

学位論文題名

ヒト好Tリンパ球性ウイルスⅡ型 (HTLV-Ⅱ) の  
Long Terminal Repeat

遺伝子配列と制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析

学位論文内容の要旨

I. 緒言

HTLV-Ⅱ感染は、多くの生粋のアメリカインディアン住民、欧米の静注麻薬常用者 (IVDAs) の間で広く蔓延していることが報告されている。HTLV-Ⅱの病原性を示すものとして慢性進行性脊髄症やリンパ球増殖性疾患との関連を示唆する報告もあるが、未だ特定の疾患の原因として確立されたものはない。HTLV-Ⅱに関する分子生物学的分析ではサブタイプⅡa (HTLV-Ⅱa) とサブタイプⅡb (HTLV-Ⅱb) の2種類のサブタイプの存在が知られている。両タイプ間の遺伝子配列の変化の割合は、調べる遺伝子部位によって様々であり、約3.5~6.7%であるが、その変化はLong Terminal Repeat (LTR)領域内にもっとも顕著であることが判明している。そこで我々は、LTR領域の分析を詳しく行うことで、このウイルスの特性をさらに追求することを目的とし、IVDAs、アメリカインディアン、北アメリカ都市地域から得られた多数の検体について、塩基配列分析と制限酵素断片長多型 (RFLP) 法を用いて調査した。

II. 材料と方法

1. 研究対象と検体

合計18名のHTLV-Ⅱ感染者から末梢血単核球を採集し遺伝子配列分析に供した。その内、8名はサブタイプⅡa、10名はサブタイプⅡbに感染していた。以上の他に36件のHTLV-Ⅱ感染者の検体をNew York血液センターから入手し、RFLP分析法によって調べた。

2. Polymerase Chain Reaction (PCR)法

遺伝子増幅はごく少量の検体DNAを用いたnestedPCR反応により行われた。最終増幅DNAは494塩基であった。

3. 増幅産物のクローニングと核酸塩基配列分析

PCR後、増幅産物をPCR-Script™ SK (+)ベクターを用い、クローン化した。リコンビナントクローンから得られたプラスミドDNAを自動シーケンス装置を使って、各々の検体につき2~3個の

クローンの塩基配列分析を行った。その中からコンセンサスシーケンスを得て系統発生分析 (Phylogenetic analysis) に用いた。Quasispecies分析には、type IIb (FUC) の増幅産物から15クローンを選び、上記の方法によりすべてのクローンの塩基配列を決定した。

#### 4. 制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析

PCR産物を直接1単位の *Ava*II, *Ban*II, *Bgl*I, *Bsu*36I, *Mse*I, *Sac*II, *Sma*I制限酵素を用いて消化した。RFLP分析の妥当性を確認するために、New York血液センターから得られた36検体と、HTLV-IIに感染した4名の供血者とその各々の受血者の計8検体を同様の制限酵素を用いて消化し、制限酵素部位同定のためのコンピュータプログラムを使用して検討した。

#### 5. 系統発生分析 (Phylogenetic analysis)

HTLV-II株内での系統発生分析をCLUSTAL V program packageを使って決定した。今回新たに得られた18例の塩基配列に加え、以前に発表されている2例のサブタイプIIa(MoT,KT)、2例のサブタイプIIb (NRA, G12)も含めて系統発生樹枝図作成を行った。

### III. 結果と考察

HTLV-II感染者18名のウイルスDNAの5'末端LTR領域塩基配列から、制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析に用いる制限酵素地図を上記7種類の制限酵素部位に基づいて作成した。その結果、系統発生グループと予想されたRFLPグループ間に密接な関連性が認められ、サブタイプIIaは4グループ (a1-a4)、サブタイプIIbは6グループ (b1-b6) のRFLPグループに細分類された。さらに、塩基配列分析に用いた18個人すべてのウイルスDNAをこれらの制限酵素を用いて消化したところ、これらのグループ内に効率よく分類された。HTLV-II感染の特徴をRFLP分析法にて迅速診断できることを確認するために、New York血液センターのHTLV-II感染供血者からの36検体を用いて同様の制限酵素による消化試験を行った。その結果、すべての検体を予想したRFLPグループのいずれかに分類することができ、このRFLP分類法の有用性が評価された。また、この手法によって、輸血における供血者と受血者間のウイルスサブタイプ内のRFLPグループの一致が示され、HTLV-II感染が輸血によって起こったものであることも確認された。また、HTLV-IIのquasispeciesの存在を確認するために1例のHTLV-IIb感染者から得た15クローンの塩基配列分析を行った。その結果、4クローンに塩基配列変化が起きたが、これらのRFLPパターンはサブタイプIIb内のいずれのグループにも一致しておらず、提唱したRFLPグループが、quasispeciesの存在によって著しく影響を及ぼされることはないとは推定された。

### IV. 結 語

HTLV-IIのlong terminal repeat (LTR)には遺伝子変異が最も多く存在することを利用し、多数の症例を用いてLTRの塩基配列を調べ、かつ制限酵素断片長多型(RFLP)分析を行うことによりHTLV-IIの細分類が可能であるかを検討した。18名のHTLV-II陽性患者の末梢血を検索した結果HTLV-IIaはさらにa1~a4までの4つのグループに、HTLV-IIbはb1~b6までの6つのグループに細分類することができた。また同時にHTLV-IIにおけるquasispeciesの有無を検討したところ、quasispeciesの存在が示

唆されたが、RFLP解析に影響を及ぼす程のものでは無いことが明らかとなった。RFLP分析法の妥当性を検討するためNew York市血液センターの供血者より得たHTLV-II陽性血液36検体を調べたところ、全て細分類に分類可能となり、RFLP分析法の有効性が実証された。さらに供血者と受血者とが明らかな4検体は全て正確に1対1に対応していることも判明した。従ってHTLV-IIのLTRを対象としたRFLP分析法は迅速かつ正確にHTLV-IIを同定することが可能であり、種々の人種におけるHTLV-II感染の特徴と疫学とを調べるうえで極めて有用な方法と思われた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柿 沼 光 明  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

## 学 位 論 文 題 名

### ヒト好Tリンパ球性ウイルスⅡ型 (HTLV-Ⅱ) の Long Terminal Repeat

#### 遺伝子配列と制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析

HTLV-Ⅱ感染は、多くの生粋のアメリカインディアン住民、欧米の静注麻薬常用者 (IVDAs) の間で広く蔓延していることが報告されている。そこで静注麻薬常用者、アメリカインディアンを含む、北アメリカ都市地域から得られた多数の検体に感染したHTLV-ⅡのLTR領域の塩基配列分析と制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析を行うことで、このウイルスの分子疫学的特徴を目的として調査した。

合計18名のHTLV-Ⅱ感染者から末梢血単核球を採集し遺伝子配列分析に供した。以上の他にHTLV-Ⅱ感染者の36検体と、このウイルスに感染した4名の供血者とその各々の受血者の計8検体をNew York血液センターから入手し、RFLP分析法による消化試験に用いた。遺伝子増幅はごく少量の検体DNAを用いたnestedPCR反応によっておこない、最終増幅DNAは494塩基であった。続いて増幅産物をPCR-Scriptベクターを用いてクローン化し、自動シーケンス装置を用いて塩基配列を決定した。Quasispecies分析には、type Ⅱbの患者 (FUC) から15クローンを選び、すべてのクローンの塩基配列を決定した。制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析は、コンピュータプログラムによる塩基配列分析によって選び出された7種類の酵素を用いて行われた。系統発生 (Phylogeny) 分析は、HTLV-Ⅱ株内での系統発生樹枝図をコンピュータプログラムCLUSTAL V packageを使って決定した。解析には今回新たに得られた18例の塩基配列に加え、以前に発表されているそれぞれ2例のサブタイプⅡa (MoT, KT)、Ⅱb (NRA, G12)を含めた。

HTLV-II感染者18名のウイルスDNAの5'末端LTR領域塩基配列から、制限酵素断片長多型（RFLP）分析に用いる制限酵素地図を作成したところ、このRFLPグループと系統発生グループと間に密接な関連性が認められた。この結果に基づき、サブタイプIIaは4グループ（a1-a4）、サブタイプIIbは6グループ（b1-b6）に細分類された。さらに、塩基配列分析に用いたウイルスDNAをこれらの制限酵素を用いて消化したところ、これらのグループ内に効率よく分類された。HTLV-II感染の特徴をRFLP分析法にて迅速診断できることを確認するために、New York血液センターのHTLV-II感染供血者からの36検体を用いて同様の制限酵素による消化試験を行った。その結果、すべての検体を予想したRFLPグループのいずれかに分類することができ、このRFLP分類法の有用性が評価された。また、この手法によって、輸血における供血者と受血者間のウイルスサブタイプ内のRFLPグループの一致が示され、HTLV-II感染が輸血によって起こったものであることも確認された。さらに、HTLV-IIのquasispeciesの存在を確認するために1例のHTLV-IIb感染者から得た15クローンの塩基配列分析を行った。その結果、4クローンに塩基配列変化が起きたが、これらのRFLPパターンはサブタイプIIb内のいずれのグループにも一致しておらず、提唱したRFLPグループが、quasispeciesの存在によって著しく影響を及ぼされることはないとは推定された。

以上、本研究によってHTLV-IIのLTRを対象としたRFLP分析法は迅速かつ正確にHTLV-IIを同定することが可能となり、種々の人種におけるHTLV-II感染の特徴と疫学とを調べるうえで極めて有用なものである。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。