライマーセットB3・B4および、B9・B10を用い、検出感度を上げるために、nested PCR法を開発した。

2) PCR法による患者の患部水疱の浸出液からのヘルペスウイルスゲノムの検出と同定

臨床検体は患者が外来初診時の左顔面水疱の浸出液とアシクロビル投与24時間後の左顔面水疱の浸出液の2検体である。試料はいずれもで約50 μ lであり、フェノール・クロロホルム処理後、蛻グリコーゲン存在下でエタノール沈殿を行い、試料中核酸の精製を行なった。PCRの条件は研究方法1)に述べたとおりである。

3) カニクイザル神経組織からのBウイルスDNAの検出と同定

筑波医学実験用霊長類センターの退役繁殖用親サルの中から抗Bウイルス抗体陽性の個体5頭のカニクイザルを選び、筑波医学実験用霊長類センターのP3施設内のクラスII-A解剖台を用い、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定に従って、三叉神経節を摘出し、神経組織からゲノムDNAの抽出を行った1), 2)。

(倫理面への配慮)

研究の実施にあたっては、国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って、退役繁殖用親サルの中から抗Bウイルス抗体陽性の個体5頭を選び、安楽殺時には動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

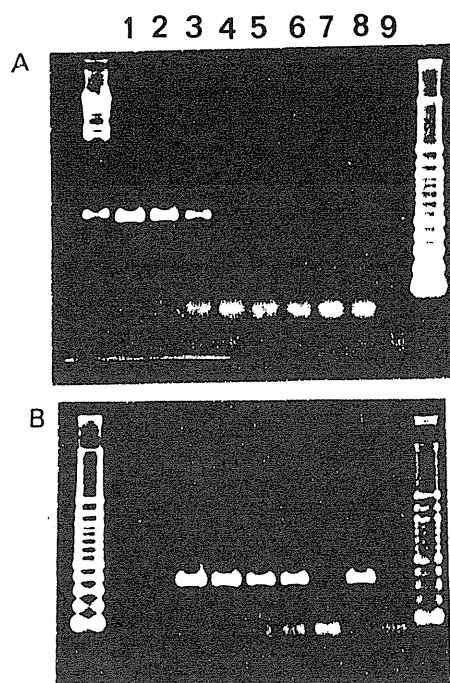
C. 研究成果

1) PCR法による霊長類（ヒト・サル）のヘルペ

スウイルスゲノムの高感度・特異的検出法の確立

Bウイルス糖蛋白質gB全領域を含むプラスミッドpMKC2を鋳型DNAとして、Blackら¹⁾の報告に従い、Bウイルス糖蛋白質gB領域のプライマーセットB3・B4および、B9・B10を用いて、nested PCR法を開発した。耐熱DNAポリメラーゼとしては6種類を試みたが、nested PCR法を用いても $10^9 \sim 10^8$ コピー程度しか検出できなかった。そこで、プラスミッド鋳型DNAのNegative superhelical Turnが鋳型活性を低下させていると考え、Kpn Iを用いて、プラスミッドDNAを環状から直線状に消化 (linearize) したものをを用いたところ、nested PCR法による検出感度は $10^7 \sim 10^6$ コピーに上昇した。そこで、GC含量が高くても検出感度がよいとされるTbr DNA Pol (Finnzames社)を用いたところ、B3・B4プライマーを用いた1回目のPCRで 10^4 コピーまで、B9・B10プライマーを用いたnested PCRで1コピーまで検出できた。(図1)

図1 pMKC2を用いたBウイルスゲノムの検出



A: 1st PCR Marker; λ Hind, 100b Ladder

B: nested PCR Marker; 100b Ladder

Lane1: 10^6 , Lane2: 10^5 , Lane3: 10^4 , Lane4: 10^3

Lane5: 10^2 , Lane6: 10^1 , Lane7: 10^0

Lane8: Vesicle pre-, Lane7: Vesicle post- Acyclovir

PCR産物のサイズは1回目のPCRで555bpであり、nested PCR産物のサイズは364bpであった。

2) PCR法による患者の患部水疱の浸出液からのヘルペスウイルスゲノムの検出と同定

以下に入手した臨床検体の入手状況を記載する。症例は70才の男性で動物実験施設の清掃を担当されている派遣社員であり、背景となる有意の基礎疾患は認められない。

当該の動物実験施設はニホンザル30頭を飼育しており、その中の3頭が抗Bウイルス抗体陽性であることが判明している。

患者は清掃時に左顔面に汚物を浴び、十分に洗浄しなかった。

2日後、汚物を浴びた部位の周辺の違和感を自覚。

3日後、症状が出現。左鼻側・左頬部に掻痒の強い紅斑、さらに小水疱を伴うようになり、皮膚症状が増悪するとともに軽度の頭痛を自覚

6日後、外来を受診。

全身状態は良好で発熱もなく、左頬部に大きさ2cm径の紅斑とその上に粟粒大の小水疱があり、左鼻側は潰瘍形成が認められた。リンパ節腫大はなく、軽度の頭痛の他には中枢神経系症状も認められず、アシクロビル投与を開始。投与量はACV 10 mg/Kg DIV 8h。

7日後、皮膚病変はやや増悪、紅斑は左鼻唇溝の方向へ拡大して約5cm径。小水疱はあまりはつきりせず、新たな潰瘍形成なし。頭痛はほぼ消失、引き続いて中枢神経系症状も認められず。また、潰瘍形成があり2次細菌感染症の合併の可能性あるが、入院時の炎症所見は陰性であった。

入院時に採取した創部浸出液の細菌培養ではグラム陽性球菌検出。

(患者は、外来受診時、その4週後のペア血清で抗HSV1、抗B抗体陽性。抗体価に変動なし。)

検査材料は下記の2検体である。

投薬前 左顔面水疱の浸出液を含む注射針先

投薬1日後 左顔面水疱の浸出液

開発したによる霊長類 α ヘルペスウイルスゲノムの高感度・特異的PCR検出法によりその検出を試みたところ、投薬前 左顔面水疱の浸出液を含む注射針先サンプルのみからnested PCRにて364bpの α ヘルペスウイルスゲノムの検出に成功した。

このバンドを回収し、Direct Sequence法にてその塩基配列を決定した結果を図2に示す。また、配列の核酸レベル、推測したアミノ酸レベルでの同源性解析結果を図3に示す。

3) カニクイザル神経組織からのBウイルスDNAの検出と同定

同様に、開発した霊長類 α ヘルペスウイルスゲノムの高感度・特異的PCR検出法を用いて、当センターの退役繁殖用親サルの中から抗Bウイルス抗体陽性の個体5頭のカニクイザルを選び、三叉神経節を摘出し、抽出したゲノムDNAからBウイルスDNAの検出と同定を試みたところ、そのうちの1頭の神経組織からnested PCR法で364bpの α ヘルペスウイルスゲノムの検出に成功した。塩基配列解析によりこの糖蛋白質gB領域は、Bウイルス標準株(E2490)とは5ヶ所の塩基置換がみられたが、Bウイルス標準株(E2490)とは5ヶ所の塩基置換がみられたが、米国ニューイングランド地域霊長類研究センターにおいて分離されたカニクイザル由来Bウイルス(*J. Virol.* 72: 9224, 1998)と1塩基置換のみが認められ、当センターの抗Bウイルス抗体陽性カニクイザル神経組織から初めてBウイルス遺伝子断片が検出された。

D. 考察

Bウイルス感染症確定診断のためのPCR検出法の開発に関し、第一には、霊長類(ヒト・サル)の α ヘルペスウイルス(HSV1,2, Bウイルス, SA8, HPV2 etc)すべてを検出する系と第二にはBウイルス遺伝子のみを特異的に検出する系の開発が考えられる。我々は、今回前者の検出系の開発に成功した。当然のことながら、後者の方がPCR法のみで迅速に確定診断できる。しかしながら、今回のケースのように、使用可能な採取された検査材料が少量で限りがある場合には、今回用いた、霊長類 α ヘルペスウイルスすべてを検出する系が有効であった。

今回のケースでは、検出できた α ヘルペスウイルスがヒトのウイルスであると診断できたことから、この症例では、清掃時に左顔面にサルの汚物を浴びたことを契機として、潜伏感染していた本人の α ヘルペスウイルスが再活性化して小水疱と強い紅斑を伴う症状が出現したと考えられた。

また、今回開発した霊長類 α ヘルペスウイルスゲノムの高感度・特異的PCR検出法を用いて、抗Bウイルス抗体陽性の個体5頭のカニクイザルの三叉神経節からのBウイルスDNAの検出を試みたところ、1頭の神経組織のみからその検出が可能であったことは、ELISA法で抗B抗体陽性サルの神経節には、BウイルスDNAは存在したとしても極微量と思われる。

今後、Bウイルスの別の遺伝子領域の検出系を開発すると共に、Bウイルス遺伝子検出のための標準操作マニュアルの作成を通じて万が一の事態に対応出来る体制を整えたい。

F. 研究発表

- 1)Black,D.H. and Eberle,R.: Detection and differentiation of primate α -herpesviruses by PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 225-231,1997
- 2)Mukai,R.,Narita,T,Kobayashi,R.Fujimoto,M. Takasaka,M.,Honjyo,S.:Survey of viral infections in nonhuman primates at Tsukuba Primate Center for Medical Science. *Topics in Primatology Vol 3:* 399-408, 1992.
- 3)Murayama Y, Mukai R, Inoue-Murayama M, Yoshikawa Y. : An African green monkey lacking peripheral CD4 lymphocytes that retains helper T cell activity and coexists with SIVagm. *Clin. Exp. Immunol.* 117, 504-512 (1999)
- 4) Fujii Y, Mukai R, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Kojima E, Murakami K, Yoshikawa Y.: Antiviral effects of 6-chloro-2,3'-dideoxyguanosine in rhesus monkey acutely infected with SIV *Antivir. Chem. Chemother.*9, 85-92 (1998)
- 5)Akari H, Ono F, Sakakibara I, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A, Yoshikawa Y.: Simian T cell leukemia virus typeI-induced malignant adult T cell leukemia like disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8+ T cell leukemia. (1998) *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, 14, 367-371

G. 知的所有権の所有状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

2 Homology of PCR product with Herpesviruses

Vesicle*	1	ACCACCTTCACCACCAACCTG-ACCGAGTACCCGCTCTCGCGCGTGGACCT-GGGGGACT	58
HSV-1 ^{*1}	1	ACCACCTTCACCACCAACCTG-ACCGAGTACCCGCTCTCGCGCGTGGACCT-GGGGGACT	58
HSV-2 ^{*2}	1	ACCACCTTCACCACCAACCTG-ACCCAGTACTCGCTCTCGCGCGTGGACCT-GGGGGACT	58
Bvirus ^{*3}	1	ACCACCTTCACGACCAACC-GCACCGAGTACGCCCTGTGCGCGCTCGACCTCGGG-GACT	58
		*****.*****.* **.****** *.*.****** ***** ** *	
Vesicle*	59	GCAT-CGGCAAG-GACGCCCCGCGACGCCATGGACCGCATCTTCGC-CC-GCAGG-TACAA	113
HSV-1 ^{*1}	59	GCAT-CGGCAAG-GACGCCCCGCGACGCCATGGACCGCATCTTCGC-CC-GCAGG-TACAA	113
HSV-2 ^{*2}	59	GCAT-TGGCCGG-GATGCCCCGCGAGGCCATCGACCGCATGTTTGC-GC-GCAAG-TACAA	113
Bvirus ^{*3}	59	GCGTCGGGC--GCGAGGCCCGAGAGGCCGTGGACCGCATCTT-CCTCCGGC--GCTACAA	113
		.* **.* **.***.** **.*.******.**.* **.* **.* **.******	
		↓	
Vesicle*	114	C-GCGACGCACATTAAGGTGGGCCAGCCGCGACTACTACCTGGCCAATGG-GGGCTTTCTG	171
HSV-1 ^{*1}	114	C-GCGACGCACATCAAGGTGGGCCAGCCGCGACTACTACCTGGCCAATGG-GGGCTTTCTG	171
HSV-2 ^{*2}	114	C-GCCACGCACATCAAGGTGGGCCAGCCGCGACTACTACCTGGCCACGGG-GGGCTTCTC	171
Bvirus ^{*3}	114	CGGC-ACGCACGTGAAGGTGGGCCAGGTGCAGTACTACCTGGCCA-CGGCCGGCTTTCTC	171
		* **.******.* **.******.* **.******.* **.******.* **.******	
Vesicle*	172	ATCGCGTACCAGCCCCCTCTCAGCAACACGCTCGCGGAGCTGTACGTGCGGGG--ACACC	229
HSV-1 ^{*1}	172	ATCGCGTACCAGCCCCCTCTCAGCAACACGCTCGCGGAGCTGTACGTGCGGGG--ACACC	229
HSV-2 ^{*2}	172	ATCGCGTACCAGCCCCCTCTCAGCAACACGCTCGCGGAGCTGTACGTGCGGGGAGTACA--	229
Bvirus ^{*3}	172	ATCGCGTACCAGCCCCCTCTCAGCAACACGCTCGTGGAGCTGTACGTGCGGGGAG--CTCC	229
		*****.* **.******.* **.******.* **.******.* **.******.* **.******	
Vesicle*	230	TCCGAGAGCA-GA--GCCGCAAGCC--CCCAAACCC-C-AC-GC--CCCCGCCGCC-C-G	277
HSV-1 ^{*1}	230	TCCGAGAGCA-GA--GCCGCAAGCC--CCCAAACCC-C-AC-GC--CCCCGCCGCC-C-G	277
HSV-2 ^{*2}	230	TGCGGGAGCAGGA---CCGCAAGCC--CCGGAATGC-C-AC-G----CCCG-CGCCACTG	276
Bvirus ^{*3}	230	TCCGCGAGCAGGAGGGCCG---GCCGGG--GA--CGCGGCGGCGACCCCGAAGCC-CT-	280
		. **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*	
Vesicle*	278	-GGGCC-AGC-G-CCAACGC	293
HSV-1 ^{*1}	278	-GGGCC-AGC-G-CCAACGC	293
HSV-2 ^{*2}	277	CGGG--AGCGGCCAGCGC	293
Bvirus ^{*3}	281	C-CGCCGA-C--CCC--C-C	293
		..*..*.* **.* **.* **.*	

* : Vesicle before Administration

*1: Hammerschmidt,W. Virology 165 (2), 388-405 (1988)

*2: Zwaagstra,J.C. Can. J. Microbiol. 33 (10), 879-887 (1987)

*3: Eberle,R. Entrez U146641

☒ 3

Homology in Nucleic Acid \ Amino Acid

	Vesicle	HSV-1	HSV-2	B virus
Vesicle		100%	84.6%	72.5%
HSV-1	99.7%		84.6%	72.5%
HSV-2	85.9%	86.2%		72.5%
B virus	75.6%	75.6%	73.1%	

Nucleic acid : 293 bp

Amino acid : 97 residue

図 4

PCR法による抗Bウイルス抗体陽性カニクイザル三叉神経節ゲノム
DNAからのBウイルスゲノムの検出と同定

材料： 5頭の抗Bウイルス抗体陽性カニクイザル三叉神経節ゲノムDNA

結果： そのうち1頭の検体より370bpのバンドが検出され、塩基配列決定の結果
Bウイルス標準株(E2490)とは5ヶ所の塩基置換がみられたが、
NERPRC USAにおいて分離されたカニクイザル由来Bウイルス*4)とは、1塩基置換
のみが認められ、TPC抗Bウイルス抗体陽性カニクイザル三叉神経節にBウイルス
遺伝子断片が検出されたと思われる。(*4 J. Virol. 72: 9224, 1998)

CyMK	1	CGCCCTCTCCACCACCTTCACGGCCAACCGCACCGAGTACGCCCTGTCGCGCGTCGACCT	60
E90-136	1	60
E2490	1A.....	60

CyMK	61	CGGGGACTGCGTCGGGCGCGAGGCCCGCGAGCCGTGGACCGCATCTTCCTCCGGCGCTA	120
E90-136	61	120
E2490	61A.....	120

CyMK	121	CAACGGCACGCACGTGAAGGTGGGCCAGGTGCAGTACTACCTGGCCACGGGCGGCTTTCCT	180
E90-136	121	180
E2490	121	180

CyMK	181	CATCGCGTACCAGCCCCCTCCTCAGCAACGAGCTCGTGGAGCTGTACGTGCGGGAGCTCCT	240
E90-136	181	240
E2490	181C.....	240

CyMK	241	CCGCGAGCAGGAGCGGGCGGCCCGGCGACCGACCCCGAAGCCCTCCGCCGACCC	300
E90-136	241C.....	300
E2490	241G.....C.....	300

CyMK	301	CCCCGACGTGGAGCGCATCAAGACCACGTCCTC	333
E90-136	301	333
E2490	301	333

Bウイルスの遺伝子診断と分子疫学に関する基礎的研究(Ⅲ)

分担研究者 吉川 泰弘 東京大学大学院農学生命科学科 教授

協力研究者 本藤 良 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 教授

研究要旨： PCR法を応用した、Bウイルス・ゲノムの検出による、遺伝子診断と分子疫学的解析法の確立を目的として研究を進めた。Bウイルス・ゲノム上のUs領域内(ORF, Us5:gJ, Us6:gD)に、増幅DNA断片のサイズの長短、各分離株間での点変異と欠損や挿入による多型性を考慮し、プライマーのG・C含有量、アニーリングの至適温度条件、ループとダイマー形成を検索して、6カ所にセンスとアンチセンス・プライマー(各21mer)を設定した。これらのプライマーを組み合わせることにより、特徴ある6領域(A、B、C、D、E、F)での増幅を可能にした。特に、A、C、Fの3領域において、増幅効率も良く、近縁ヘルペスウイルスとの交叉増幅も少ない、特異性の高い成績を得た。この領域を基に、他の領域を組み合わせることにより、ネステッドPCRも可能となった。また、ゲノム構造の特徴を応用することにより分離株間の特性を詳細に解析することを可能にした。今後、Bウイルス感染の遺伝子診断と共に、分子疫学的解析のための実用性について検討する。

A. 研究目的

ヘルペスウイルス感染症の診断や疫学の領域に、分子生物学的手法を取り入れた、いわゆるDNA診断および分子疫学的な解析が急速な進展をなしてきた。その中でも、種々の検体からDNAを抽出し、それをもとに特異ウイルスゲノムを検出して診断根拠とする、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)法が主流をなしている。しかしながら、ヘルペスウイルスには初感染の後に潜伏感染を起こす特性がある。その潜伏ウイルスの再活性化と発病との起因関係やBウイルス陽性個体を動物実験に使う危険性などを究明するには、DNA診断法によるウイルスゲノムの検出だけではなくBウイルスの動態を解析する必要がある。

本研究では、PCR法による、Bウイルス(simian herpes B virus; SHBV)特異的ゲノムの検出とその定量化による迅速診断法の確立、サル類の感染状況とストレス等の外因による個体内での再活性化の解析、などの分子疫学的解析法に必要な増幅領域の設定とその反応系に関する基礎的条件の確立を目的とした。

B. 研究方法

1. BウイルスのPCR増幅領域の設定：

Smith, A., ら¹⁾による、糖蛋白をコードする領域(ORF, Us4; gG, Us5; gJ, Us6; gD)の全塩基配列を基に、Bウイルス・ゲノム上で、サル

・サイトメガロウイルス(simian cytomegalovirus; SCMV)、ヒト・サイトメガロウイルス(human cytomegalovirus; SCMV)、単純ヘルペスウイルス-1型、2型(herpes simplex virus; HSV-1, 2)の対応するゲノムと相同性の低い領域、およびウイルス分離株間での多型性を示す領域を考慮して、新たなPCR増幅領域を設定した。

2. プライマーの作製：

1) SHBV：Bウイルス・ゲノム上のUs領域内(ORF, Us5:gJ, Us6:gD)に、増幅DNA断片のサイズの長短、各分離株間での点変異と欠損や挿入による多型性を考慮し、プライマーのG・C含有量、アニーリングの至適温度条件、ループとダイマー形成を検索して6カ所にセンスとアンチセンス・プライマー(各21mer)を作製した。これらのプライマーを組み合わせることにより、A(HB2A:HB1B, 307bp)、B(HB2A:HB1B2, 253bp)、C(HB2A:HB2B, 662bp)、D(HB2A:HB3B2, 864bp)、E(HB3A:HB2B, 430bp)、F(HB3A:HB3B2, 632bp)の特徴ある6領域で増幅が可能である(図2、参照)。

2) HCMV：Meigata, K., ら²⁾による、HCMVのVP25をコードする610bp(CM-3, CM-2)のプライマーを作製した。このプライマーでは、SCMVゲノムが分離株間で異なったサイズで特異的に増幅される(図1.)。

3) HSV：Kimura, H., ら³⁾による、HSV

ゲノム上のDNAポリメラーゼをコードする領域の330bpを増幅領域とする1、2型共通のプライマー(KM-1, KM-2)を作製した。

3. 検体・DNA:

1) SHBV・プラスミドDNA: SMHV/pBV・DNA; pBlueSK+2.6kbp(gG, gJ, gD)⁴⁾を感染症研究所・医学実験用霊長類センターの山田章雄博士より分与された。

2) HSV・DNA: HSV-1型(K8, K200, 198株)、HSV-2型(79-29, 27, 111株)、各分離株の感染 Vero細胞 からウイルス・DNAを抽出した。

3) HCMV, SCMV・DNA: HCMV(Towne/ pDNA, AD169, KH, OK-1株)、SCMV(68-1, 1090K株)、各分離株の感染 HEL細胞から Hondo, R., ら⁵⁾の方法でウイルス・DNAを抽出した。

4. PCRの条件:

各ウイルス・ゲノム上に設定したプライマーを用いた。反応系は 100 μ lとし、① dNTPs mix (各0.2mM)、② Primer(各 0.5 μ M)、③ DNA Polymerase (Taq, 0.5unit)、④ 鋳型・DNA (各分離株・抽出DNAおよびプラスミドDNA)、10 μ l で、反応液を調整した。PCR反応は、①熱変性(94 $^{\circ}$ C, 2分)、②プライマーのアニーリング(55 $^{\circ}$ C, および58 $^{\circ}$ C, 3分)、③DNA Polymerase による相補鎖の合成(72 $^{\circ}$ C, 4分)の条件で、PCRを 30 サイクル実施した。検出には、電気泳動法を用いた。1.5%のアガロース・ゲルを用い、75mA定電流で1時間泳動した後、Ethidium bromide で染色して撮影・印画作製を行った。

C. 研究結果

Bウイルス・ゲノム上の Us領域内に設定した5領域(図2: A, B, C, D, F)について、SMHV: pBV・DNAを用いてPCRの増幅効率、および他のヒトを含む霊長類ヘルペスウイルス・DNA(HSV-1, 2, HCMV, SCMV)を用いて、プライマーの特異性を検討した。

1. A領域(HB2A:HB1B, 307bp):

増幅領域(SMHV: pBV・DNA/ 295bp)の特性を図3. に示した。E2490, SMHV株間では、欠損と挿入が局在し、増幅断片に12bpのサイズの違いがある。G・C含有量は77%で、41点の点変異が局在することから、株間での多型性を示す領域で

ある。PCRの増幅効率とその特異性を、図4. に示した。増幅効率では、1pgの鋳型DNAで電気泳動により検出が可能であった(図4. a)。プライマーの特異性では、SMHV/ pBV・DNAでは特異的に増幅され、HSV-1型(K8, K200, 198株)、HSV-2型(79-29, 27, 111株)、およびHCMV(Towne/ pDNA, AD169, KH, OK-1株)、SCMV(68-1, 1090K株)では、増幅DNA片は検出されなかった(図4. b, c)。以上の成績から、このA領域はDNA診断や分子疫学的解析に最適な領域である結果を得た。

2. B領域(HB2A:HB1B2, 253bp):

増幅領域(SMHV: pBV・DNA/ 241bp)の特性を図5. に示した。E2490, SMHV株間では、欠損と挿入が局在し、増幅断片に12bpのサイズの違いがある。G・C含有量は76%で、39点の点変異が局在することから、株間での多型性を含む領域である。PCRの増幅効率とその特異性を、図6. に示した。増幅効率では、1pgの鋳型DNAで電気泳動により検出が可能であった(図6. a)。プライマーの特異性では、SMHV/ pBV・DNAで特異的に増幅されるが、HSV-1型(K8, K200, 198株)、HSV-2型(79-29, 27, 111株)では分離株によって交叉増幅の傾向がみられた。また、HCMV(Towne/ pDNA, AD169, KH, OK-1株)、SCMV(68-1, 1090K株)では、HCMVのAD169株でのみ交叉増幅が検出された(図6. b, c)。以上の結果から、このB領域はA、C、領域でのPCR産物を鋳型としたネスト・PCR法に有効な領域であると考えられる。

3. C領域(HB2A:HB2B, 662bp):

増幅領域(SMHV: pBV・DNA/ 641bp)の特性を図7. に示した。E2490, SMHV株間では、欠損と挿入が局在し、増幅断片に21bpのサイズの違いがある。G・C含有量は70%で、136点の点変異が局在することから、株間での多型性が大きい領域である。PCRの増幅効率とその特異性を、図8. に示した。増幅効率では、0.1pgの鋳型DNAで電気泳動により検出が可能であった(図8. a)。プライマーの特異性では、SMHV/pBV・DNAで特異的に増幅され、HSV-1型(K8, K200, 198株)、HSV-2型(79-29, 27, 111株)、およびHCMV(Towne/pDNA, AD169, KH, OK-1株)、SCMV(68-1, 1090K株)で、増幅DNA片は検出せず特異性の高い結果を得た(図8. b, c)。以上の結果から、このC領域はDNA診断や分子疫学的解析に最適な領域であると考えられる。

4. D領域 (HB2A:HB3B2, 864bp) :

増幅領域 (SMHV: pBV・DNA/ 845bp) の特性を図9. に示した。E2490, SMHV株間では、欠損と挿入が局在し、増幅断片に19bpのサイズの違いがある。G・C含有量は71%で、150点の点変異が局在することから、株間での多型性を示す領域を含んでいる。PCRの増幅効率とその特異性を、図10. に示した。増幅効率では、1pgの鋳型DNAで電気泳動により検出が可能であった(図10. a)。プライマーの特異性では、SMHV/pBV・DNAで特異的に増幅された。HSV-1型(K8, K200, 198株)、HSV-2型(79-29, 27, 111株)では、1型分離株に強く交叉増幅の傾向がみられた。また、HCMV(Towne/ pDNA, AD169, KH, OK-1株)、SCMV(68-1, 1090K株)でも交叉増幅が検出された(図10. b, c)。以上の結果から、このD領域はDNA診断には不適格な領域であるが、ハイブリダイゼーション法を併用した、HSV-1, 2型との相関や制限酵素の切断解析等による分子疫学的解析には有効な領域であると考ええる。

5. F領域 (HB3A:HB3B2, 632bp) :

増幅領域 (SMHV: pBV・DNA/ 625bp) の特性を図11. に示した。E2490, SMHV株間では、欠損と挿入が局在し、増幅断片に7bpのサイズの違いがある。G・C含有量は76%で、39点の点変異が局在する。PCRの増幅効率とその特異性を、図12. に示した。増幅効率では、1pgの鋳型DNAで電気泳動により検出が可能であった(図12. a)。プライマーの特異性では、SMHV/pBV・DNAで特異的に増幅された。HSV-1型(K8, K200, 198株)、HSV-2型(79-29, 27, 111株)では、HSV-2型の27株でのみ交叉増幅がみられた。HCMV(Towne/ pDNA, AD169, KH, OK-1株)、SCMV(68-1, 1090K株)では、交叉増幅は検出されなかった(図12. b, c)。以上の結果から、F領域でのPCR産物を鋳型として、A、C領域の組み合わせによるネステッド・PCR法には有効な領域であると考ええる。

以上、Bウイルス感染の遺伝子診断とその分子疫学的解析に有用なPCRの増幅領域を複数みいだした。

D. 考 察

PCRによる診断法は、微量の検体から、設定したゲノム領域のDNA断片を必要量増幅し電気泳動あるいはハイブリダイゼーション法で

ゲノムの検出を行う手法である。診断の簡便迅速化、高感度化、検体の微量化で利点がある。しかしながら、ヘルペスウイルス科に属するウイルスのG・C含有量は一般に高いのが特徴である。その中でもBウイルスは、G・C含有量が75%で、最もG・C-richなウイルスである。また、同じ α -ヘルペスウイルス亜科に属するHSV-1, 2型との相同性が高いことから、Bウイルスの遺伝子診断あるいは分子疫学的な解析には特に困難を伴うことが多い。

本研究では、PCR法を応用した、遺伝子診断と分子疫学的解析に必要な増幅領域の設定に関する基礎条件として、①Bウイルスの分離株間で特異性があること、②分離株間で多型性を示す領域を含むこと、③近縁ヘルペスウイルスとの交叉・増幅性の少ないこと、④ネステッドPCR法に利用できること、⑤増幅産物がDNA・プローブとして利用できること、⑥定量的PCR法に適用できること、の6点を上げた。

以上の条件を考慮に入れて、PCR法による増幅領域を、Bウイルス・ゲノム上のUs領域内に、新たに6カ所(A, B, C, D, E, F領域)設定した。これらの領域には、分離株間で多型性を示す領域が局在し、増幅DNA片のサイズも異なる領域である。この6領域の内、3領域(A, C, F領域)で増幅効率も良く近縁ヘルペスウイルスとの交叉増幅も少なく特異性が高い成績を得ている。この領域を基に、他の領域のプライマーを組み合わせることにより、ネステッドPCRも可能となった。また、ゲノム構造の特徴を応用することにより、分離株間でのゲノム構造の特性を詳細に解析することも可能であると考えている。今後、本法を用いることによりBウイルス感染の遺伝子診断に止まらず、本ウイルスの初感染、潜伏感染およびその再活性化に関する分子疫学的な解析がさらに進展するものと期待される。

E. 結 論

本研究の結論を、図13. に示した。Bウイルス・ゲノム上のUs領域内(ORF, Us5:gJ, Us6:gD)に、増幅DNA断片のサイズの長短、各分離株間での点変異と欠損や挿入による多型性を考慮し、プライマーのG・C含有量、アニーリングの至適温度条件、ループとダイマー形成を検索して6カ所にセンスとアンチセンス・プライマー(各21mer)を設定した。これらのプラ

イマーを組み合わせるにより、A (HB2A: HB1B, 307bp)、B (HB2A:HB1B2, 253bp)、C (HB2A:HB2B, 662bp)、D (HB2A:HB3B2, 864bp)、E (HB3A:HB2B, 430bp)、F (HB3A:HB3B2, 632bp)の特徴ある6領域での増幅を可能にした。これら領域の内、A (増幅: SMHV; pBV・DNA/295bp、G・C含有量: 77%、点変異、欠損と挿入が局在)、C (増幅: SMHV: pBV・DNA/ 641bp、G・C含有量: 70%、点変異、欠損と挿入が局在)、F (増幅: SMHV: pBV・DNA/ 625bp、G・C含有量: 76%、点変異、欠損と挿入が局在)の3領域において、増幅効率では、1pgの鋳型DNAで電気泳動により検出が可能であり、他のヒトを含む霊長類ヘルペスウイルス (SCMV, HSV-1, 2, HCMV) との交叉増幅も無く、SMHV/ pBV・DNAでのみ特異的に増幅されたことから、DNA診断や分子疫学的解析に最適な領域が設定できた。また、この領域を基に、他の領域のプライマーを組み合わせるにより、ネステッドPCRも可能となった。また、増幅DNA片のゲノム構造の特徴を応用することによって、分離株間のゲノム構造の特性をさらに詳細に解析することも可能である結果を得た。今後、以上の解析法に、マイクロプレート・ハイブリダイゼーション法を併用した、ゲノム・コピー数の定量法を加えて、Bウイルス感染の遺伝子診断に止まらず、分子疫学的解析の実用性について検討する予定である。

参考論文

1. Smith, A., et al.: Molecular evidence for distinct genotypes of monkey B virus (Herpesvirus Simiae) which are related to the macaque host species. *J. Virol.* 72: 9224-9232, 1998.
2. Meigata K, et al.: Titration of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in urine by combined use of PCR and microplate hybridization in a renal transplant patient with HCMV pneumonitis. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 49: 121-127, 1996.
3. Kimura H, et al.: Detection of viral DNA in neonatal herpes simplex virus infections: Frequent and prolonged presence in serum and cerebrospinal

fluid. *J. Infect. Dis.*, 164: 289-293, 1991.

4. Bennett, AM., et al.: Nucleotide sequence analysis of genes encoding glycoproteins D and J in simian herpes B virus. *J. Gen. Virol* 73, 2963-2967, 1992.
5. Hondo, R., et al.: Genome variation among varicella-zoster virus isolates derived from different individuals and from the same individuals. *Arch. Virol.*, 93: 1-12, 1987.

F. 研究発表

1. 論文発表

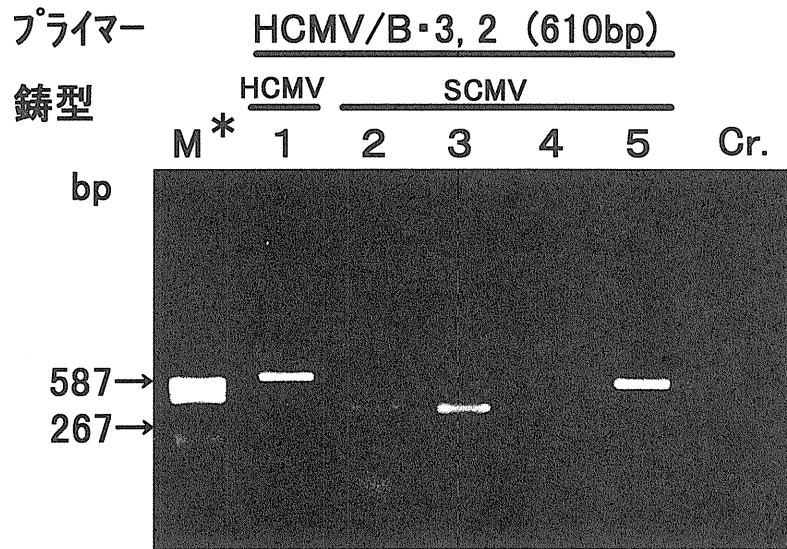
- 1) 吉川泰弘、輸入動物によるエマージングウイルスへの対策—感染症予防法とエマージングウイルス—、SUT BULLETEN 2, 7-15, 2000
- 2) 吉川泰弘、河村晴次、斉藤晋、吉崎理華、羽田裕子、エキゾチックアニマルに関するアンケート調査結果報告、JSAVA, 39, 51-55, 1999
- 3) 吉川泰弘、Bウイルス病、サル類のエボラ出血熱、マールブルグ病、in 感染症の診断、治療ガイドライン、JAMA 122、pp164-165、pp274-277、1999
- 4) 吉川泰弘、Bウイルス感染症: pp265-270、In エマージングディーズ 竹田美文、五十嵐章、小島荘明編 近代出版 1999
- 5) 吉川泰弘、学校飼育動物と人獣共通感染症: MVM., 10、59-63、1999
- 6) 吉川泰弘、サル由来のウイルス感染症: 化学療法の領域 15、27-33、1999
- 7) 吉川泰弘、川越真喜男、霊長類の輸入検疫等に関するOIE (国際獣疫事務局) の改正案について、オベリスク 2、2-18、1999
- 8) 吉川泰弘、ペット動物をめぐる主な感染

- 症とつきあい方、地域保健 3、4-26、1999
- 9) 吉川泰弘、Bウイルス病、感染症とその治療 54、170~180、1999
 - 10) 吉川泰弘、動物由来感染症と検疫、臨床と微生物 26、279-286、1999
 - 11) 吉川泰弘、エボラ出血熱、pp108-109、In 獣医感染症カラーアトラス、見上たけし、丸山務編、文永堂出版 1999
 - 12) 根岸隆之、河村晴次、吉川泰弘、黒田洋一郎、サルの神経細胞培養 Brain Medical 11, 3, 58-65, 1999
 - 13) 西村敏樹、三木健司、河西竜太、駒瀬勝啓、吉川泰弘、パプアニューギニアの亜急性硬化性全脳炎、麻疹及び麻疹予防接種：高須俊明、国分裕司、熱帯 31、251-258、1998
 - 14) 吉川泰弘、サル類の輸入、検疫に関する最近の動向、INA Res. News 55、2-3、1998
 - 15) 吉川泰弘、人獣共通感染症—その現状と行政対応—、宮城県獣医師会報 51、197-217、1998
 - 16) 吉川泰弘、狂犬病対策、感染症と化学療法 4、34-38、1998
 - 17) 加藤茂孝、新井智子、源原博子、福島雅夫、吉川泰弘、風疹ウイルス母子感染の機構とカニクイザルモデル、臨床とウイルス、26、7-12、1998
 - 18) 吉川泰弘、医薬品開発における実験用霊長類の有用性について、オペリスク 3、2-3、1998
 - 19) Otani, I., Mori, K., Sata, T., Terao, K., Doi, K., Akari, F., Yoshikawa, Y. : Accumulation of Mac387 macrophages in paracortical areas of lymph nodes in rhesus monkeys acutely infected with SIV, Micro. Infect. 1, 977-985, 1999
 - 20) Fujii Y., Akari, F., Machida, M., Kojima, E., Murakami, K., Yoshikawa, Y.: Effective delivery of a lipophilic 6-CI-ddG into rat lymphoid tissues., Exp. Anim. 48, 241-146, 1999
 - 21) Hayashi, K., Yanai, H., Koirasa, Ohara, N., Teramoto, N., Oka, T., Yoshino, T., Takahashi, K., Miyamoto, K., Fujimoto, K., Yoshikawa, Y., Akagi, T. Cyno-EBV induced rabbit malignant lymphomas and their tumor cell lines frequently show specific chromosomal abnormalities. Lab. Invest. 79, 823-835, 1999
 - 22) Kobayashi, R., Sakakibara, I., Furuta, T., Kikuchi, T., Yoshikawa, Y. Opportunistic pneumocystis carinii infection in red-bellied tamarins (*Saguinus labiatus*). Exp. Anim., 48, 55-57 1999
 - 23) Akari, F., Nam, KH., Mori, K., Otani, I., Shibata, I., Adachi, A., Terao, K., Yoshikawa, Y. Effect of SIVmac infection on peripheral blood CD4CD8 T lymphocytes in cynomolgus macaques. Clinic. Immunol., 91, 321-329, 1999
 - 24) Odagiri, K., Hamano, M., Yoshikawa, Y. Egg-eating behavior in laboratory squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). J. Vet. Med. Sci., 61, 595-601, 1999
 - 25) Liang, JH., Sankai, T., Yoshida, T., Cho, F., Yoshikawa, Y. Localization of immunoreactive testosterone and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase in cynomolgus monkey testes during postnatal development. J. Med. Primatol., 28, 62-66, 1999
 - 26) Nakayama, H., Katayama, K., Ikawa, A., Miyawaki, K., Shinozuka, J., Uetsuka, K., Nakamura, S., Kimura, N., Yoshikawa, Y., Doi, K. Cerebral amyloid angiopathy in an aged spotted woodpecker. Neurobiol. Aging 20, 53-56, 1999
 - 27) Otani, I., Akari, H., Nam, K-H., Mori, K., Suzuki, E., Shibata, H., Doi, K., Terao, K., Yoshikawa, Y. Phenotypic

- changes in peripheral blood monocytes of cynomolgus monkeys acutely infected with simian immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 14, 1181-1186, 1998
- 28) Ogonuki N., Sankai, T., Cho, F., Sato, K., Yoshikawa, Y., Comparison of two methods of assisted fertilization in cynomolgus monkeys; intracytoplasmic sperm injection and partial zona dissection followed by insemination. *Hum Reproduct.* 13, 2555-2560, 1998
- 29) Malaivijitnond, S., Takenaka, O., Sankai, T., Yoshida, T., Cho, F., Yoshikawa, Y., Effect of single and multiple injections of ketamine hydrochloride on serum hormone concentration in male cynomolgus monkeys. *Lab. Anim. Sci.*, 48, 270-274, 1998
- 30) Nam, K-H., Akari, F., Terao, K., Itagaki, S., Yoshikawa, Y., Age-related changes in major lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys. *Y., Exp. Anim.*, 47, 159-166, 1998
- 31) Imaoka, K., Ono, F., Hamano, M., Inoue, S., Yoshikawa Y., Presence of anti-ovalbumin IgE antibody in the sera of laboratory-reared squirrel monkeys fed quail eggs. , *Exp. Anim.*, 47, 195-197, 1988
- 32) Sato, H., Arikawa, J., Furuya, M., Kitoh, J., Mannen, K., Nishimune, Y., Ohsawa, K., Serikawa, T., Shibahara, T., Watanabe, Y., Yagami, K., Yamamoto, H., Yoshikawa, Y., Prevalence of herpes B virus antibody in nonhuman primates reared at national university of Japan., *Exp. Anim.*, 47, 199-202, 1998
- 33) Nam, K-H., Akari, F., Terao, K., Ohto, H., Itagaki, S., Yoshikawa, Y., Age-dependent remodeling of peripheral blood CD4CD8 Tlymphocytes in cynomolgus monkeys., *Develop. Comparra. Immunol.* 22, 239-248, 1998
- 34) Liand, J-H., Sankai, T., Yoshida, T., Cho, F., Yoshikawa, Y., Localization of testosterone and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase in cynomolgus monkey testes. *J Med. Primatol.* 27, 10-14, 1998
- 35) Akari, F., Mori, K., Otani, I., Terao, K., Ono., F., Adachi, A., Yoshikawa, Y., Induction of MHC-II DR expression on circulating CD8 lymphocytes in macaques infected with SIVmac nef-open but not with its nef deletion mutant.

図 1.

HCMV/B-3, 2プライマーによるSCMVゲノムの増幅



HCMV, SCMV増幅断片の特異性:

HCMV-DNA/1(Towne/pDNA)

SCMV-DNA/2(68-1/F3ML4)、3(68-1/HEL6)、4(1090K/6)、5(1090K/7)

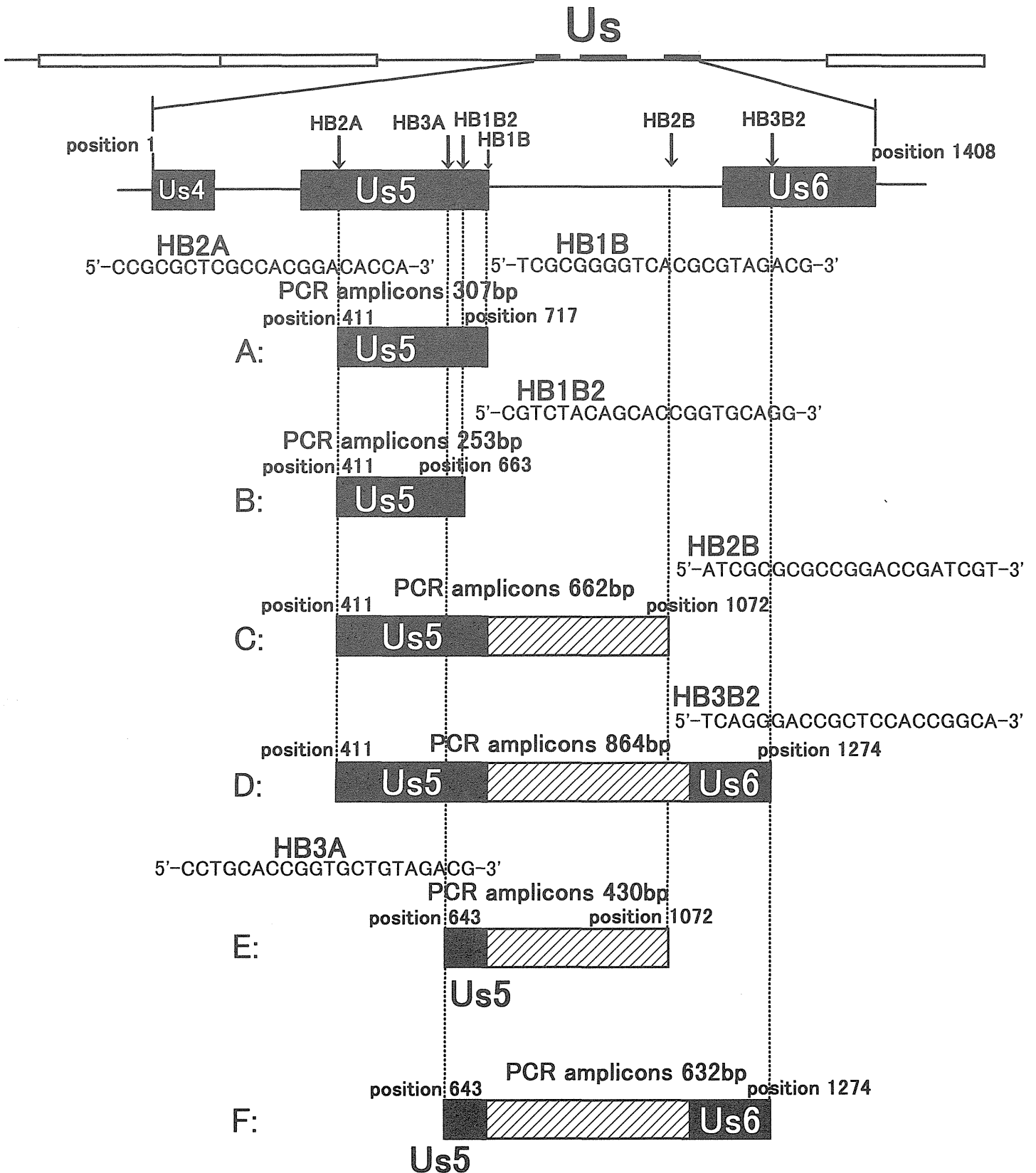
*.M: サイズマーカー

PCRの条件: 1) 熱変性; 94°C 2分、2) アニーリング; 55°C 3分、

3) 伸張; 72°C 4分、4) サイクル; 30回

図 2.

Bウイルスの遺伝子診断 PCR増幅領域の設定

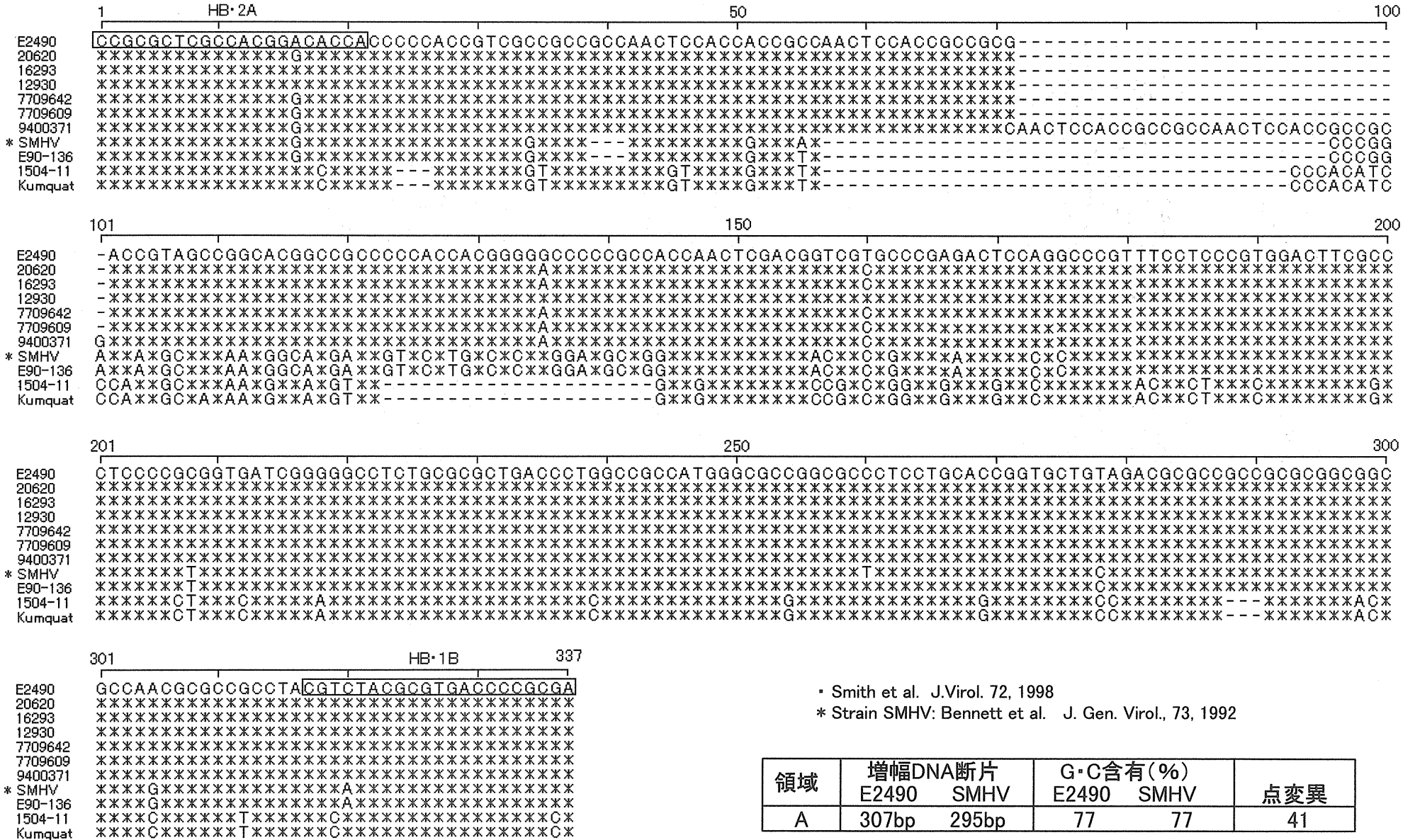


* Strain E2490 1408bp : Smith, A., et al. : J. Virol., 72, 9224 (1998)

図 3.

PCR法によるBウイルス・ゲノムの増幅領域

A領域: BV/HB-2A、HB-1B (295bp)

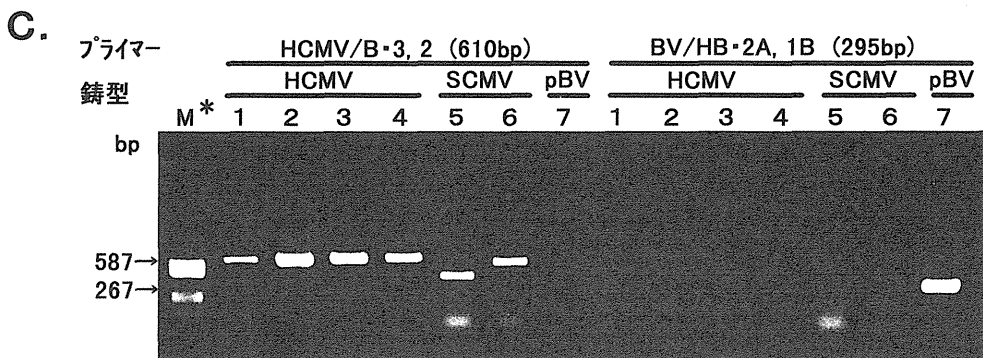
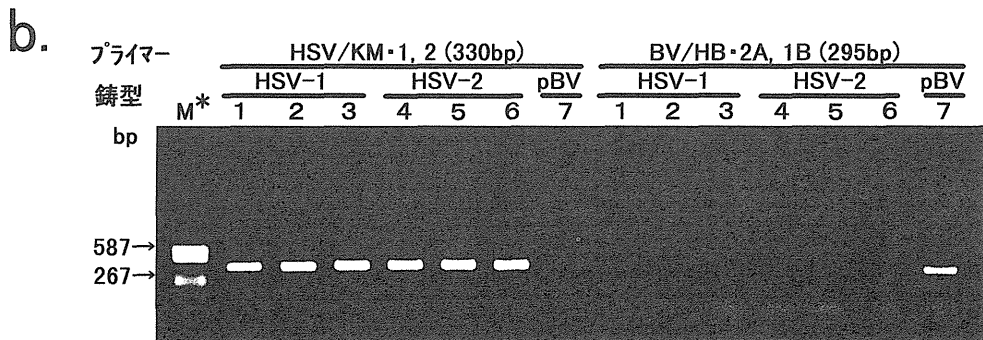
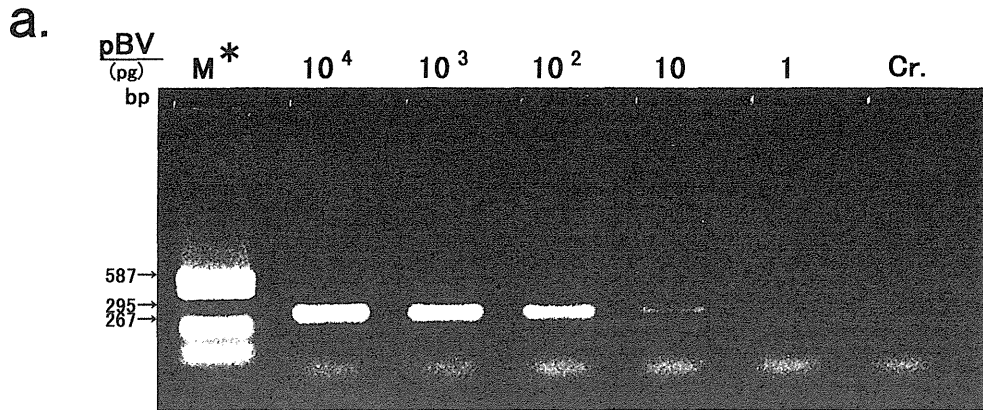


• Smith et al. J.Virol. 72, 1998
 * Strain SMHV: Bennett et al. J. Gen. Virol., 73, 1992

領域	増幅DNA断片		G・C含有(%)		点変異
	E2490	SMHV	E2490	SMHV	
A	307bp	295bp	77	77	41

図 4.

PCR法によるBウイルスゲノムの検出
A : BV/HB-2A, 1Bプライマー (295bp)の増幅効率と特異性



- a.増幅効率: pBV(pBlueSK+2.6Kbp)/Bウイルス・プラスミドDNA/b:7, c:7
 b.HSV-1, 2型との特異性: HSV-1・DNA/1(K8)、2(K200)、3(198)
 HSV-2・DNA/4(79-29)、5(27)、6(111)
 c.HCMV,SCMVとの特異性: HCMV・DNA/1(Towne/pDNA)、2(AD₁₆₉)、3(KH)、4(OK-1)
 SCMV・DNA/5(68-1)、6(1090K)

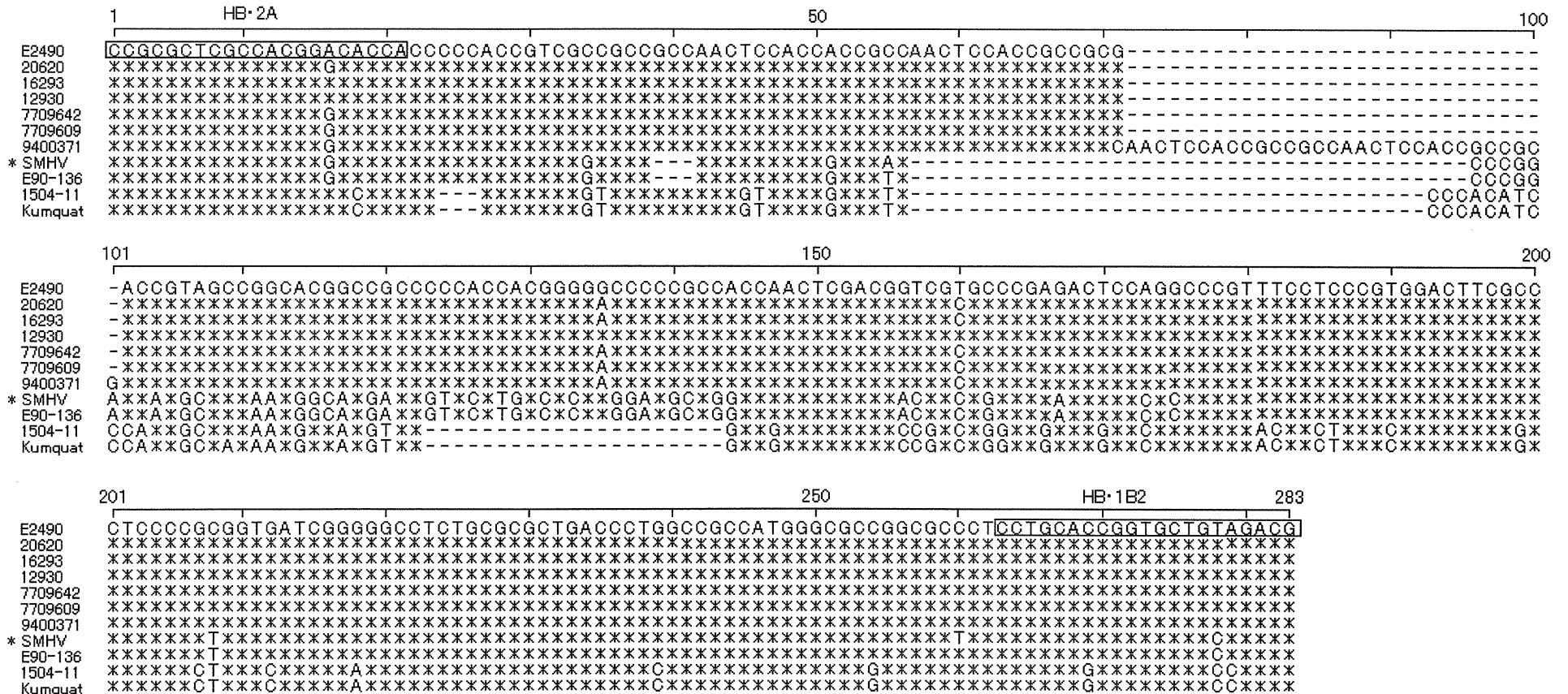
*.M: サイズマーカー

PCRの条件: 1)熱変性; 94°C 2分、2)アニーリング; 55°C 3分、
 3)伸張; 72°C 4分、4)サイクル; 30回

図 5.

PCR法によるBウイルス・ゲノムの増幅領域

B領域: BV/HB-2A、HB-1B2 (241bp)

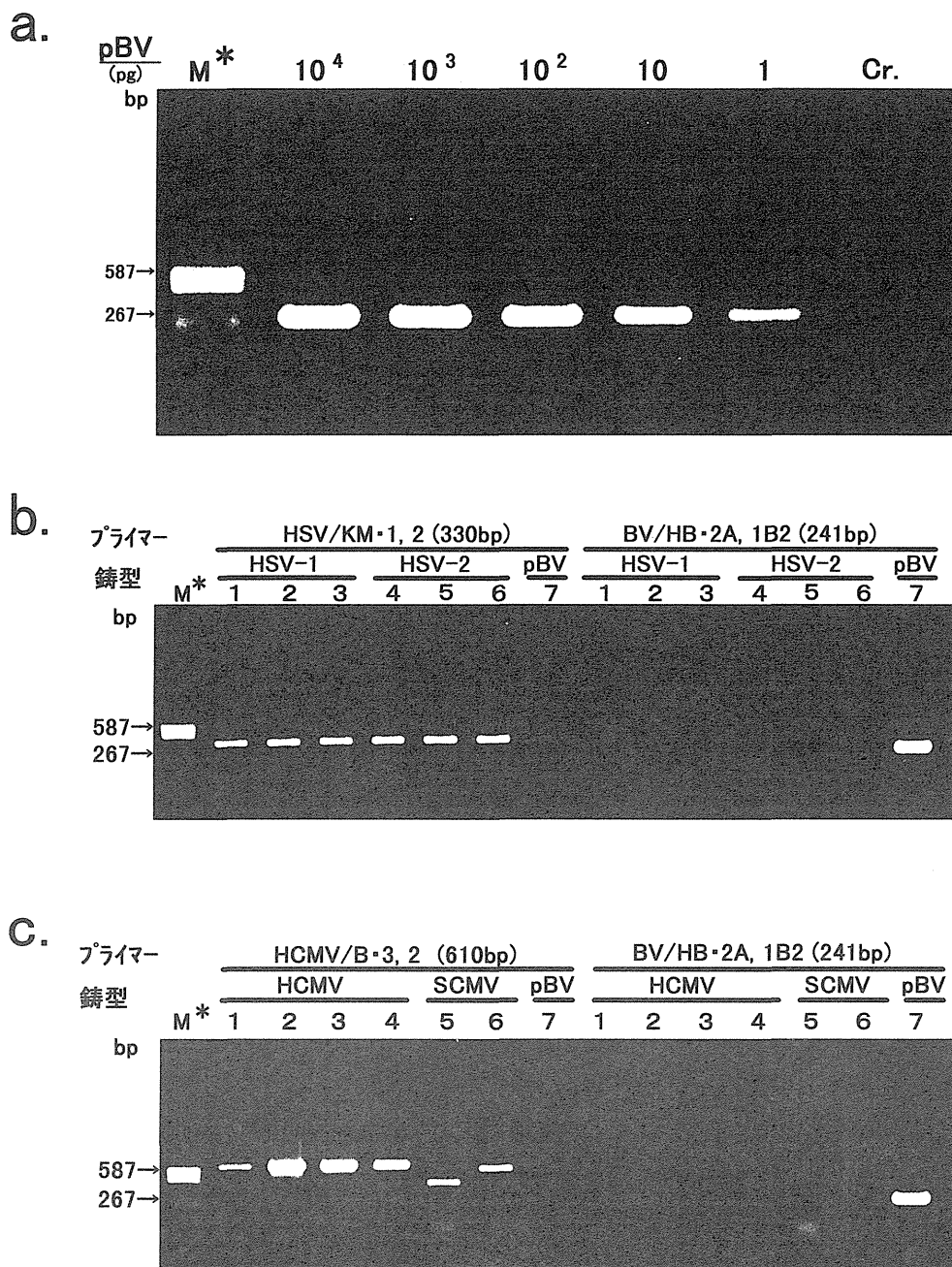


• Smith et al. J.Virol. 72, 1998
 * Strain SMHV: Bennett et al. J. Gen. Virol., 73, 1992

領域	増幅DNA断片		G・C含有(%)		点変異
	E2490	SMHV	E2490	SMHV	
B	253bp	241bp	76	76	39

図 6.

PCR法によるBウイルスゲノムの検出
 B : BV/HB-2A, 1B2プライマー (241bp)の増幅効率と特異性



a.増幅効率: pBV(pBlueSK+2.6Kbp)/Bウイルス・プラスミドDNA/b:7, c:7
 b.HSV-1, 2型との特異性: HSV-1・DNA/1(K8), 2(K200), 3(198)
 HSV-2・DNA/4(79-29), 5(27), 6(111)
 c.HCMV,SCMVとの特異性: HCMV・DNA/1(Towne/pDNA), 2(AD₁₆₉), 3(KH), 4(OK-1)
 SCMV・DNA/5(68-1), 6(1090K)

*.M: サイズマーカー

PCRの条件: 1)熱変性; 94°C 2分、2)アニーリング; 58°C 3分、
 3)伸張; 72°C 4分、4)サイクル; 30回