

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—調査・共同研究に対する助成—

2002年 3月 15日

財団法人 日中医学協会  
理事長 殿

研究代表者氏名 山西 弘一   
所属機関名 大阪大学・医学系研究科  
部署・役職 微生物学講座・教授  
所在地 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2  
電話 06-6877-5111 内線 3321

1. 研究テーマ

原因不明の血液疾患に関するウイルスの同定

2. 研究期間 自 2001年 5月 24日 ～ 至 2002年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 山西 弘一  
所属機関 大阪大学 職名 教授

中国側研究者氏名 沈 建箴 (Shen Jian-Zhen)  
所属機関 福建医科大学 職名 助教授

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当たっては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

2001年4月4日交付通知のあった研究課題 原因不明の血液疾患に関するウイルスの同定 についての収支決算を行いました。領収書コピーを添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳			
	消耗品費	旅 費	その他	合 計
1,000,066 円	662,821 円	334,410 円	2,835 円	1,000,066 円

支出明細（消耗品・旅費・その他の科目別に記載、別紙可）

科目区分	金 額	備考(用途・内訳)
研究事業費	1,000,066	利息 66円
旅 費	191,830	研究打合 関西空港⇄厦門 1名×@191,830×1回=191,830円 厦門⇄関西空港
	82,824	研究打合 厦門⇄関西空港 関西空港⇄厦門 1名×@82,824×1回=82,824円
宿 泊 代	59,756	ホテル オオサカ サンパレス 1名(沈 建箴)×@7,500×7泊×1.05=59,756円
消 耗 品	269,897	ナカライテスク株式会社 品名 ストレフトABCベルオキシダーゼ キット ヘルオキシターゼセンシヨクDABキット × 1 = 11,200 HPA 2 NEB0171S 2000U × 1 = 10,640 MSP 1 NEB0106S 5000U × 1 = 10,545 インターロイキン6 (ヒトリコンビナント) × 1 = 11,700 AMV REVERSE TRANSCRIPTASE × 1 = 32,400 DEADEND COLORIMETRIC APOPTOSIS DETEC×1= 26,600 TAQ DNA POLYMERASE IN STORAGE BUFFER×1= 8,820 TAQ DNA POLYMERASE IN STORAGE BUFFER×1= 9,000 QIAAMP DNA BLOOD MIDI KIT(100) × 1 = 81,000 QIAPREP SPIN MINIPREP KIT(50) × 1 = 9,900 5-AZA-2-DEOXYCYTIDINE × 1 = 8,640 ダルベツヘンホウイーグルバツイチ (2) × 1 = 4,500 GENO PURE フラスミドミディキット × 1 = 8,500 消費税 12,852
	58,590	三和理研株式会社 品名 iピペット キャンペーンセット × 1 = 19,800 ミスターフロスティ1.2/2.0ml × 1 = 36,000 消費税 2,790

科目区分	金額	備考(用途・内訳)
雑 費	334,334	八洲薬品株式会社
		品名 コウVP16 × 1 = 38,700
		Plasmid Maxi Kit × 1 = 54,000
		プレートキット × 1 = 16,914
		消費税 15,920
		840 銀行振込手数料 (東急観光株式会社大阪中央支店)
		525 銀行振込手数料(ナカライテスク)
		525 銀行振込手数料(三和理研)
		525 銀行振込手数料(ホテルオオサカサンパレス)
		420 銀行振込手数料(八洲薬品株式会社)

## 原因不明の血液疾患に関するウイルスの同定

研究代表者氏名：山西弘一

所属：大阪大学大学院医学研究科微生物学

役職：教授

### 要旨

ヒトに感染するヘルペスウイルスは現在までに8種類報告されているが、初感染の後、体内に潜伏感染し、宿主の免疫不全状態に伴い種々の疾患を引き起こすことが知られている。ヘルペスウイルスのなかでもβヘルペスウイルスに属するHHV6は初感染の後、血小板減少性紫斑病を引き起こす症例も報告されており、また骨髄移植後の免疫不全状態では再活性化に伴い、骨髄抑制が認められる症例も数多く経験されている。このようなことから、血液系の原因不明の疾患にヘルペスウイルスが病因として関わっている可能性が深く示唆される。ヘルペスウイルスに保存性の高い領域にヘルペスウイルスを共通増幅できるプライマーを設計し、PCR法を用いて、複数のヘルペスウイルスを同時に検出できる系を開発した。原因不明の血液疾患の患者検体に応用し既知及び未知のヒトヘルペスウイルスがその発症原因である可能性について検討した。

**Key Words:** ヘルペスウイルス, 原因不明血液疾患, PCR法

### 目的や研究背景

ヘルペスウイルスとして分類されるウイルスは100種類以上知られている。魚類、両生類、鳥類など、またほ類のサル、ヒトに及ぶ生物種に広く分布している。ヒトヘルペスウイルス(HHV)としては、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)、2型(HSV-2)、帯状疱疹ウイルス(VZV)、ヒトカイトメガロウイルス(HCMV)、Epstein-Barrウイルス(EBV)の5種と、最近発見されたヒトヘルペス6型(HHV-6)7型(HHV-7)及び8型(HHV-8)の8種類が知られており、その生物学の性状からα、β、γの3群に分けられている。ヘルペスウイルス粒子はいずれもが類似し、被膜を持つ直径200nmの粒子で、細胞の核内には直径100nmの被膜のないヌクレオカプシドが存在する。感染標的細胞は、αヘルペスでは多くの細胞に、βヘルペスでは主に血液細胞(リンパ球や単球/マクロファージ)と上皮細胞、そしてγヘルペスではリンパ球や上皮細胞などである。ヒトヘルペスウイルスは初感染後体内に潜伏感染し、宿主の免疫力の低下に伴い様々な疾患の原因になることが知られている。ヘルペスウイルスのなかでもβヘルペスウイルスに属するHHV6は初感染の後、血小板減少性紫斑病を引き起こす症例も報告されており、また骨髄移植後の免疫不全状態では再活性化に伴い、骨髄抑制が認められる症例も数多く経験されている。このようなことから、血液系の原因不明の疾患にヘルペスウイルスが病因として関わっている可能性が深く示唆される。我々はこれまでにHHV-6が突発性発疹の原因ウイルスであることを明らかにした。また、HHV-6のHST株の全塩基配列(160Kbp)を決定した。ヘルペスウイルスに保存性の高い領域にヘルペスウイルスを共通増幅できるプライマーを設計し、PCR法を用いて、複数のヘルペスウイルスを同時に検出できる系を開発した。現在までに開発し得た系は、ヘルペスウイルスの中でもβ、γヘルペスを共通増幅できる系に加え、さらに、より高感度に、βへ

ルベスウイルスを共通増幅する系である。後者の系は、ヒトβヘルペスウイルスのみならず、サルサイトメガロウイルスも含め、βヘルペスウイルスを広く共通増幅できる系で、既知のウイルスに加え未知のヘルペスウイルスも検出できる系と考えている。これらのヒトヘルペスウイルスを同時に検出可能な PCR 系を開発し、原因不明の血液疾患の患者検体に応用し既知及び未知のヒトヘルペスウイルスがその発症原因である可能性について検討することを目的とした。

## 研究方法

1) βヘルペスウイルス標準株として、U1102(HHV-6A), HST(HHV-6B), 7-KHR(HHV-7), Towne(CMV)感染細胞を proteinase K 処理して得た DNA を 100ng、臨床検体は患者末梢血または骨髓血より単核球を分離して proteinase K 処理を行い、 $10^5$ 個細胞から得られた DNA をテンプレートとして用いた。血漿は 20μl から抽出した DNA をテンプレートとして用いた。

2) 共通増幅プライマーは、βヘルペスウイルスに保存性の高い late spliced gene 領域に forward 側 2 種、reverse 側 2 種の 2 組を設定し、nested PCR 法を施行した。得られた増幅産物はサザンハイブリダイゼーション法によりウイルスを特定した。特定されないものについては direct sequencing 法を用いて塩基配列を調べた。

3) 対象は特発性血小板減少症 (ITP) 18 症例 23 例 (骨髓 5 検体、血漿 2 検体、末梢血単核球 16 検体)、再生不良性貧血 (AA) 末梢血 9 検体、急性白血病患者 28 症例の末梢血単核球検体。

(倫理面への配慮)

患者からの検体の採取 (末梢血 2ml、骨髓血 1 ml) はインフォームドコンセントをとった上で行った。検体から抽出した DNA はヘルペスウイルスの検出以外の目的には使用せず、患者に不利益を生じることはないと判断した。

## 研究結果

1) 共通増幅プライマーはβヘルペスウイルス感染細胞 (HHV-6、HHV-7、HCMV)、臨床検体において既知のβヘルペスウイルスを特異的に共通増幅することが可能であった。

2) 特発性血小板減少症 (ITP) 患者 18 症例 23 検体 (骨髓 5 検体、血漿 2 検体、末梢血単核球 16 検体) でのヘルペスウイルスのスクリーニング結果は、骨髓から HHV-6 が 3 検体 (60%)、末梢血単核球から HHV-6 が 10 検体 (62.5%)、HCMV が 1 検体 (6.3%)、血漿から HHV6 が 1 検体 (50%) 検出された。未知のヘルペスウイルスの検出には至らなかった。

3) 再生不良性貧血 (AA) 患者においては、末梢血 9 検体中、HHV-7 が 1 検体 (11.1%) で検出された。再生不良性貧血患者の症例中、2 症例が肝炎症状後に再生不良性貧血を発症し、ウイルス感染が契機として疑われていたが、2 症例ともにβヘルペスウイルスは検出されなかった。このうちの 1 症例は骨髓移植が施行され、移植後経時的にヘルペスウイルスについて調べたところ、移植後第 9 週に HHV-6 が 100-1000copies/sample 検出された。未知のヘルペスウイルスの検出には至らなかった。

4) 急性白血病患者検体を用いてこの系を応用したところ HHV-6 が 3 検体、HHV-7 が 5 検体、HCMV が 2 検体検出されたが、未知ウイルスは検出されなかった。未知のヘルペスウイルスの検出には至らなかった。

## 考察

ヘルペスウイルスの中でもβヘルペスウイルスに属する HHV-6、HCMV は再活性化時に骨髓抑制を認める症例や、初感染時に血小板減少症を発症する症例が報告されている。現在は、症例を集めてスクリーニングを施行しており、特発性血小板減少症患者の末梢血、骨髓から HHV-6 が高率に検出された。肝炎症状後に再生不良性貧血を発症し、ウイルス感染が契機として疑われていた再生不良性貧血患者検体における検討ではヘルペスウイルスの関与は否定的であった。未知のヘルペスウイルスが原因不明の血液疾患の原因である可能性を考え、特発性血小板減少症 (ITP)、再生不良性貧血 (AA) と急性白血病患者検体を用いたスクリーニングも同時に施行したが未知ウイルスの検出には

いたらなかった。我々の開発した HHV 共通増幅システムは患者検体からのウイルスの検出が簡便に行なえ、スクリーニングに有効であった。特発性血小板減少症 (ITP) 患者検体から、高率に HHV-6 が検出された。骨髄移植後の造血障害に、HHV-6 が HCMV と同様に関与するとの報告がされた。In vitro で、HHV-6 顆粒球系の CFU-GM、赤芽球系の BFU-E のコロニー数の減少を認めた。HHV-6 の造血系の影響が示唆された。今回の結果がその意義については現在検討中である。

#### 参考文献

1. Roizman B. and Pellett P.E.. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. 2001. Fields Virology (Fourth Edition) 2381-2398.
2. Yamanishi K.. Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7. 2001. Fields Virology (Fourth Edition). 2785-2802.
3. Drobyski, W. R., W. M. Dunne, E. M. Burd, K. K. Knox, R. C. Ash, M. M. Horowitz, N. Flomenberg, and D. R. Carrigan. 1993. Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J. Infect. Dis.* 167:735-739.
4. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, Sunagawa T, Kawanishi K, Sashihara J, Hata A, Zou P, Kosuge H, Yamanishi K. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999 Oct;73(10):8053-63
5. Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. H. Miyoshi et al. *Bone Marrow Transplantation* 2001 (27)1065-1070
6. Carrigan DR, Knox KK. Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. *Blood* 1994 Nov 15;84(10):3307-10.
7. Isomura H, Yoshida M, Namba H, Fujiwara N, Ohuchi R, Uno F, Oda M, Seino Y, Yamada M. Suppressible effects of human herpesvirus-6 on thrombopoietin-inducible megakaryocytic colony formation in vitro. *J Gen Virol* 2000 Mar;81(Pt 3):663-73