

ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV6) の検出とその DNA 多型

中村 貴子

筑波大学医学系技術室

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

Human Herpes Virus-6 (HHV-6) は、小児突発性発疹の原因ウイルスであり初感染後、主にマクロファージ系細胞や脳内グリア細胞、唾液腺細胞に潜伏感染する。今回、解剖体血液や生体唾液から得られた全ゲノム DNA からウイルス特有の DNA を Real Time PCR 法で増幅し、その再活性化が薬物やアルコールの長期摂取さらに疲労との関連の検討を行った。また、HHV-6 ゲノムの両端に位置する DR 領域に 6 塩基の Telomeric Repeats Sequence (TRS) が存在し、そのリピート数に個体差があることがわかった。

キーワード： Human Herpes Virus-6、唾液、Real Time PCR 法、Telomeric Repeats Sequence

1. はじめに

Human Herpes Virus-6 (以後 HHV-6) は 1986 年、悪性リンパ腫患者のリンパ球より分離され^[1] 1988 年に山西らにより小児突発性発疹の原因ウイルスであることが明らかとなった^[2]。HHV-6 は初感染後、主にマクロファージ系細胞や脳内グリア細胞、唾液腺細胞に潜伏感染し^[3]、骨髄移植患者や免疫不全疾患患者の脳において再活性化し、熱性痙攣や脳炎を引き起こす。最近の研究により慢性疲労症候群 (CFS) や薬剤過敏性症候群 (DIHS) の重篤化した患者において HHV-6 の再活性化が高頻度で観察される^{[4][5]} など、HHV-6 と疾患とのかかわりが解明されつつある^{[6][7]}。

我々は、血液などの解剖サンプルから得られた全ゲノム DNA からウイルス特有の DNA を Real Time PCR 法にて検出することにより再活性化とその背景を考えた。また、HHV-6 ゲノムの両端に位置する DR 領域に TAACCC の 6 塩基繰り返し配列 (Telomeric Repeats Sequence : TRS) が存在することを確認し、そのリピート数に個体差があることを見出した。

今回は、筑波大学麻酔蘇生学の協力により麻酔科医師および手術前の一般患者から唾液の提供を得て、それらから DNA を抽出して HHV-6 ゲノムが一定条件下で唾液中に出現するか否かについて検討した。また、唾液サンプルからの TRS 配列にも解剖体血液サンプルと同様、そのリピート数に個体差の有無について検討した (本研究は筑波大学医の倫理委員会において承認済みである)。

2. 方法

2.1 DNA 抽出

解剖体血液から DNA を QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN 社) で抽出、唾液は ORAgene・DNA 採取キット (ORAgene 社) を用いマニュアルに沿って DNA を抽出し、実験に使用した。

2.2 Real Time PCR

図 1 に示した配列の Primer および Probe と TaqMan^R Fast Universal PCR Master mix を用い、7500 Fast Real-Time PCR system (ABI) により real-time PCR を行った。ウイルス数の指標となるプラスミドは、東京慈恵会医科大学微生物学講座第一 近藤一博教授よりご提供いただいたものを用いた。

Forward primer

5'-GAC AAT CAC ATG CCT GGA TAA TG-3'

Reverse primer

5'-TGT AAG CGT GTG GTA ATG GAC TAA -3'

TaqMan Probe

FAM-AGC AGC TGG CGA AAA GTG CTG TGC-BHQ-1

図 1. Primer & Probe 配列

TaqMan^R Fast Universal PCR Master mix を使用し、60cycle で RT-PCR 処理。

2.3 DR 領域増幅と TRS

ウイルスの存在が確かめられた検体は、Primer を用いて annealing 58 °C、60cycle PCR 処理を行い、DR 領域を PCR 増幅した。PCR 産物は、アガロースゲル切り出し法を用いて ABI 3130 Sequencer により Sequence 解析を行い、TRS のリピート数を算定した。また、それぞれの Primer の異なる組み合わせを用い検証した。

3. 結果

3.1 HHV-6 検出検体から既往症等の検討

解剖体血液からの DNA136 検体のうち real-time PCR で DNA の増幅が確認された 51 検体を Positive 群、増幅が確認されなかった 85 検体を Negative 群とした (図 2)。

各群について年齢および性別などを比較した結果、2 群の間に有意差はなかった。

両方から症例をあげた結果、Negative 群の死因

として交通事故や焼死などの事故死が目立つ傾向で、既往症では「特になし」が多く見られた。Positive群の解剖所見や今までの病歴からは、肝炎や腎炎、高血圧、動脈硬化などの病的症状が多くみられたが、特に注意を引いたのが、アルコール性疾患と薬物性疾患であった。そのため Nega. Posi. 両群の既往症などをアルコールと薬物をキーワードとして選出し、比較した結果、図 3 のように有意差があり、HHV-6 を検出した群においてアルコール大量摂取(依存症レベル)や薬物中毒がHHV-6 の再活性化に関わっていることが示唆された。

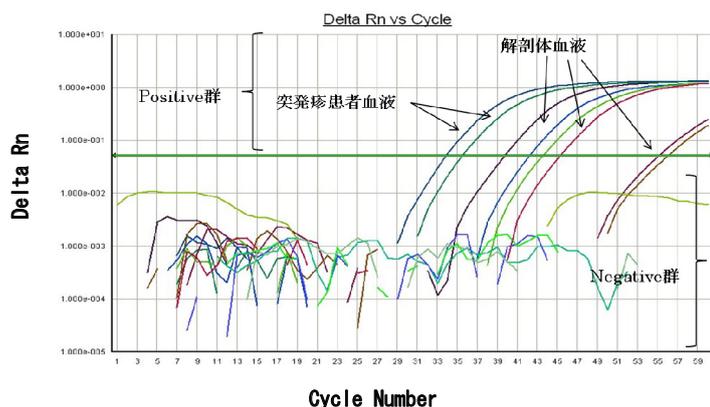


図 2. Real Time PCR、HHV-6DNA 検出チャート (定性的検出)
真ん中のライン(Threshold Line)を超えて増幅されるのが Positive 群、増幅せずラインを超えないのが Negative群。

3.2 唾液からの Real-Time PCR 検出

麻酔科医師 11 名と手術前で安静を保っている患者 37 名から採取された唾液からの DNA による Real Time PCR の結果、医師のうち 10 名 (91%)、患者では 8 名 (22%) からHHV-6 が検出された(図 4)。麻酔科医師には最も疲労を感じる時を 100 として採取時の疲労度を自己採点してもらい、real-time PCR の結果からウイルスゲノム数の定量を求め比較検討した(図 5)。

医師が疲労を感じている時のウイルスゲノム数は、疲労をあまり感じていない時よりも増加している傾向が見られた。自己評価で強く疲労を感じる時には、相関してウイルス排出量が上昇する傾向であった。しかし、我々の今回の方法では、ウイルスの絶対量は正しいとは言えない。唾液を採取する段階で多少の誤差があることなどが理由である。そのため今回の段階では、ほぼ同様の基準

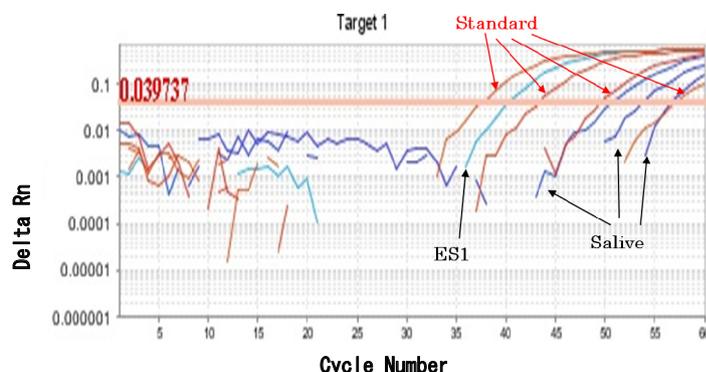


図 4. Real Time PCR、HHV-6DNA 検出チャート (定量的検出)。
生体の唾液からウイルス DNA が検出され、再活性化が確認された。プラスミドを Standard に設定しウイルス数を算定した。

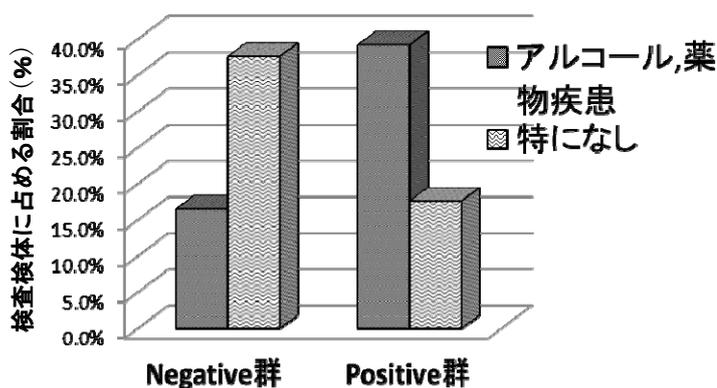


図 3. Real Time PCR 処理による HHV-6DNA 検出後の既往症比較
既往症、解剖所見からアルコール性肝機能障害、薬物依存(覚せい剤、睡眠剤)、アルコール性肺炎、アルコール依存症、アルコール性肝炎、大麻中毒、等をキーワードにして選出した。既往症状や解剖による内臓疾患がない検体は、特になしとした。有意差検定を行った結果、両群の間に 1% 以下の有意差が認められ、アルコール大量摂取(依存症レベル)や薬物中毒が HHV-6 の再活性化に関わっていることが示唆された。

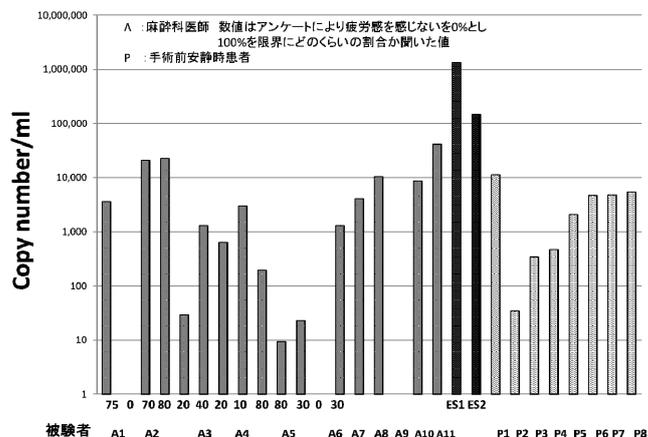


図 5. ウイルス出現数と疲労度のアンケートの調査結果
被験者 A1、数字(75:当直明け 0:休日後)同一人でも疲労度によってウイルスの出現数が異なり麻酔科医師の当直明けで HHV-6 の出現数が高かった。麻酔科医師 11 名中 10 名 (91%) から HHV-6 が検出された。手術前安静患者では 37 人中 8 名 (22%) であった。

で採取された DNA 液中に含まれるウイルス量の比較(相対値)になる。参考とした小児突発疹患者の血液サンプルからは 100 万個/ml を超えるウイルスが検出されたが、麻酔科医師で最も疲労している人の唾液には 4 万個/ml であった。しかしながら手術前の患者や、疲労感の少ない生活を送っている人からは検出されず、検出されてもごくわずかであることから、麻酔科の医師は実際疲労度が強いと推察される。HHV6 の唾液への出現数と疲労度については優れた先行研究 [6] があることから、今後は医療現場における疲労に関して調査研究していきたい。

3.3 HHV-6 Telomeric Repeat Sequences (TRS) の算出結果

HHV-6 は全長約 159 kb で両端を約 8 kb の DR-L と DR-R に挟まれた、約 143 kb のユニーク配列をもつ二本鎖 DNA である [8]。DR 領域には (TAACCC)_n の繰り返し配列をもつ Telomeric Repeat Sequences (TRS) と呼ばれる領域が存在し、その繰り返し配列数に差異があるという報告がある [9][10][11]。そのリピート数を算定するため、数種の Primer を使い PCR 増幅した(図 6)。ほとんどのサンプルではウイルスゲノム数が少ないため、

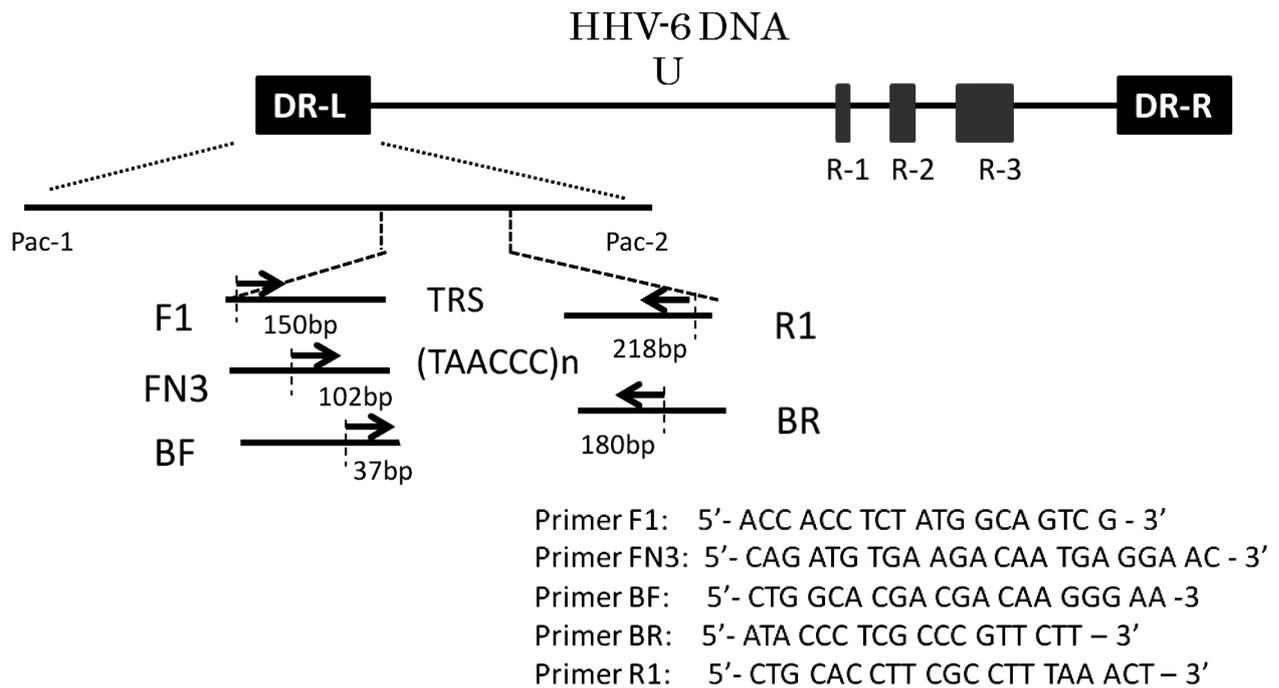


図 6. HHV-6 ゲノム模式図

HHV-6 は全長約 159 kb で両端を約 8 kb の DR-L と DR-R に挟まれた約 143 kb のユニーク配列 U をもつ二本鎖 DNA である。DR 領域には (TAACCC)_n の繰り返し配列をもつ Telomeric Repeat Sequences (TRS) と呼ばれる領域が存在する。

図の Primer 配列にて組み合わせを変えて Sequence 解析を行った。

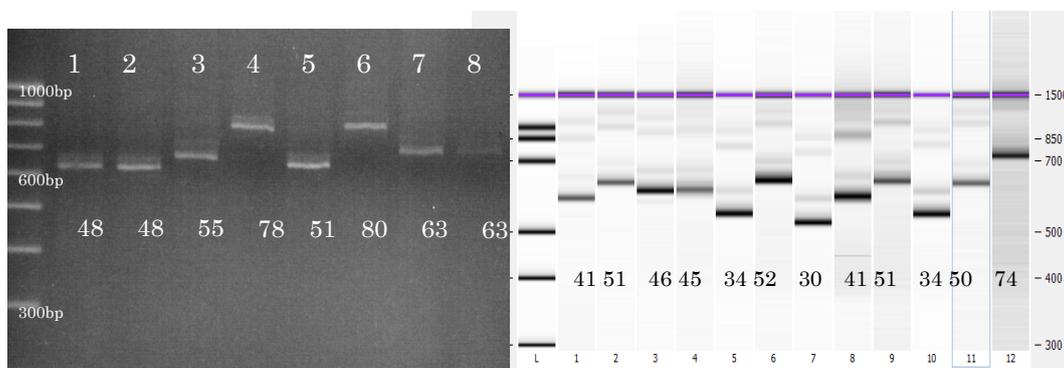


図 7. TRS 領域 PCR 増幅産物のアガロースゲル(左図)と Agilent chip での泳動(右図)

下の二けたの数字は (TAACCC)_n のリピート数。個々のウイルスによって異なるリピート数を持つことがわかる。左図 1, 2 レーンは突発性発疹患者姉妹で同数である。

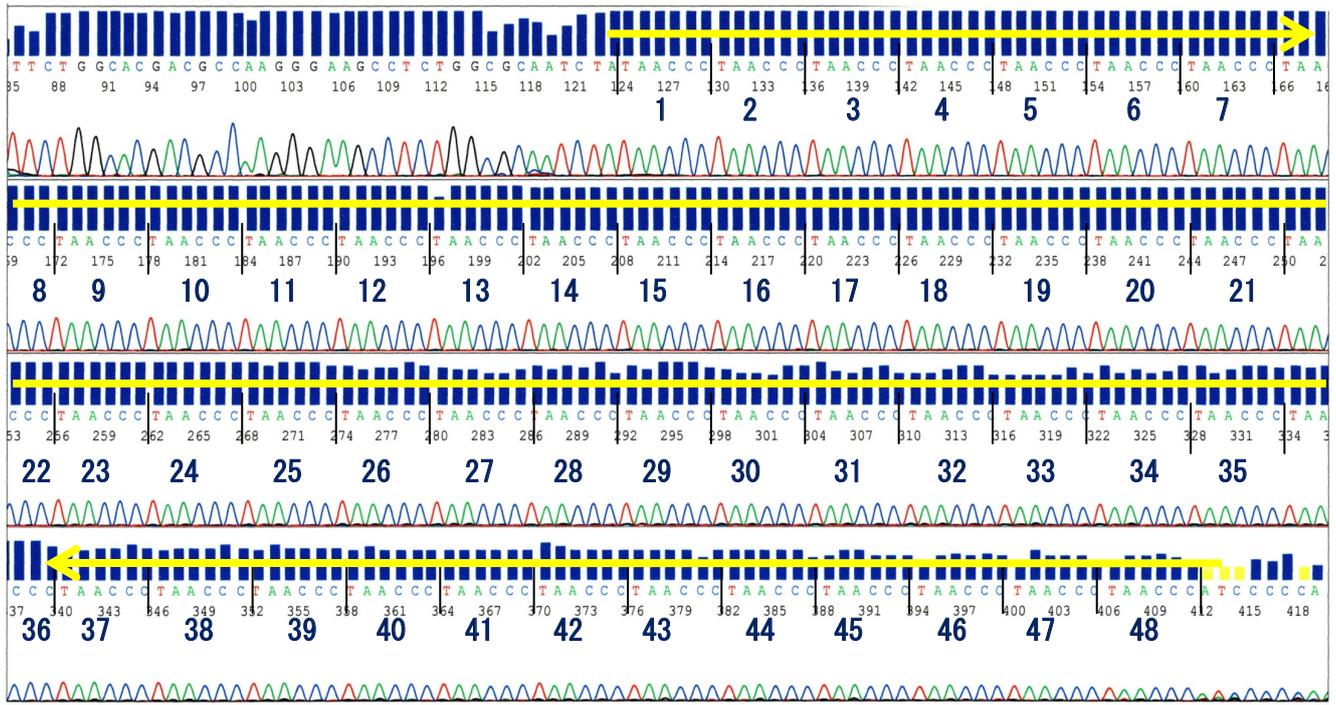


図 8. F1-R1primer の組み合わせによって PCR 増幅されたサンプルの Sequence 結果
Sequence 反応は Big Dye Terminator V. 3.1 Kit を用い、ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) で分析を行った。
TAACCC 配列の 48 回繰り返し観察された。

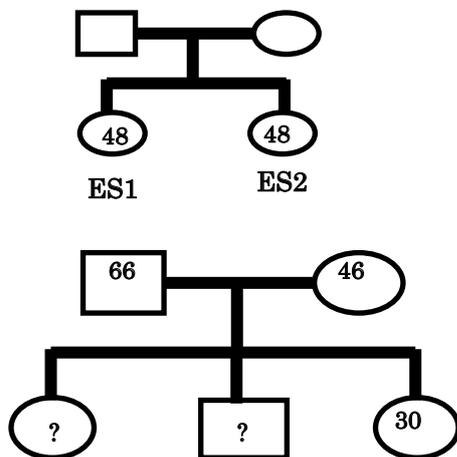


図 9. TRS 多型は感染経路の証明になるか？
上は突発疹患者姉妹のリピート数で同時期に同じ感染源からの感染を示唆しているが、下の家族例において両親からの感染ではないことが推測される。したがって HHV-6 の感染ルートに垂直感染は考えにくい。

PCR産物を検出するには 60 サイクル必要とするが、異なる数種のプライマーの組み合わせで増幅した結果、ほとんど非特異バンドは増幅されず、計画された増幅長の増幅産物が得られた。その中では、FN3/R1 の組み合わせが最も増幅効率が良かった。

しかしながら、ウイルスの DNA コピー数を $1\mu\text{l}$ あたり 4 個以下にした物は、同一検体を 4 回から 12 回ほど PCR 増幅をしても 1 回しか増幅されないものもあり、非常に増幅が難しい。

血液、唾液両方の検体から同様の (TAACCC) n の配列が読み取れ、27 から 92 リピートの個体差が存在することが観察されたが(図 7、図 8)、テロメアの反復数に法則性は見いだせず、低年齢者から採取された検体にリピート数が多いということもなかった。また、本籍や現住所も調べたが関連性は見出せなかった。

HHV-6 は唾液から感染すると言われ、試料の突発疹患者 ES1 と ES 2 は姉妹で同数の 48 回で繰り返されていた。このことから、一つの家系で親子のリピート数を調べたが親子では一致しなかった。これは HHV-6 による感染は、母子間では垂直感染が考えにくく、子供の成育環境からの水平感染が強く示唆される(図 9)。また今回、唾液抽出検体の 2 検体で TRS 中 SNP が見つかった。HHV-6 は TRS 多型の他、各所に SNP の報告がある^[12]。それらを踏まえ今後取り組んでいきたいテーマである。

4. 考察とまとめ

HHV-6 は小児突発性発疹の原因ウイルスである。HHV-6 は初感染後、主にマクロファージ系細胞や脳内グリア細胞、唾液腺細胞に潜伏感染し、何らかの原因で再活性化する。我々は解剖体血液での Real Time PCR 結果から、アルコールや薬物を大量に摂取している検体に HHV-6 再活性化が高頻度で観察される知見を得た。このことは薬物摂取あるいは依存症により免疫力が低下することが原因ということも考えられるが、薬物による肝機能低下によってインターロイキン 6(IL6)^{[13][14]}、インターフェロン、ケモカイン類^[15]が高度に誘導され、HHV-6 の活性因子になっているという説が有力である。今回手術を控えた患者から HHV-6 が検出されたことは、手術や薬物などの刺激により回復に時間がかかることも予想され、今後注意を払うべき点と思われる。これらのことは HHV-6 は宿主の生存の危険を察知し、再活性化によって他の宿主に感染し、自身の生存の確立を高くしていると解釈できる。麻酔科医師の疲労度について実験した結果、疲労感を感じる場合、高いウイルスの検出数が認められたが、その評価は各自の主観に任せ客観的数値と言えない。疲労している場合でもそれを感じない可能性があることも指摘されている。

近年、近藤らの研究^{[6][7]}により唾液中からの HHV-6 出現数と疲労度が相関するとの報告や、その出現に関する脳内の物資が突き止められ、日本疲労学会において疲労計測の指針が出されている。我々はそれらを踏まえて今後の発展的研究を行ってきたい。

HHV-6 のゲノム両端の DR-R と DR-L 領域には、(TAACCC)_n の 6 塩基繰り返し配列が存在する (Telomeric Repeat Sequences; TRS)。この領域の分析の結果、年齢や死亡年齢に関係なく、また地域や居住地にも無関係に個人に感染し、さらにウイルスごとに異なるリピート数を持っていることが分かった。これに関してヒトのテロメア配列の TTAGGG と関係があるという説や、ウイルス DNA を保存するミニ遺伝子の役割をはたしているという説など多種あるが定説はない。今回観察されたリピート数が、時間経過とともにどのように変化するか、あるいは、固定化しているのか注視していかなくてはならない。

突発性発疹患者姉妹から同数のリピート数を得たことから、この数値が母から子へと感染経路を明らかにする手段となりうるか検討したが、1 例の観察ではそれは認められなかった。今後はサンプル数を増やして観察していくとともに、そのリピート数の意味も考えていきたい。

謝辞

この研究に多大なご協力とご支援をいただきました、慈恵会医科大学ウイルス学講座 近藤一博 教授に深く感謝申し上げます。

また、コントロールサンプルのご提供をいただきました筑波大学医学医療系小児科学および唾液サンプルをご提供いただきました麻酔蘇生学の諸先生方に御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Salahuddin SZ, Kramarsky B, et al : Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. Oct 31; 234 (4776) : 596-601, 1986
- [2] Yamanishi K, et al : Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. May 14; 1 (8594) : 1065-7, 1988
- [3] Kondo K Yamanishi K et al : Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J. of General Virology* ,72, 1401-1408, 1991
- [4] Tohyama M, Hashimoto K. : [Drug-induced hypersensitivity syndrome and HHV-6 reactivation]. *Uirusu*. Jun; 59 (1) : 23-30. Review. Japanese., 2009
- [5] Riyaz N, Sivakumar CP. et al : Drug-induced hypersensitivity syndrome with human herpesvirus-6 reactivation. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. Mar-Apr; 78 (2) : 175-7, 2012
- [6] Kondo K : [Chronic fatigue syndrome and herpesvirus reactivation].
- [7] Nihon Rinsho. Jun;65 (6) :1043-8. Review. Japanese , 2007
Kondo K: [Human herpesvirus latency and fatigue]. *Uirusu*. Jun; 55 (1) : 9-17. Review. Japanese, 2005
- [8] Gompels UA, Macaulay HA et al :The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology*. May 10; 209 (1) : 29-51. Review, 1995
- [9] Mirandola P et al : PCR analysis of human telomeric repeats present on HHV-6A viral strains. *Virus Genes*.; 15 (1) : 29-32, 1997
- [10] Gompels UA, Macaulay HA et al : Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol*. Feb; 76 (Pt 2) : 451-8, 1995
- [11] Achour A, Agut H. et al : .Length variability of telomeric repeat sequences of human herpesvirus 6 DNA. *J Virol Methods*. Jul; 159 (1) : 127-30, 2009
- [12] Wilborn F, Siegert W. et al : Human herpesvirus type 6 variants identified by single-strand conformation polymorphism analysis. *J Virol Methods*. Jul; 73 (1) : 21-9. 1998
- [13] Kriesel JD, Araneo BA et al : Anti-interleukin-6 antibodies inhibit herpes simplex virus reactivation. *J Infect Dis*. Apr;175 (4) :821-7,1997
- [14] Keadle TL, Stuart PM. et al : IL-1 and TNF-alpha are important factors in the pathogenesis of murine recurrent herpetic stromal keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jan;41 (1) :96-102. 2000
- [15] Carr DJ, Campbell IL. et al: Cytokine and chemokine production in HSV-1 latently infected trigeminal ganglion cell cultures: effects of hyperthermic stress. *J Neuroimmunol*. May 15;85 (2) :111-21. 1998

Human Herpes Virus-6 (HHV-6) Detection and the DNA Polymorphism

Takako Nakamura

Technical Service Office for Medical Sciences, University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575 Japan

Keywords: Human Herpes Virus-6, Saliva, Real Time PCR, Telomeric Repeats Sequence