単純ヘルペスウイルス1型潜伏感染マウスにおける中枢神経系内ウイルスゲノムの構造変化に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 菊本, 弘次
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8032

単純ヘルペスウイルス1型潜伏感染マウスにおける中枢神経系内ウイルスゲノムの構造変化に関する研究

金沢大学医学部公衆衛生学講座（主任：岡田　晃教授）
菊　本　弘　次

(昭和63年2月29日受付)

単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1)潜伏感染BALB/cマウスを用いて，中枢神経系に特異的なウイルスゲノムの構造変化の有無を検討した．また，再発ヘルペス症と思われる病変を示したマウスを用いて，HSVゲノムの存在量と再発との関連性も調べた．潜伏感染マウスは，HSV-1・HF株をマウス角膜に接種することによって作成した．HSV-1の潜伏は三叉神経節と感受性細胞との共生培養を行い，感染性ウイルスを救済することによって証明した．組織中のウイルスゲノムの解析は，組織から抽出したDNAを制限酵素BamHIで消化し，アガロースゲルで電気泳動した．分離したDNA断片をSouthern法を用いてニトロセルロース膜に移した後，^{32}Pで標識したBamHI-C断片とハイブリダイゼーションを行った．プローブに用いたBamHI-C断片は，HSV-1・DNAからクローニングした断片であり，この断片はHSV-1のマップ上U_L部に位置し，細胞DNAと相同性を全く示さないことを確認した．ほとんどの個体の大脳皮質と脳幹からC断片と，C断片が著しく小さくなった4Kb断片とを検出した．この4Kb断片は，三叉神経節では検出されなかった．ヘルペス再発マウスの中枢神経系では，C断片の検出量が多かった．以上のことから中枢神経系に存在する一部のゲノムには，特異的なU_L領域の構造変化が生じていることと，再発によりマウス中枢神経系でHSV-1ゲノム量が蓄積することが推定された．

Key words　Herpes simplex virus type 1, Latently infected mouse, Central nervous system, Southern blot hybridization, Structural modification

単純ヘルペスウイルス（herpes simplex virus: HSV)は，ヒトでの初感染においては，通常目立った病変を生じさせることなく体内に潜伏し，時々何等かの刺激により再活性化され，体表に再発ヘルペス症を引き起こすことが知られている[1)~4)]．このようなHSV潜伏感染の解析のために，一般にマウス[5)~7)]，ウサギ[8)]などの実験モデルが使われている．例えば，マウスの角膜にHSV 1型（HSV-1）を接種すると，マウスは感染初期に急性症状を呈するが，急性期の症状が消退すると，外見的には正常になる．このようなマウスでは，潜伏状態のHSVが三叉神経節に存在する．これは，感染力のあるウイルスが検出できなくなった三叉神経節から，共生培養法[9)~11)]によりウイルスがin vitroで救済（rescue)させることによって証明されている．同様な手法で，ヒトの神経節[9)11)~13)]にもHSVが潜伏していることが明らかにされた．

神経節以外の組織におけるHSV-1の潜伏については未だ不明な点が多い．しかし，HSVがヘルペス脳炎を引き起こすこと，あるいはHSV感染と精神障害との関連性が疫学的研究[14)15)]から示唆されていることなどの理由により，中枢神経組織におけるHSV-1潜伏の有無が注目されてきた．Fraiserら[16)~18)]は，HSV-1

Abbreviations: dCTP, deoxycitidine 5'-triphosphate; dNTP, deoxynucleotide 5'-triphosphate; IR_L, internal repeat region of long segment; IR_S, internal repeat region of short segment; Kb, kilo basepairs; LS, long and short segments; OD, optical density; SBE, sugar

が潜伏したヒトやマウスの中枢神経組織におけるHSV-1ゲノムの存在を高感度の分子生物学的手法(Southern法[19])を用いて示した．しかし，中枢神経組織から潜伏HSVが感染粒子として検出された例はヒトではまったくなく，また潜伏感染マウスでもきわめて稀である[19]．

中枢神経組織にウイルスゲノムが存在するにも拘らず，共生培養法でHSV-1を救済できない理由の一つとして，存在するHSV-1ゲノムが不完全ゲノムであるため，感染性ウイルスが産生されない可能性が考えられる．これまでに，神経節や中枢神経組織に存在するHSV-1ゲノムの末端部に構造変化がおきていることは知られているが[16)18)21)~23)]，中枢神経組織に特異的なHSV-1ゲノムの変化は未だ報告されていない．そこで，著者は，HSV-1潜伏感染マウスを用いて，中枢神経組織に特異的なウイルスゲノムの構造変化があるかどうかを明らかにすることを目的として，本研究を実施した．また本研究では，潜伏感染成立後一部のマウスに，ヒトの再発ヘルペス症に類似の病変が認められたので，HSV-ゲノムの存在量と再発との関連性についても併せ検討した．

材料と方法

I．HSV-1潜伏感染マウスの作成

HSV-1潜伏感染マウス作成の概略を以下に示す．マウスは4週齢雄性BALB/c（船橋農場），ウイルスは研究室継代株であるHSV-1・HF株を用いた．マウスの両眼を擦過し1.5×10^6量のウイルスを接種した．初感染は検眼によって全ての接種マウスで確認された．HSV-1感染による急性全身症状は全例に観察されたが，それによる死亡は接種マウスの5％以下であった．ウイルスの潜伏は，HSV-1接種5週後の大脳皮質，脳幹，三叉神経節各組織磨砕液から，感染力のあるHSV-1ウイルスが検出されなかったこと，接種後8週の三叉神経節から共生培養法によりウイルスが救済されたことから証明された．なお，接種後10週を経過したころから，再発ヘルペス症と考えられる眼瞼や頭部の脱毛，潰瘍が約35％のマウスに認められた．この症状は出現後7～10日間観察され，治癒する例がほとんどであった．

II．ウイルスDNAプローブの作成

1．ウイルスDNAの調整

HSV-1・HF株を，感染多重度0.5プラック形成単位/mlでVero細胞（サル腎由来細胞）に感染させた．ウイルス特異的細胞変性が全面に出現した感染性細胞をラバーポリスマンではがし，低速遠心によって回収した．回収した細胞を凍結融解によって破壊した後，遠心（15,000 rpm, 4°C, 60分間：ローター5N, TOMY社）し，沈渣を緩衝液NTE［0.13 M NaCl＋0.05 M Tris（pH7.8）＋0.01 M EDTA］に再懸濁し，さらに音波処理しウイルス濃縮液を得た．濃縮液を，不連続蔗糖密度勾配（60－50－35－20－5％）に重層し，SW41Tiローター（Beckman社）を用いて超遠心（21,000 rpm, 60分間）を行った．50％と35％の界面にできた不透明バンドを回収し，緩衝液NTEで希釈し，再度超遠心（50,000 rpm, 60分間：ローターTY65, Beckman社）を行って，沈渣を緩衝液NTE 1 mlに再懸濁した．ウイルス懸濁液は，10 mM EDTA, 0.5％ Sodium dodecyl sulfate（SDS）およびProteinase K（最終濃度50 μg/ml）を加えて37°Cで1時間消化した．フェノール抽出1回，クロロフォルム抽出を1回行い，緩衝液E［2 mM Tris-HCl（pH 7.8）＋0.2 mM EDTA＋2 mM NaCl］に対して透析した．エタノールにより沈澱させたDNA沈渣は緩衝液Eに溶解し，精製HSV-1 DNAとした．

2．ウイルスDNA断片のクローニング

クローニングベクターのプラミドpAT153（Amersham社）を用いてクローニングした．精製HSV-1・DNAを制限酵素BamHI（東洋紡社）で消化した．pAT153 DNAをBamHIで消化し，バクテリア・アルカリ・フォスファターゼ（宝酒造社）で処理し，上記のHSV-1・DNA断片とT_4 DNAガーゼ（宝酒造社）で反応させて組み替えDNAを作製した．このDNAを用いて大腸菌HB101（宝酒造社）を形質転換した．形質転換コロニーからプラスミドを抽出し，制限酵素による解析を行った．酵素反応及び各処理の条件は各製剤の使用書に従った．

3．クローニング断片の検定

マウス細胞DNAは株化細胞L-929からGross-Bellard法[24)]を用いて抽出した．また，陽性対照としてこのDNAに細胞当りにHSV-1（HF）DNA 1コピー分加えたものを作り，この両者をBamHIで消化した．1コピー/細胞は，マウス細胞1個にHSV-1・DNAが平均1分子存在したときの量であり，HSV-1・DNAの分子量と2倍体哺乳動物細胞のDNA含量との比（およそ2.5×10^{-7}）から求めた．消化した

bromophenol blue electrophoresis buffer; SDS, sodium dodecyl sulfate; TR_L, terminal repeat region of long segment; TR_S, terminal repeat region of long segment; U_L, long unique region; U_S, short unique region.

DNA を1％水平アガロースゲル（135×134×5 mm）で電気泳動した．分離した DNA を Southern 法によってニトロセルロース膜に移した後，クローン化 DNA 断片をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った（方法の詳細は後に述べる）．

Ⅲ．ブロット・ハイブリダイゼーションによる HSV-1・DNA の検出

1．組織からの DNA 抽出

HSV-1 接種6カ月後にマウスを心臓穿刺によって屠殺したのち，大脳皮質，脳幹及び三叉神経節を切り出して−80°C にて凍結保存した．組織を細切し，緩衝液 A［0.5% SDS＋10 mM Tris-HCl（pH 7.8）＋10 mM EDTA＋10 mM NaCl］中で Proteinase K（50 μg/ml）により 37°C で一晩消化した．消化液を緩衝液 B［500 mM Tris-HCl（pH 7.8）＋10 mM EDTA＋10 mM NaCl＋0.5% SDS］で飽和したフェノールで2回，クロロホルム（Isoamyl Alcohol を 1/24 容加えたもの）で1回抽出した．最後に得られた水層を緩衝液 D［10 mM Tris-HCl（pH 7.8）＋10 mM NaCl＋0.5 M EDTA］に対して透析し，10 mM EDTA, RNase A（50 μg/ml）と RNase T1（50 u/ml）を加えて 37°C で2時間消化した．さらに，SDS（0.5%）と Proteinase K（50 μg/ml）を加えて 37°C で1時間消化したのち，フェノール抽出，クロロフォルム抽出を1回づつ行い，緩衝液 E［2 mM Tris-HCl（pH 7.8）＋2 mM NaCl＋0.2 M EDTA］に対して透析した．なお，外液の交換は4回行い，3日から4日間透析した．

上記の方法によって得た DNA の濃度は吸光度 OD_{258} を測定して求めた．

2．制限酵素消化，ゲル電気泳動，ブロッテイング

組織から抽出した検体 DNA（5 μg）を BamHI で消化した．陽性対照として L-929 DNA に細胞あたり1コピー，0.1コピー，0.01コピーの HSV-1 ゲノムを加えた検体を，また陰性対照として非感染マウスの各組織から抽出した DNA を同様に BamHI で消化した．消化した DNA をエタノールで沈澱し，SBE［8％蔗糖＋0.02% bromophenol blue＋0.04 M Tris-HCl（pH 7.8）＋0.04 M acetic acid＋0.001 M EDTA］50 μl に 68 度，10分で溶かし，1％垂直アガロースゲル（17.0×15.5×0.3 mm）にのせた．泳動は，緩衝液［0.04 M acetic acid＋0.04 M Tris-HCl（pH 7.8）＋0.001 M EDTA］内で室温で 14〜16 時間行い DNA 断片を分離した．なお DNA のサイズマーカーとして，ファージ λ の Hind III（東洋紡社）断片を検体と共に泳動した．泳動終了後 0.5 μg/ml エチディウムブロマイドで染色し，紫外線照射下で写真撮影した．次に，分離 DNA 断片を Southern 法によりアガロースゲル内からニトロセルロース膜に移した．セルロース膜は，3×SSC（1×SSC は 0.15 M NaCl＋0.015 M クエン酸ナトリウムをいう）で両面をこすり付着したゲルを除いたのち，ドライヤーで乾燥させ，真空デシケーターで1日以上保存した．

3．プローブのアイソトープ標識

プローブの標識は Multi Prime Labelling System（Amersham 社）法にしたがった．その方法の概略は次に述べる通りである．組換えプラスミドからウイルス DNA 断片を BamHI で切り出し，アガロースゲル電気泳動で分離精製した．精製 DNA 断片は熱変性させ，同断片を鋳型としてマルチ・プライマー，DNA ポリメラーゼ（Klenow 断片），［α-^{32}P］dCTP（800 Ci/mM, Amersham 社）及び他の3種の未標識の dNTP の存在下に DNA 合成を行った．標識した DNA はニック・カラム（Pharmacia 社）を用いて精製した．得られた DNA の比活性は 5〜10×10^8 cpm/μg DNA であった．

4．ハイブリダイゼーション[19)25)]

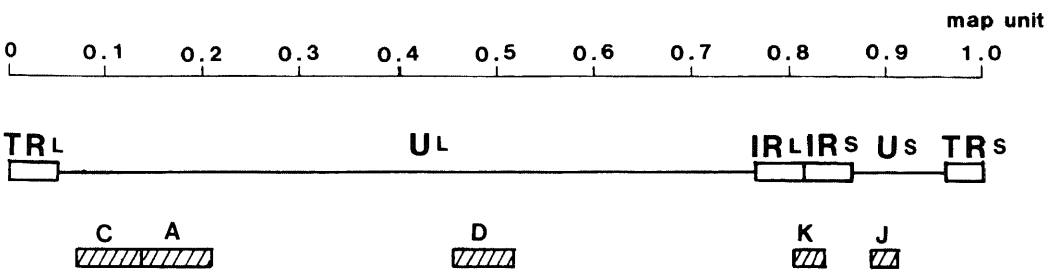

Fig. 1. Map location of HSV-1 BamHI fragments cloned in this study. Hatched rectangulars represent the cloned BamHI fragments located on the prototype HSV-1 genome. The middle part of this figure illustrates the genome structure of HSV-1 DNA. The U_L and U_S indicate a long unique region and a short unique region, respectively. The TR_L, TR_S, IR_L and IR_S indicate terminal repeat (TR) regions and internal repeat (IR) regions which connect the two unique regions. The top line shows map unit of HSV-1 genome (lmap unit is equivalent to 163Kb).

DNA を移したニトロセルロース膜を 80°C, 3 時間で処理し, 3 ×SSC に室温で 3 分, 3 ×SSC+0.2% Dehnhardt 試薬 (1 % Dehnhardt 試薬は牛血清アルブミン, フィコール, ポリビニルピロリドンを各 1 % 含む)+0.1% SDS に 68°C, 10 分浸した後, 熱変性仔牛胸腺 DNA (5 mg/ml) を含む 3 ×SSC+0.2% Dehnhardt 試薬+0.1% SDS で 68 度, 3 時間処理した. このニトロセルロース膜に ^{32}P 標識プローブを加え, 68°C で, 2 日間ハイブリダイゼーションを行った. 反応終了後, 3 ×SSC+0.2% Dehnhardt 試薬+0.1% SDS で 68°C, 15 分間 1 回, 2 ×SSC+0.1% SDS+0.1% NaPPi で 68°C, 15 分間 6 回, 3 ×SSC で室温, 10 分間 1 回の洗いを行い, 乾燥させた.

オートラジオグラフィーは, 富士フィルム社製 X 線フィルムを用い, 増感紙 (lighting plus, Dupont 社) の存在下で−50°C, 7 〜10 日間行った.

成 績

I. HSV-1・DNA プローブの作製

HSV-1 ゲノムには, 哺乳動物細胞 DNA と相同性を有する領域がいくつか存在することが知られているので[26)27)], 組織からの HSV-1 ゲノム検出にあたって, HSV-1 ゲノム全体をプローブとして用いることはできない. そこで, 本研究では, HSV-1 ゲノムの制限酵素切断断片を多数クローニングし, その中からマウス株化細胞 L-929 DNA と相同性のない断片を選択し, プローブとして用いることにした. すなわち, BamHI で HSV-1 (HF) DNA を切断した際に生じる約 35 個の断片のうち[28)], A, C, D, K_1, K_2 と J 断片をプラスミド pAT153 を用いてクローニングした. HSV-1 DNA は, 長い L 部分と短い S 部分からなり, L と S 部分の固有な塩基配列である unique long (U_L) 領域と unique short (U_S) 領域の両端に反復配列がある構造をとっている (図 1). U_L と U_S の末端部の terminal repeat region (TR_L と TR_S) と接合部の internal repeat region (IR_L と IR_S) は, それぞれ互いに倒置構造をとっている[29)~33)]. クローニングした A, C と D 断片は U_L 領域に, J 断片は U_S 領域に位置している. K_1 と K_2 断片は LS 接合部にあり, IR_S と IR_L の領域内に位置している. 図 1 に各断片のゲノム上の位置を示す. 各断片を含む組み換え DNA を BamHI で消化, 切断し, 電気泳動した結果は図 2 に示した通りである. なお, A 断片を含む組換え DNA には小さい断片 (1.8Kb) が共にクローン化されたが, この小断片の由来については詳しく調べなかった. ここには成績を示していないが, 各断片の同定は, 遺伝子地図が判明している HSV-1・F 株[28)]の BamHI 消化断片と HF 株消化断片との電気泳動パターンを比較して行った.

次にクローン化 BamHI 断片の中から, 文献上[26)27)] 細胞 DNA と相同性が証明されていない A, C と D 断片と, 細胞 DNA と高い相同性を示す K_1 断片を選び, これらの断片とマウス細胞 L-929 DNA との相同性を検討した. L-929 DNA 及び DNA に 1 コピー/細胞に相当する HSV-1 ゲノムを混合したものを BamHI で消化し, 1 %アガロースゲルで電気泳動した. 分離した DNA を Southern 法でニトロセルロース膜へ移し

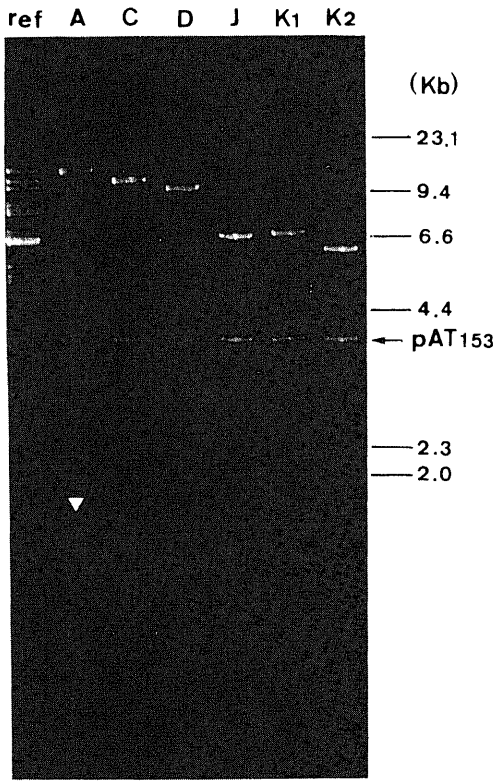

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of cloned BamHI fragments. The recombinat DNAs, containing fragment A, C, D, J. K_1 and K_2 were digested with BamHI and electrophoresed on a 0.8% agarose gel. Purified HSV-1 (HF) DNA was digested with BamHI and electrophoresed in parallel as a reference. The gel was stained with ethidium bromide and visualized with ultraviolet illumination. Position of various Hind III fragments of pharge lamda DNA, running in parallel as size markers, are given on the right side of the photograph. The arrow indicates the linearized pAT153, separated in the gel. The white arrowhead indicates an extra DNA fragment that was cloned together with the A fragment.

たのち，^{32}P で標識した各断片をプローブに用いて，方法で述べた条件下でハイブリダイゼーションを行った(図3)．A と C 断片は，細胞あたり1コピー分の HSV ゲノムの各断片が強く検出される条件下で，細胞 DNA と全く反応しなかった．しかし，D と K_1 断片は細胞 DNA と強く反応し，陽性バンドはスメア状に検出された．

以上の結果から，BamHI-A, C 断片がハイブリダイゼーションのプローブとして適していることが明らかになった．しかし，A を含む組換え DNA クローンには上述した余分な断片が含まれていたので，以下の実験では，C 断片をプローブとして用いた．

II．中枢神経組織と三叉神経節からの HSV-1 ゲノムの検出

HSV-1 潜伏感染したマウスの中枢神経組織からの HSV-1 ゲノムの検出には，HSV-1 を接種しなかった正常マウス1匹，HSV-1 の潜伏後に HSV-1 の再発ヘルペス症が認められたマウス6匹（再発群），認められなかったマウス6匹（非再発群）の各々から取り出した大脳皮質と脳幹を用いた．中枢神経系と三叉神経節のゲノム構造を比較するため，三叉神経節からも正常マウスと再発群のマウス5匹を用いて HSV-1 ゲノム検出を行った．これらの組織から抽出した DNA について，上述の BamHI-C 断片をプローブに用いたハイブリダイゼーションを行った．大脳皮質についてのオートラジオグラムを図4に，脳幹，三叉神経節のそれを図5，6に示した．

大脳皮質では，再発群の6検体（レーン4～9）全

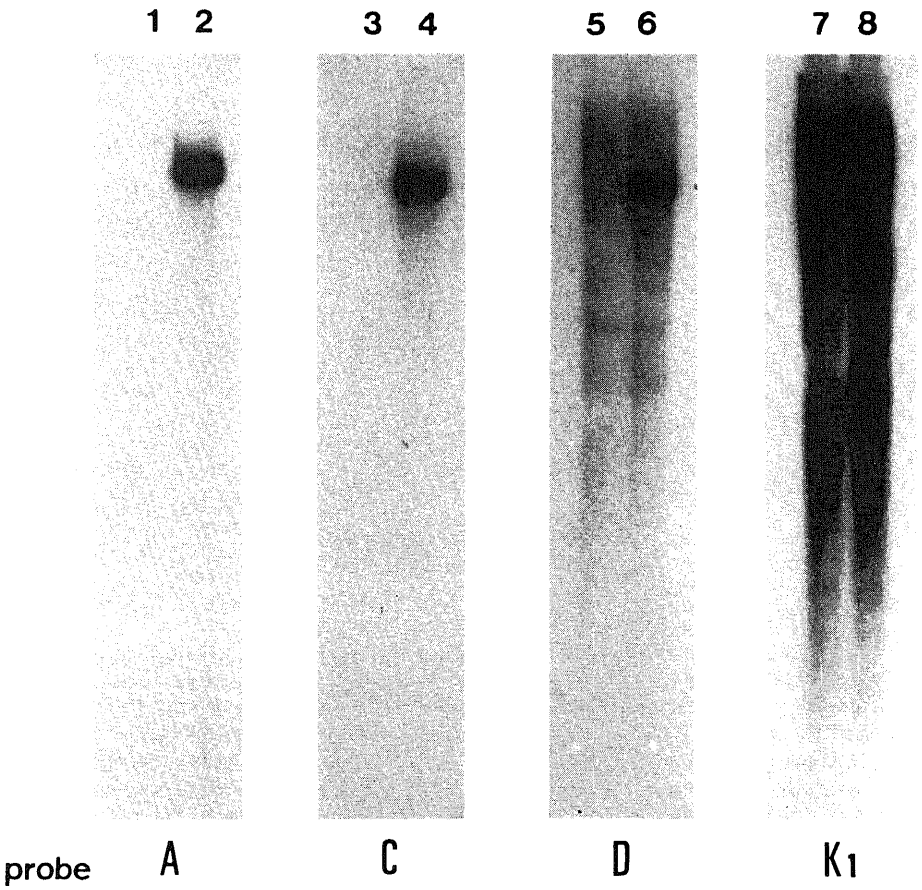

Fig. 3. Blot hybridization of cloned HSV-1 BamHI fragments to mouse cell DNA. Mouse cell (L-929) DNA (10 μg) (lanes 1, 3, 5 and 7) and HSV-1 DNA (250 pg) plus the cell DNA (10 μg) (lanes 2, 4, 6 and 8) were digested with BamHI. The digests were electrophoresed in a 1% agarose gel and transferred to a nitrocellulose filter. The filter was hybridized to ^{32}P-labeled BamHI A, C, D, or K_1 fragment.

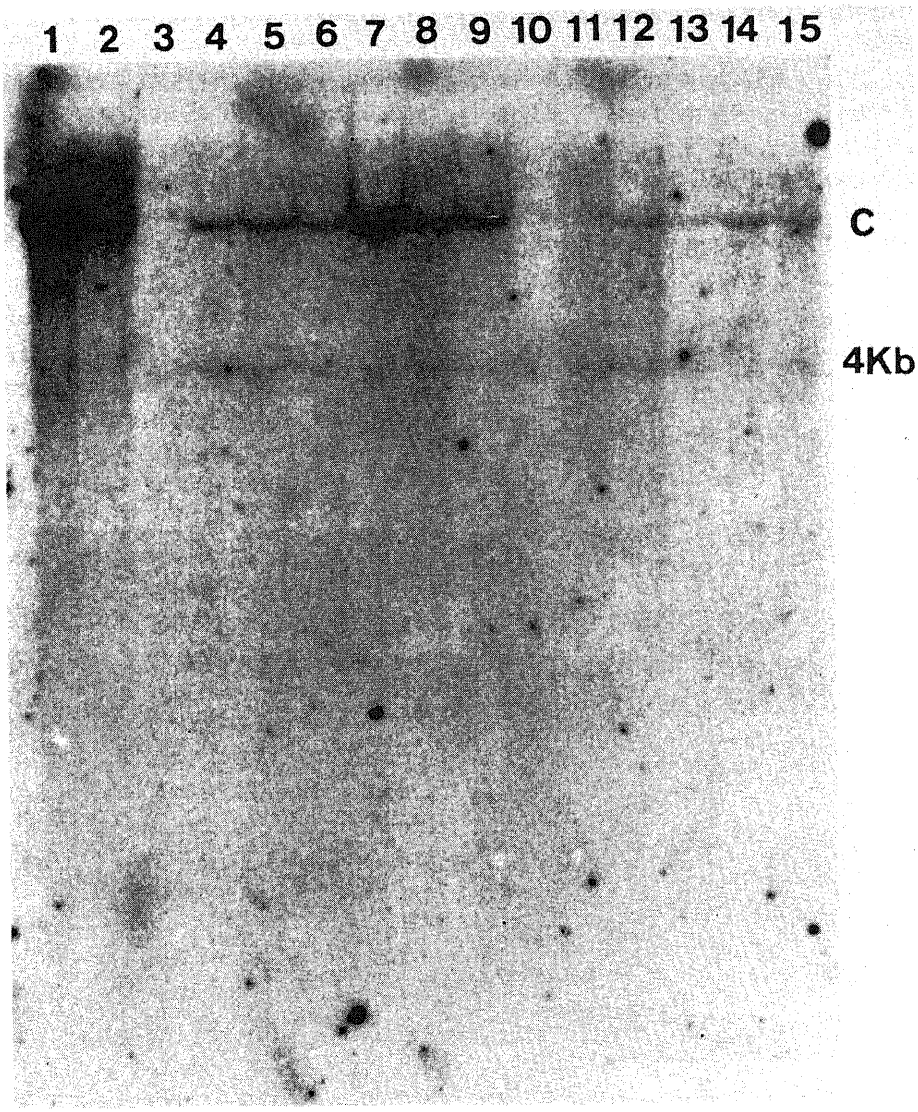

Fig. 4. Detection of the HSV-1 DNA sequences from cerebral cortices of latently infected mice. Sample DNAs were individually extracted from cerebral cortices of the mice with dermal recurrent lesions (lanes 4, 5, 6, 7, 8 and 9), the mice without such lesions (lanes 10, 11, 12, 13, 14 and 15) and noninfected mouse (lane 3). Reconstructed DNAs, containing mouse cell DNA (5 μg) and HSV-1 DNA (12.5 pg and 1.25 pg), correspond to 0.1 and 0.01 copy per cell respectively (lanes 1 and 2). Each of the sample DNAs (5 μg) and the reconstructed DNA was digested with restriction enzyme BamHI, electroporesed on a 1% agarose gel, trasferred to a nitrocellulose filter and hybridized to ^{32}P-labeled BbmHI-C fragment. The C on the right side of the photograph indicates the detected BamHI-C fragment in those DNAs. The 4Kb denotes the size of the another detected DNA fragment from latently infected mice. (The size of this fragment is estimated in comparison with those of various Hind III digests of pharge lamda DNA that were electrophoresed in parallel.).

てから，また非再発群では6検体中5検体（レーン11～15）から各2本のバンドが出現した．上方のバンドはC断片（レーン1と2）と一致した．一方，下方のバンドはC断片（9.6Kb）より著しく小さく，λ DNA の Hind III断片をサイズマーカーとして検討したところ，その長さは約4Kbであった．

ウイルスゲノム0.01コピー/細胞に相当するC断片の濃度（図4，レーン2）を指標として，大脳皮質におけるウイルスゲノムの存在量を求めると，およそ0.001～0.005コピー/細胞であった．また，再発群と非再発群の間でC断片の存在量に差違が認められた．すなわち，非再発群より再発群のマウス大脳皮質でC断片検出量が多かった．しかし，4Kb断片に関しては，再発群と非再発群の間に検出量の違いは認められなかった．

脳幹でも再発群の6検体中5検体から，非再発群の6検体中4検体からC断片と4Kbに一致する位置に2本のバンドが出現した（図5）．しかし，ゲノムの存在量は大脳皮質よりも低かった．そのため，コピー数の推定，再発群と非再発群間の検出量の比較はできな

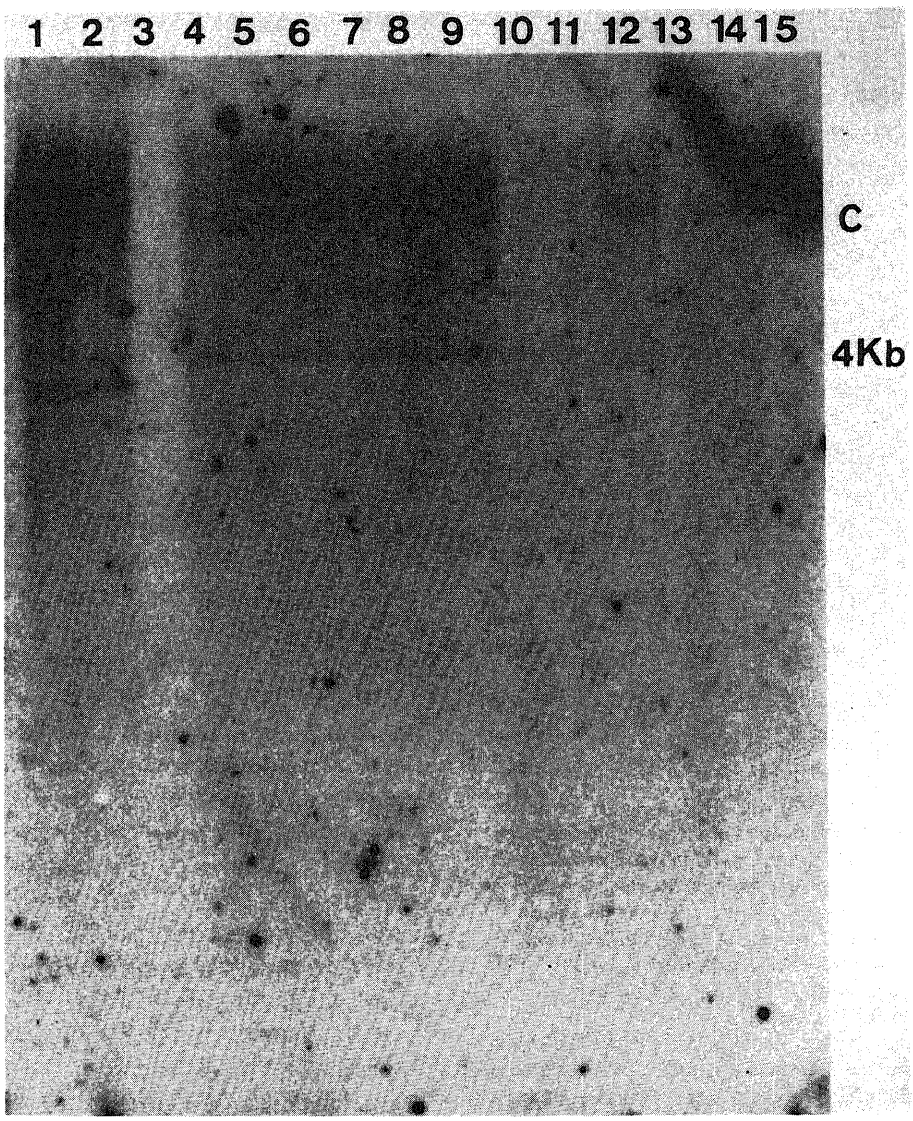

Fig. 5. Detection of the HSV-1 DNA sequence from brain stems of latently infected mice. Details are the same as shown in the legend of Fig. 4 except the brain stems were used.

かった.

三叉神経節については，再発群の5検体全てからC断片の位置に陽性バンドが出現した（図6）．しかし，大脳皮質，脳幹で出現した4Kb-断片は全例で認められなかった．三叉神経節でのウイルスゲノムの存在量は，大脳皮質や脳幹よりも多く，0.01〜0.05コピー/細胞であった．

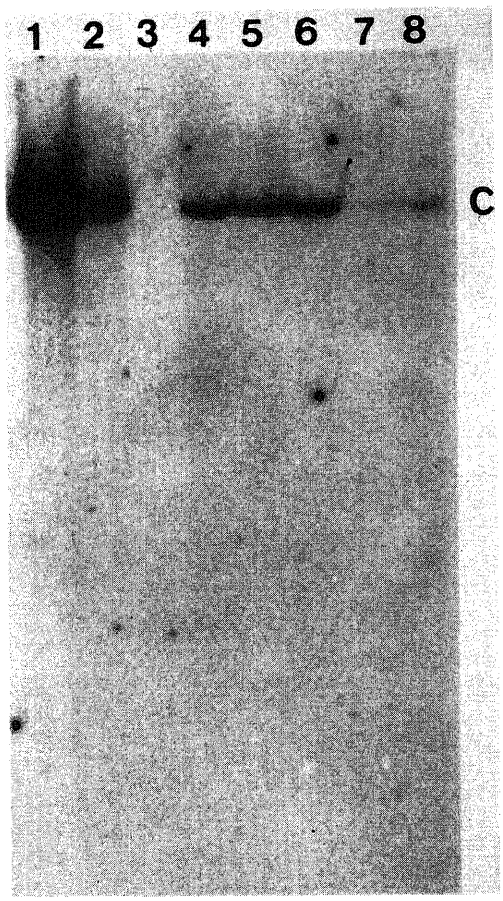

Fig. 6. Detection of the HSV-1 DNA sequence from trigeminal ganglia of latently infected mice. Sample DNAs were individually extracted from bilateral trigeminal ganglia of the mice, which had shown dermal recurrent lesions (lanes 4, 5, 6, 7 and 8) and of noninfected mouse (lane 3). Reconstructed DNAs, containing mouse cell DNA (5 μg) and HSV DNA (125 pg and 12.5 pg), correspond to 1 and 0.1 copy per cell (lanes 1 and 2), respectivaly. Each of the sample DNAs (5 μg) and the reconstructed DNAs were digested with BamHI, electrophoresed on a 1% agarose gel, trasferred to a nitrocellulose filter and hybridized to ^{32}P-labeled HSV BamHI-C fragment. The C on the right side of the photograph indicates the detected C fragment in those DNAs.

考　　察

本研究の目的は，HSV-1潜伏感染マウスの中枢神経系組織に存在するウイルスゲノムの構造変化の有無を検討することであった．現在まで，HSV-1 DNA断片をプローブに用いたハイブリダイゼーションによって，潜伏感染マウスの中枢神経系から，HSV-1 DNAの末端部を除いたほぼ全塩基配列にあたる断片が，本来のゲノムサイズに一致して検出されたと報告されている[17)18)]．しかし，以下の理由で，これらの検出結果の解釈には疑問がある．まず，プローブに用いられたDNA断片は，細胞DNAとの相同性について検討されていないため，検出された断片がすべてウイルス由来の断片であるか不明である．また，複数の異なるゲノム領域の断片をプローブに用いているため構造上変化した断片が他の断片と重なれば，その変化の検出は困難になる．そこで，本研究では，既に述べた通り，細胞DNAと相同性を持たないHSV-1 DNA断片として，BamHI-C断片をプローブに選択した．この断片を単独でプローブに用いることによって，組織に存在するHSV-1ゲノムを特異的に検出し，C断片領域の構造変化の有無を検討することが可能であった．

近年，末端接合部を含む断片をプローブとして用いると，接合部の断片は検出されるが，末端部の断片は検出されないことが報告されている[17)〜19)]．このことから，潜伏感染におけるHSV-1ゲノムは本来の単位長の直鎖状2本鎖DNAとは異なり，例えば，DNA分子がつながった状態（concatemer），環状状態（episomal state），細胞DNAに組み込まれている状態（integrated state）などで存在していることが考えられている[17)〜23)]．本研究では，大脳皮質と脳幹からBamHI-C断片以外にC断片より著しく小さな断片（4Kb）を検出した．C断片が細胞DNAやC断片以外のHSV-1・BamHI断片と相同性を持たないことが確かめられているので，4Kb断片は構成成分としてC断片由来の塩基配列を持つことは明らかである．この4Kb断片は，ゲノム上のC断片領域に約5Kbの欠失が起きたために生じたと考えられる．すなわち，中枢神経系に存在するHSV-1ゲノムの一部は，末端部分以外にも，C断片領域の構造変化をきたしていることが示唆された．

中枢神経系に特異的なHSV-1ゲノムの構造変化については，従来から注目されていた[16)20)]．今回のC断片領域の構造変化は，三叉神経節では認められないことから（図6），大脳皮質と脳幹に特異的な知見であると考えられる．本研究ではウイルスゲノム全体の6%にあたるBamHI-C領域の構造変化を，ほとんどの個

体で認めた．このことから，他のゲノム領域でも同様な構造変化が起きている可能性がある．この推論が正しいとするならば，中枢神経系に存在するHSV-1ゲノムの大部分が，構造上どこかの領域に変化を受けた不完全ゲノムとして存在することになる．中枢神経系におけるHSV-1ゲノムの構造変化は，HSV-1潜伏感染マウスの三叉神経節からは高率にウイルスが救済されるのに対して，中枢神経系からは稀にしか救済されないことの理由の一つになりうる．また，中枢神経系におけるHSV-1ゲノム構造の変化がHSV-1ゲノムの不活化をもたらすならば，中枢神経系においては，HSV-1ゲノムの修飾をHSV感染に対する防御機構の一つとみなすことも出来よう．

神経節に潜伏したウイルスが再び感染力を有して，神経節の支取領域である体表部に再発ヘルペス症を引き起こす現象は，ヒトのみでなく，マウスを用いたHSV-1潜伏感染の系でも認められている[34)~36)]．一方，中枢神経系での再発現象については，潜伏感染の成立したマウスに免疫抑制剤を投与すると，再活性化HSV-1が中枢神経系に出現し[87)]，ときに，HSV-1脳炎が誘発されること[38)]が報告されている．これらの実験で用いられた免疫抑制剤の投与は，体表部での再発ヘルペス症も引き起こすことが知られている[3)]．今回，HSV-1ゲノムC断片の大脳皮質での検出量が，非再発群より再発群で明らかに高かった．この結果に対して以下の解釈ができる．一つは，さきに示した仮説に基づくもので，中枢神経系に存在するのは大部分が不完全ゲノムであり，再発マウスでのC断片の増量は，単に不完全ゲノムが増加したことを示しているという解釈である．もう一つは，先の仮説と異なり，再発マウスの中枢神経系でウイルスの増殖が起き，そのためにゲノムの蓄積が起きたという解釈である．後者の考えによれば，再発を繰り返すことによって中枢神経系のゲノム量が徐々に増大してゆき，それがある量まで蓄積した場合，そこに宿主側の防御能の低下が重なったとき脳炎という症状が発現してくる，という仮説をたてることが出来る．この仮説を証明するために，今後，実験的に再発を繰り返したマウスの中枢神経系でゲノムが着実に増加し，それがゲノムのみの増加でなくウイルスの増殖も引き起こしているかどうかを明らかにしていきたい．

結　　論

HSV-1・HF株潜伏感染BALA/cマウスの大脳皮質，脳幹及び三叉神経節からウイルスゲノムをSouthern法により検出し，中枢神経系でのゲノムの構造変化の有無と，再発ヘルペス症とゲノム存在量との関連性を検出した．検出はSouthern法によって，細胞と相同性のないBamHI-C断片をプローブに用いた．実験結果は次のように要約される．

1．実験動物のほとんどの個体で大脳皮質，脳幹から本来のC断片（9.6Kb）の他に，C断片が著しく小さくなった断片も検出されたことから，中枢神経系に存在する一部のHSV-1ゲノムには，特異的なU_L領域の構造変化が生じていることが推定された．

2．再発マウスの大脳皮質で，非再発群に比べC断片の検出量が多かったことから，体表部での再発ヘルペス発症マウスは，中枢神経系においてHSV-1ゲノム量が増加することが明らかになった．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲をいただきました恩師岡田晃教授に深甚なる謝意を表します．また，直接の御指導をいただきました東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部，余郷嘉明博士に深謝致します．さらに，ウイルス，細胞の提供などを含め，数々の御協力，御指導をいただきました横浜市立大学医学部公衆衛生学教室の鳥羽和憲助教授に謝意を表するとともに，終始暖かい御指導，御助言を賜わりました東京都精神医学総合研究所の諸治隆嗣博士，内田清二郎博士（東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部元教授）ならびに，奥山哲雄博士に心よりの御礼を申し上げます．

文　　献

1) **Nahmias, A. J., Dannenbarger, J., Wickliffe, C. & Muther, J.**: Clinical aspects of infection with herpes simplex viruses 1 and 2. *In* A. J. Nahmias, W. R. Dowdle & R. F. Schinazi (eds.), The Human Herpes Virus, p3-9, Elsvier, New York, 1981.

2) **Baringer, J. R.**: Latency of herpes simplex and varicellazoster viruses in the nervous system. *In* A. J. Nahmias, W. R. Dowdle & R. F. Schinazi (eds.), The Human Herpes Virus, p202-205, Elsvier, New York, 1981.

3) **Klein, R. J.**: The pathogenesis of acute, latent and recurrent herpes simplex virus infections. Arch. Virol., **72**, 143-168 (1982).

4) **White, D. O. & Fenner, F. J.**: Medical Virology, 3rd ed., p401-431, Academic Press Inc., London, 1986.

5) **Stevens, J. G. & Cook, M. L.**: Latent herpes simplex virus in spinal ganglia in mice. Science, **173**, 843-845 (1971).

6) **Cook, M. L., Bastone, V. B. & Steevens, J. G.**: Evidence that neurons harbour latent herpes

simplex virus. Infect. Immun., **9**, 946-951 (1974).

7) **Price, R. W., Katz, B. J. & Notkins, A. L.**: Latent infection of peripheral ANS with herpes simplex virus. Nature, **257**, 686-688 (1975).

8) **Nesburn, A. B., Dunkel, E. C. & Trousdale, M. D.**: Enhanced HSV recovery from neuronal tissues of latently infected rabbit. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **163**, 398-401 (1980).

9) **Baringer, J. R. & Swoveland, P.**: Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. N. Engl. J. Med., **288**, 648-650 (1973).

10) **Scriba, M.**: Herpes simplex virus infection in Guinea pigs: an animal model for studying latent and recurrent herpes simplex virus infection. Infect. Immun., **12**, 162-165 (1975).

11) **Lewis, M. E., Warren, K. G. & Jeffrey, V. M.**: Factors affecting recovery of latent herpes simplex virus from human trigeminal ganglia. Can. J. Microbiol., **28**, 123-129 (1982).

12) **Baringer, J. R.**: Recovery of herpes simplex virus from human sacral ganglions. N. Engl. J. Med., **291**, 828-830 (1974).

13) **Warren, K. G., Brown, S. M., Wroblewska, Z., Gilden, D., Koprowski, H. & Subak-Sharpe, J.**: Isolation of latent herpes simplex virus from the superior cervical and vagus ganglions of human beings. N. Engl. J. Med., **298**, 1068-1069 (1978).

14) **Libikova, H.**: Principles of etiologic studies. *In* P. V. Morozov (ed.), Advances in Biological Psychiatry, Vol. 12, Reserch on the Viral Hypothesis of Mental Disorders, p20-51, S. Karger, Basel, 1983.

15) **Rajcani, J., Libikova, H., Smerekova, J., Mucha, V., Kudelova, M., Pogady, J., Breier, S. & Skodacek, I.**: Investigations on the possible role of viruses affecting the CNS in the etiology of schizophrenia and related mental disorders. *In* E. Kurstak, Z. J. Lipowski & P. V.Morozov (eds.), Virus, Immunity, and Mental Disorders, p135-148, Plenum Press, New York, 1987.

16) **Fraiser, N. W., Lawrence, W. C., Wroblewska, Z., Gilden, D. H. & Koprowski, H.**: Herpes simplex type 1 DNA in human brain tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **78**, 6461-6465 (1981).

17) **Rock, D. L. & Fraser, N. W.**: Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. Nature, **302**, 523-525 (1983).

18) **Efstathiou, S., Minson, A. C., Field, H. J., Anderson, J. R.& Wildy, P.**: Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans. J. Virol., **57**, 446-455 (1986).

19) **Southern, E. M.**: Detection of specfic sequences among DNA fragments separated by gel electrophorisis. J. Mol. Biol., **98**, 503-517 (1975).

20) **Cabrera, C. V., Wohlenberg, C., Openshaw, H., Rey-Mendez, M., Puga, A. & Notkins, A. L.**: Herpes simplex virus DNA sequences in the CNS of latently infected mice. Nature, **288**, 288-290 (1980).

21) **Minson, A. C.**: The state of herpes genome. Nature, **302**, 477 (1983).

22) **Puga, A., Cantin, E. M., Wohlenberg, C., Openshaw, H. & Notkins, A. L.**: Different sizes of restriction endonuclease fragments from the terminal repetitions of the herpes simplex virus type 1 genome latent in trigeminal ganglia of mice. J. Gen. Virol., **65**, 437-444 (1984).

23) **Mellerick, D. M. & Fraiser, N. W.**: Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: Evidence suggesting an episomal state. Virology, **158**, 265-275 (1987).

24) **Gross-Bellard, M., Oudet, P. & Chambon, P.**: Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. Eur. J. Biochem., **36**, 32-38 (1973).

25) **Yogo, Y., Furuno, A., Nozawa, A. & Uchida, S.**: Organization of viral genome in a T antigen-negative hamster tumor induced by human papovavirus BK. J. Virol., **38**, 556-563 (1981).

26) **Peden, K., Mounts, P. & Hayward, G. S.**: Homology between mammalian cell DNA sequences and human herpesvirus genomes detected by a hybridization procedure with high-complexity probe. Cell, **31**, 71-80 (1982).

27) **Puga, A., Cantin, E. M. & Notkins, A. L.**: Homology between murine and human cellular DNA sequences and the terminal repetition of the S component of herpes simplex virus type 1 DNA. Cell, **31**, 81-87 (1982).

28) **Locker, H. & Frankel, N.**: BamI, KpnI, and SalI restriction enzyme maps of the DNAs of herpes simplex virus strains Justin and F: Occurrence of heterogeneities in defined regions of the viral DNA. J. Virol., **32**, 429-441 (1979).

29) **Hayward, G. S., Jacob, R. J., Wadsworth, S.**

C. & **Roizman, B.**: Anatomy of herpes simplex virus DNA: Evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **72**, 4243-4247 (1975).

30) **Wilkie, N. M. & Cortini, R.**: Sequence arrangment in herpes simplex virus type 1 DNA: Identification of terminal fragments in restriction endnuclease digests and evidence for inversions in redundant and unique sequences. J. Virol., **20**, 211-221 (1976).

31) **Jacob, R. J., Morse, L. S. & Roizman, B.**: Anatomy of herpes simplex virus DNA. J. Virol., **29**, 448-457 (1979).

32) **Davison, A. J. & Wilkie, N. M.**: Nucleotide sequences of the joint between the L and S segments of herpes simplex virus types 1 and 2. J. Gen. Virol., **55**, 315-331 (1981).

33) **McGeoch, D. J., Dolan, A., Donald, S. & Rixon, F. J.**: Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. J. Mol. Biol., **181**, 1-13 (1985).

34) **Walz, M., Price, R. W. & Notkins, A. L.**: Latent ganglionic infection with herpes simplex virus types 1 and 2: Viral reactivation in vivo after neurectomy. Science, **184**, 1185-1187 (1974).

35) **Hill, T. J., Blyth, W. A. & Harbour, D. A.**: Trauma to the skin causes recurrence of herpes simplex in the mouse. J. Gen. Virol., **39**, 21-28 (1978).

36) **Openshaw, H. Asher, L. V. S., Wohlenberg, C., Sekizawa, T. & Notkins, A. L.**: Acute and latent infection of sensory ganglia with herpes simplex virus: Immune control and virus reactivation. J. Gen. Virol., **44**, 205-215 (1979).

37) **Kastrukoff, L., Long, C., Doherty, P. C., Wroblewska, Z. & Koprowski, H.**: Isolation of virus from brain after immunosuppression of mice with latent herpes simplex. Nature, **291**, 432-433 (1981).

38) **Sekizawa, T. & Openshaw, H.**: Encephalitis resulting from reactivation of latent herpes simplex virus in mice. J. Virol., **50**, 263-266 (1984).

Studies on the Structural Modification of Herpes Simplex Virus type 1 Genome in the Central Nervous System of Latently Infected Mice

Hirotsugu Kikumoto, Department of Public Health, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med. Soc., **97**, 449—460 (1988)

Key words: Herpes simplex virus type 1, Latently infected mice, Central nervous system, Southern blot hybridization, Structural modification

Abstract

The presence of structurally modified herpes simplex virus type 1 (HSV-1) genomes was examined in the central nervous system (CNS) of latently infected mice. The amount of the HSV-1 genome in CNS was also compared between mice with and without recurrent dermal lesions. HSV infection was carried out by corneal inoculation with the HF strain. The establishment of latent infection in the trigeminal ganglia of those mice was proved by the rescue of active virus in the co-cultivation of the minced tissues with virus sensitive cells. DNAs were extracted from individual mice tissues and digested with the restriction enzyme BamHI. The digests were electrophoresed on an agarose gel, transferred to a nitrocellulose filter according to Southern method and hybridized to ^{32}P-labeled cloned BamHI-C fragment, which is located on the U_L region of the HSV-1 genome. The BamHI-C fragment was confirmed not to hybridize to mouse cell DNA. The results are as follows. The viral BamHI-C fragment and its shortened fragment (4Kb fragment) were detected from the cerebral cortices and brain stems of almost all the latently

infected mice. In contrast, this shortened fragment was not detected from the trigeminal ganglia. The amount of detected BamHI-C fragment was higher in the cerebral cortices of the mice with dermal HSV recurrence than those without recurrence. The detection of the shortened fragment suggests that some of the HSV-1 DNAs in CNS of latently infected mice are subjected to a structural modification on the U_L region of the genome. The increase in amount of BamHI-C fragment shows a possibility that the HSV-1 genome in CNS accumulates with the viral replication on HSV recurrence.