

博士(医学) 小原 恵彦

学位論文題名

ヒト脊髄神経節細胞における単純ヘルペスウイルス1型  
および2型の潜伏感染状況の検索

学位論文内容の要旨

緒言

単純ヘルペスウイルス(herpes simplex virus: HSV)はHSV-1とHSV-2の2つの subtype に分類されている。ヘルペスウイルスの特徴的なことは、神経節への潜伏感染である。一般的には、三叉神経領域を中心とする口腔領域には、HSV-1(1型)が存在し、仙骨部脊髄神経支配領域には、HSV-2(2型)が存在すると言われている。臨床的には、上肢、手背部や、臀部にも、ヘルペス様の水疱性病変が見られることも知られている。また、初感染では、口唇、陰部ヘルペス共に、1、2両型によるものが認められるが、回帰発症においては、口唇からは1型、陰部からは2型のヘルペスウイルスが検出される。しかし、現在まで、脊髄神経節全体にわたって、HSVの潜伏状況を検索したという報告はない。今回、病理解剖症例より、ほぼ全てにわたる脊髄神経節を採取し、polymerase chain reaction(PCR)法を用いて、HSVの1型と2型の潜伏感染状況を検索した。

材料

北海道大学付属病院において病理解剖された7症例から脊髄神経節組織を採取した。7例の内訳はprogressive systemic sclerosis, transitional cell carcinoma of the urinary system, non-Hodgkin lymphoma, colon cancer, small cell lung cancer, autoimmune disease, chronic myelocytic leukemia の各1例で、平均年齢は59.8歳で男4例、女3例、である。いずれも死後3時間20分以内に剖検が開始されている。剖検時にはいずれの症例でもヘルペス性の病変は認められていない。死亡時採取した血清についてはウイルス抗体価を検索した。

脊椎をストライカで、脊髄後根神経節が出る断面で切除し、一つ一つ高さの番号を確認しながら、神経節を採取し冷水した容器に入れた。採取した神経節はすぐに、-液体窒素で凍結し、-70°Cに保存し、フェノール-クロロフォルム法を用いて高分子DNAを抽出し、各  $1\mu\text{g}$  を検体とした。

#### Polymerase Chain Reaction (PCR) 法

各検体（高分子DNA  $1\mu\text{g}$ ）より HSV-1, HSV-2, human  $\alpha$ -tubulin に各々特異的なプライマーを用いて、PCR法によりDNAを増幅した。

反応条件は、HSV-1及びHSV-2については93°C1分（熱変性）、67°C 1分（アニーリング）、72°C2分（合成反応）、また  $\alpha$ -tubulin については93°C2分、55°C2分、72°C3分で各々30サイクル施行した。

#### サザン法による解析

各  $10\mu\text{g}$  のPCR産物を2%アガロースゲルあるいは3% Nusiveアガロース1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロン膜に転写した。紫外線照射あるいは80°Cで2時間乾熱処理し、DNAを膜に固定した。陽性対照としてHSV-1及びHSV-2のウイルスDNAを鋳型としてPCR法により増幅したDNAを用い、また陰性対照としてはPCRを施行していない高分子DNA(Case2)  $1\mu\text{g}$  を使用した。  $\alpha$ -tubulin のプライマーを用いたPCR産物については臭化エチジウムによる染色のみを行った。

DNAプローブの標識はHSV-1 K193株ウイルスDNAより前述の如くPCR法で増幅して得たDNAを [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTPを用いたランダムプライム標識法あるいは digoxigenin-11-d UTPを用いたPCRラベリング法にて行った。このプローブはHSV-1とHSV-2に共通な塩基配列を含んでおり、両方のシグナルを検出する。

#### 結果

陽性コントロールとして使用したヘルペスウイルスの遺伝子のバンドは1型、2型ともに全て陽性であった。陰性コントロールでバンドの出

現したものは無かった。また、全検体より  $\alpha$ -tubulin に特異的なプライマー対を用いて DNA を增幅解析することにより各検体の intactivity を確認した。したがって PCR による遺伝子増幅が適切に行われており、検索材料からの PCR、サザン法による解析で、HSV の潜伏感染を評価できる実験系が確立された。

1型、2型ともに、頸部より仙髄部にいたる各レベルの脊髄神経節でその増幅が確認され、陽性となった神経節は頸髄で 1型 28% (11/40), 2型 38% (15/40), 胸髄で 1型 50% (52/103), 2型 46% (47/103), 腰髄で 1型 30% (16/53), 2型 32% (17/53), 仙髄で 1型 15% (3/20), 2型 15% (3/20) であった。全体的に見ると、とくに原疾患との関連や年令、男女差、左右差をみいだすことは出来なかった。

剖検時採取した血清は、Neutralization test で 1型と 2型を調べ、Ig-G enzyme immunoassay 法で 1型を調べた結果、全ての症例において両型とも陽性であった。

### 考察

分子生物学的手技を用いて、潜伏感染している HSV-1 と 2 の DNA をほぼ全てにわたる脊髄神経節で検索したのは、この研究が初めてである。従来の報告では胸部神経節組織で、HSV-1 の潜伏感染を認めたが、HSV-2 は、陰性であったという所見や、仙骨神経節には、2型のみが陽性であったという結果が報告されている。これらの報告からは、上部に 1型が、下部には、2型が潜伏しているということが示唆される。

しかし実験動物を用いた研究によると、三叉神経節に 2型が潜伏感染することが判明し、HSV は 1型も 2型も神経節細胞には、頸髄から仙髄まで、いずれの神経節でも部位を問わず潜伏感染しうるということも示唆されていた。

今回の研究では頸部神経節にも 2型が多数潜伏しており、さらに仙骨部神経節には 2型と同じ率で 1型の潜伏感染の存在を確認することができた。したがって、回帰発症において、口唇部を中心としたヘルペスは、1型であり、陰部ヘルペスは、2型であるという型別は、潜伏感染部位

の住み分けによるものではなく、再燃時における宿主側の因子とウイルス活性化因子との相互作用などが関連しているものと推測された。

今後 *in situ hybridization*- 法による神経節で潜伏感染しているウイルス遺伝子の細胞レベルでの証明、さらに上肢や体幹部などの回帰発症病変部でのウイルス型同定などが重要な研究課題と考えられた。

### 結語

ヒト病理解剖の7症例から広範囲に脊髄神経節を採取し、PCR法にて単純ヘルペスウイルスの1型と2型の潜伏感染状況を調べた。その結果、1型も2型も頸髄から仙髄まで特定の部位に片寄ることなく潜伏感染していることが証明された。従って単純ヘルペスウイルスの回帰発症の部位特異性は、ウイルスの住み分けによるものではなく、再燃時における宿主の局所的要因との関連によるものと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 長嶋和郎  
副査 教授 大河原 章  
副査 教授 上出利光

## 学位論文題名

### ヒト脊髄神経節細胞における単純ヘルペスウイルス1型 および2型の潜伏感染状況の検索

目的：単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus : HSV) は HSV-1 と HSV-2 の 2 つの subtype に分類されている。一般的には、三叉神経領域を中心とする口腔、顔面領域の神経節には 1 型が潜伏感染し、仙骨部脊髄神経節には HSV-2 が潜伏感染しているとされている。臨床的には、上肢、手背部や、臀部にも、ヘルペス様の水疱性病変が見られることが知られている。また、初感染では、口唇、陰部ヘルペス共に、1、2 両型によるものが認められるが、回帰発症においては、口唇からは 1 型、陰部からは 2 型のヘルペスウイルスが検出される。しかし、現在まで、脊髄神経節全体にわたって、HSV の潜伏状況を検索したという報告はない。今回ヒト病理解剖症例から広範囲に脊髄神経節を採取し、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて、単純ヘルペスウイルスの 1 型と 2 型の潜伏感染状況を調べた。

材料と方法：北海道大学医学部付属病院において病理解剖された 7 症例から脊髄神経節組織を採取した。平均年齢は 59.8 歳で男 4 例、女 3 例、である。いずれも死後 3 時間 20 分以内に剖検が開始されている。剖検時にはいずれの症例でもヘルペス性の病変は認められていない。剖検時採取した血清についてはウイルス抗体価を検索した。

採取した神経節からは、フェノール-クロロフォルム法を用いて高分子DNAを抽出し、HSV-1、HSV-2、に各々特異的なプライマーを用いて、PCR 法により DNA を増幅し、その PCR 産物をサザンブロッティング法を用いて解析した。human  $\alpha$ -tubulin のプライマーを用いた PCR 法により抽出 DNA の確認をした。

DNA プローブの標識は HSV-1 ウィルス DNA より前述の如く PCR 法で増幅して得た DNA を  $[\alpha - ^3P]$  dCTP を用いたランダムプライム標識法あるいは digoxigenin-11-d UTP を用いた PCR ラベリング法にて行った。このプローブは HSV-1 と HSV-2 に共通な塩基配列を含んでおり、両方のシグナルを検出する。

結果と考察：1型、2型とともに、頸部より仙腸部にいたる各レベルの脊髄神経節でその増幅が確認され、陽性となった神経節は頸髄で1型28% (11/40), 2型38% (15/40), 胸髄で1型50% (52/103), 2型46% (47/103), 腰髄で1型30% (16/53), 2型32% (17/53), 仙腸で1型15% (3/20), 2型15% (3/20), であった。全体的に見ると、とくに原疾患との関連や年令、男女差、左右差をみいだすことは出来なかった。

血清は、Neutralization test で1型と2型、Ig-G enzyme immunoassay 法で1型を調べた結果、全ての症例で両型とも陽性であった。

従来の報告では胸部神経節組織で HSV-1 の潜伏感染を認めたが、HSV-2は陰性であったという所見や、仙骨神経節には2型のみが陽性であったという結果が報告されている。これらの報告からは、上部に1型が、下部には2型が潜伏しているということが示唆される。

三叉神経節に2型を潜伏感染させた動物実験により、いずれの神経節でも部位を問わず潜伏感染しうるということも示唆されていた。

今回の研究では頸部神経節にも2型が多数潜伏しており、さらに仙骨部神経節には2型と同じ率で1型の潜伏感染の存在を確認することができた。したがって、回帰発症において、口唇部を中心としたヘルペスは1型で、陰部ヘルペスは2型であるという型別は、潜伏感染部位の住み分けによるものではなく、再燃時における宿主側の因子とウイルス活性化因子との相互作用などが関連しているものと推測された。

今後 in situ hybridization 法による神経節で潜伏感染しているウイルス遺伝子の細胞レベルでの証明、さらに上肢や体幹部などの回帰発症病変部でのウイルス型同定などが重要な研究課題と考えられた。

口頭発表にあたり、大河原教授より、潜伏感染の再活性化時の局所要因について、上出教授より単純ヘルペスウイルスとレセプターとの関係について、さらに小林教授、斎藤和雄教授、生田教授より多数の質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答をした。また副査の大河原、上出両教授には個別の審査を受け合格と判定された。

以上本研究は、病理解剖から多数の脊髄神経節を採取しPCR-法を用いて神経節細胞に潜伏感染している単純ヘルペスウイルス1型と2型のDNAを検索し、その潜伏感染状況を明らかにしたもので、単純ヘルペスウイルス1型および2型の潜伏感染と回帰発症の機序の解明に寄与するものであり、よって博士（医学）の学位授与に充分値するものと判定された。