

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18834

研究課題名(和文)ヘルペスウイルス眼感染症におけるウイルスタイピングの解析

研究課題名(英文)Analysis of viral genotype in herpesvirus ocular infections

研究代表者

細貝 真弓(Hosogai, Mayumi)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20760177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヘルペスウイルスは9種類存在し、それぞれが様々な眼感染症に関連し、患者背景など臨床像は多様である。本研究では、単純ヘルペスウイルスと水痘帯状疱疹ウイルス眼感染症の眼検体(角膜擦過物、前房水、硝子体液)より抽出したDNAを用いて、各ウイルスの遺伝子型を調べた。各ウイルスに特異的なプライマーで全ゲノムをロングPCRで増幅し、ウイルス遺伝子型を解析した。眼検体は微量であり、多くをヒトゲノムが占めるため、ウイルスゲノム増幅およびシーケンスが困難であった。本研究期間内では、ウイルス遺伝子型と各眼疾患との関連性を見出すことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間内では、ヘルペスウイルス遺伝子型と各眼疾患との関連性を見出すことができなかった。引き続き、各ヘルペスウイルスのシーケンスデータを蓄積し、細胞への感染に必要な遺伝子を中心に遺伝子型の解析を行い、臨床病型との関連について検討していく。ヘルペスウイルス遺伝子型と疾患の臨床病型や患者背景に関連があるのが明らかになれば、将来的にヘルペスウイルス眼感染症の病態解明につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：There are nine types of herpesviruses, each of which is associated with various ocular infections and has diverse clinical features such as patient background. In this study, the genotypes of each virus were investigated using DNA extracted from ocular specimens of herpes simplex virus and varicella-zoster virus ocular infections (corneal epithelial scrapings, aqueous humor, vitreous fluid). The whole genome of virus was amplified by long PCR with primers specific for each virus, and the viral genotype was analyzed. Since the amount of ocular specimens is very small and the human genome occupies most of them, it has been difficult to amplify and sequence the viral genome. During this study period, no association between viral genotype and each ocular disease could be found.

研究分野：眼科学

キーワード：ヘルペスウイルス 単純ヘルペスウイルス 水痘帯状疱疹ウイルス サイトメガロウイルス 遺伝子型

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトに感染するヘルペスウイルスには、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1)、単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2)、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、サイトメガロウイルス (CMV)、Epstein-Barr ウイルス (EBV)、ヒトヘルペスウイルス 6A (HHV-6A)、HHV-6B、HHV-7、HHV-8 の 9 種類が知られている。一旦ヒトに感染すると、生涯にわたり持続感染するが多くの場合は不顕性である。各ヘルペスウイルスは、初感染および宿主の免疫状態やさまざまな刺激による再活性化に伴って、多彩な疾患を起こす。眼科領域では角膜炎、前部ぶどう膜炎、網膜炎などの原因となる。

中でも、HSV や VZV は、角膜炎や非常に予後不良な網膜炎の原因ウイルスであるが、これらの疾患を同時に発症することは稀である。また、CMV は免疫不全者に日和見感染症として網膜炎をきたすことが古くより知られてきたが、近年、免疫正常者の角膜炎や前部ぶどう膜炎に関与することが報告されており (Koizumi N, et al., *Br J Ophthalmol*, 2006) (Hosogai M, et al., *Br J Ophthalmol*, 2015)、一般的に免疫不全者に発症する網膜炎とは患者背景が異なる。これらヘルペスウイルスが関連する眼炎症性疾患の病態の詳細は未だ不明である。

CMV はゲノム構造に多様性があり、眼疾患以外の CMV 感染症では尿や咽頭拭い液を用いた解析で CMV 遺伝子型が疾患によって異なることが示されてきた (Vogel JU, et al., *Med Microbiol Immunol*, 2013) (Trincado DE, et al., *J Med Virol*, 2000)。近年、CMV 関連眼炎症性疾患の前房水を用いた CMV 遺伝子型の解析で、gB 遺伝子型は角膜炎と前部ぶどう膜炎では類似している一方で、網膜炎とは異なることが報告された (Oka N, et al., *J Med Virol*, 2015)。CMV の他の遺伝子および他のヘルペスウイルスについても、臨床病型の違いとウイルス遺伝子型に関連がある可能性が推測されているが、未だ報告されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヘルペスウイルス眼感染症 (角膜炎、前部ぶどう膜炎、網膜炎) 患者より診断目的で採取した眼検体 (角膜擦過物、前房水、硝子体液) より抽出した DNA を使用し、各ヘルペスウイルスの遺伝子型を調べ、疾患との関連を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### <対象>

2009 年 4 月 1 日から 2016 年 10 月 31 日までの間に、群馬大学眼科、東京医科大学眼科、東京医科歯科大学眼科にて、診断目的で採取した眼検体 (角膜擦過物、前房水、硝子体液) より PCR 法でヘルペスウイルスが検出された眼感染症 (角膜炎、前部ぶどう膜炎、網膜炎) 約 100 例。

#### <方法>

#### (1) ヘルペスウイルス DNA 陽性検体の収集

群馬大学眼科、東京医科大学眼科、東京医科歯科大学眼科にて、眼感染症の診断目的で採取した眼検体 (角膜擦過物、前房水、硝子体) から DNA を抽出し、PCR 法でヘルペスウイルスが検出され、角膜炎、前部ぶどう膜炎、網膜炎と診断された患者の DNA 検体を匿名化した。

#### (2) ヘルペスウイルス DNA の増幅

群馬大学眼科にて、DNA 検体を用いて、各ヘルペスウイルスに特異的なプライマーで全ゲノムをロング PCR で増幅した。

#### (3) ヘルペスウイルス遺伝子配列の決定

次世代シーケンサー Mi Seq (イルミナ株式会社) で各ヘルペスウイルス遺伝子配列を決定した。

Ovation® SP+ Ultralow DR Multiplex System1-8 キット (タカラバイオ) によりシーケンスライブラリを作製

Mi Seq シーケンサーで、75-base paired-endread シーケンシングを 1 ラン施行  
リードトリミング後に、リファレンスゲノムにマッピング

Mi Seq によるシーケンスが不可能な場合は、3130xL Genetic Analyzer (Life technologies) で、細胞への感染に必要なウイルス遺伝子を中心にシーケンスを行った。

#### (4) ヘルペスウイルス遺伝子型の解析

得られた各ヘルペスウイルス遺伝子配列の情報から、既知の系統株への分類を行い、上記の領域の遺伝子型の解析を行った。

#### (5) 臨床データの調査

患者の臨床病型 (角膜炎、前部ぶどう膜炎、網膜炎)、基礎疾患、免疫状態などの臨床データを調査した。

#### (6) 臨床像とヘルペスウイルス遺伝子型との関連について検討

各疾患 (角膜炎、前部ぶどう膜炎、網膜炎) とウイルス遺伝子型 (HSV の US2、gG (US4)、gI (US7) 遺伝子型 (それぞれ type A, B, C) 1)、VZV の clade 1~5、)、CMV の gB 遺伝子型 (type 1~3) など既知の遺伝子型との関連を検討した。

#### 4. 研究成果

ヘルペスウイルス眼感染症患者より診断目的で採取した眼検体（角膜擦過物、前房水、硝子体液、涙液）より抽出した DNA を使用し、各ヘルペスウイルスの遺伝子型を調べた。既報<sup>1-4)</sup>を参考にして、本研究期間内に、主に HSV の US2、gG(US4)、gI(US7)、VZV の ORF38、ORF54、ORF62、CMV の gB、UL128、UL144 などの遺伝子領域を PCR で増幅し、3130xL Genetic Analyzer (Life technologies) でシーケンスを行い、既知の系統株への分類を行った。患者の臨床病型（角膜炎、前部ぶどう膜炎、網膜炎）、基礎疾患、免疫状態などの臨床データを調査した。眼検体は微量であり、多くをヒトゲノムが占めるため、ウイルスゲノム増幅およびシーケンスが困難であった。本研究期間内では、ウイルス遺伝子型と各疾患との関連性を見出すことができなかった。

HSV による角膜炎は一般的には片眼性に発症するが、両眼に発症した症例の涙液および角膜擦過物を用いた HSV の制限酵素断片長多型 (RFLP) 法による遺伝子解析を行った。本検討においても、現時点で HSV 遺伝子型と臨床的な表現型との相関は示されなかった (Yoshida M, Hosogai M, et al., *Cornea*, 2019)。

引き続き、各ヘルペスウイルスのシーケンスデータを蓄積し、細胞への感染に必要な遺伝子を中心に遺伝子型の解析を行い、臨床病型との関連について検討していく。

#### 【文献】

1. Pfaff F, Groth M, Sauerbrei A, Zell R. Genotyping of herpes simplex virus type 1 by whole-genome sequencing. *J Gen Virol*. 2016;97(10):2732-2741.
2. Sun Z, Guo Y, Li M, Yao Z. Genotype analysis of varicella-zoster virus isolates from suburban Shanghai Municipal Province, China. *J Med Microbiol*. 2016; 65(2):123-128.
3. Hosogai M, Nakatani Y, Mimura K, Kishi S, Akiyama H. Genetic analysis of varicella-zoster virus in the aqueous humor in uveitis with severe hyphema. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):427.
4. Renzette N, Gibson L, Bhattacharjee B, et al. Rapid intrahost evolution of human cytomegalovirus is shaped by demography and positive selection. *PLoS Genet*. 2013;9(9):e1003735.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Masaaki, Hosogai Mayumi, Yokokura Shunji, Sato Kota, Hariya Takehiro, Kobayashi Wataru, Okabe Tatsu, Todokoro Daisuke, Nakazawa Toru	4. 巻 38
2. 論文標題 Bilateral Necrotizing Herpes Simplex Keratitis in an Immunocompetent Patient With Genetic Analysis of Herpes Simplex Virus 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IC0.0000000000002026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 細貝真弓	4. 巻 72
2. 論文標題 ウイルス性角膜炎	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 OCULISTA	6. 最初と最後の頁 21-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮久保 朋子, 戸所 大輔, 横尾 英明, 細貝 真弓, 秋山 英雄	4. 巻 125
2. 論文標題 実質型角膜ヘルペスの経過中にMycobacterium chelonaeによる非定型抗酸菌感染を合併した1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日眼会誌	6. 最初と最後の頁 136-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------