

主論文

Monitoring of Human Herpesviruses-6 and -7 DNA in Saliva Samples During the Acute and Convalescent Phases of Exanthem Subitum

(突発性発疹患児の急性期から回復期における唾液中ヒトヘルペスウイルス-6 および-7 DNA のモニタリング)

【緒言】

突発性発疹は、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) またはヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) の感染によって起こる小児の予後良好な疾患である。HHV-6 は現在、HHV-6A および HHV-6B に分類され、後者が突発性発疹の主要な原因ウイルスとして関与している。これらのウイルスは、乳幼児への初感染後、体内に潜伏・持続感染し、健康な小児または成人の唾液中にウイルス DNA を排泄することが報告されている。このことから、両親から子供に唾液を介して感染し、突発性発疹を発症すると考えられているが、その感染様式は依然として不明な点が多い。そこで本研究では、小児が突発性発疹後に、その原因ウイルスである HHV-6 または HHV-7 を、いつごろからいつごろまで、どのくらい長く唾液中に排泄するのか、そのウイルス排泄の動態を解明するために、突発性発疹後の乳幼児から採取した唾液中の、HHV-6 および HHV-7 のウイルス DNA 量について、急性期から回復期にかけて経時的にモニターした。また、感染源の解明をめざして、突発性発疹を発症した乳幼児の兄弟および両親を含む、3~9 歳の小児および成人の唾液についても同様に検討した。

【材料と方法】

対象とサンプルの収集

対象は、臨床的に突発性発疹と診断された乳幼児のうち、その両親から急性期の採血への同意が得られた 17 例(男児 5 例、女児 12 例)とした。血液は初回のみ、唾液は初回から発症 1 ヶ月以内は週 1 回、2 ヶ月以降は月 1 回を目安に採取した。唾液は、フロックスワブを用いて採取し、Universal Transport Medium (UTM) に懸濁させ輸送した。また、対象 17 例の乳幼児の兄弟および両親を含む、3~9 歳の小児と成人各 23 例からも同様の方法で唾液をサンプリングした。本研究は、岡山大学生命倫理審査委員会の承認を得ている。

血液および唾液サンプルからの DNA 抽出とリアルタイム PCR

全血サンプル 200 μ l および唾液サンプル 200 μ l から、QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いて DNA を抽出した。溶出量は、血液が 100 μ l、唾液が 50 μ l とした。リアルタイム PCR による HHV-6 および HHV-7 の DNA コピー数の定量は、既報のプライマーセットとプローブを用い、HHV-6 は U31 遺伝子を、HHV-7 は U57 遺伝子を増幅することによって実施した。

ウイルス分離

全血 800 μ l から末梢血単核球を分画した。また 800 μ l の唾液を 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過して用いた。末梢血単核球および濾過した唾液を、臍帯血単核球または MT-4 細胞に加えて培養し、HHV-6 および HHV-7 の特異的モノクローナル抗体を用いてウイルスの同定を行った。

HHV-6 のタイピング

U90 遺伝子を増幅する既報のプライマーセットを用いて PCR を行い、増幅産物の長さの違いによって HHV-6A または HHV-6B のタイピングを行った。

血漿抗体価の測定

初回の急性期血漿について、HHV-6B および HHV-7 に対する抗体価を、間接的免疫蛍光抗体法を用いて測定を行った。

【結果】

突発性発疹の患児 17 例について HHV-6B または HHV-7 の初感染であることのウイルス学的証明

対象の突発性発疹患児 17 例から、247 検体の唾液サンプルを採取した。モニター期間は、152~721 日であり、17 例中 15 例は 1 年以上追跡できた。突発性発疹の発症年齢は 8~31 ヶ月(平均 13.7 ヶ月)であった。初回に採血した急性期血液サンプルからのウイルス DNA の検出およびウイルス分離によって、17 例中 16 例が HHV-6 による感染、1 例が HHV-7 による感染であった。HHV-6 のタイピングの結果は、16 例全てが HHV-6B であった。さらに急性期血漿抗体価はいずれも <10 であり、HHV-6B または HHV-7 の初感染であることがウイルス学的に確認できた。

HHV-6B による突発性発疹 16 例の唾液中 HHV-6 および HHV-7 の DNA 排泄動態

HHV-6B の感染によって突発性発疹を発症した 16 例の、唾液中 HHV-6 DNA コピー数の動態について、まずは、発症後 7 ヶ月以内の動態を詳細に検討した。各症例の有熱期(初回)、急性期(発症から 1 ヶ月以内)、回復期(発症から 2 ヶ月以降)の 3 期間に分け、各期間の唾液中 HHV-6 DNA コピー数の最大値が未検出の場合は“o”、1,000 コピー/ml 未満の場合は“a”、1,000 コピー/ml 以上は“A”として、3 文字コードで 3 期間のウイルス排泄パターンを定義した。その 3 文字コードのウイルス排泄パターンで、7 例が“ooA”、3 例が“aaA”、1 例が“aoA”、1 例が“oaA”、1 例が“ooa”と、有熱期および発症から 1 ヶ月以内の急性期に、HHV-6 DNA の検出を認めないかコピー数が低値に留まるのものが、81.3%(13/16)であった。一方、2 ヶ月以降の回復期は、1,000 コピー/ml 以上の“A”が、93.7%(15/16)であった。以上より、1 ヶ月以内の急性期には唾液中のウイルス DNA 量、DNA 検出率はともに低く、2 ヶ月以降の回復期において多量のウイルス DNA を排泄することが示された。

さらに、HHV-6 DNA が未検出のサンプルに着目すると、突発性発疹を発症後 2~6 日に採取した初回の唾液では、68.7%(11/16)が HHV-6 DNA は未検出であった。さらに 93.7%(15/16)では、有熱期(初回)か急性期(発症から 1 ヶ月以内)に、1 回以上 HHV-6 DNA が未検出であった。さらに、HHV-6B による突発性発疹 16 例について、HHV-6 DNA が 1,000 コピー/ml 以上に上昇した最初の日までの中央値と平均は、それぞれ 64 日と 76.8 日であり、突発性発疹の発症後、急性期と回復期初期に、かなり長く HHV-6 DNA の排泄が低い時期があることが示された。

また、全追跡期間を通しての分析で、HHV-6B による突発性発疹 16 例の唾液中 HHV-6 および HHV-7 DNA の平均検出率と陽性検体の平均コピー数を、1 ヶ月以内は 2 週毎、その後は月単位で集計したところ、HHV-6 DNA の検出率は、最初の 4 週間では低く、3~7 ヶ月目に最大に達し、その後漸減した。唾液中に排泄される HHV-6 DNA 平均コピー数も同様で、急性期の最初の 4 週間では低く、3~6 ヶ月目に最大に達した。HHV-6 による突発性発疹 16 例中 6 例で、回復期のかなり後(118~214 日)から、唾液中への HHV-7 DNA 排泄が認められたが、その時期に特に臨床症状は示さなかった。

各症例の HHV-6 DNA について、その最大値の平均は 11,755.9 コピー/ml で、最大を記録した日の中央値と平均は、それぞれ発症後 109 日と 130.2 日であり、突発性発疹発症後 2 ヶ月以降 7 ヶ月まで、10,000 コピー/ml を超える極めて高い DNA 量を記録した日があった。

年長小児と成人の唾液サンプルからのウイルス DNA 検出率の比較

突発性発疹を発症した乳幼児の兄弟と両親を含む、3~9 歳の年長小児および成人各 23 名から採取した唾液サンプルの HHV-6 および HHV-7 DNA の排泄状況を比較したところ、HHV-6 DNA は、年長小児が 52.2%(12/23)の検出率であったのに対して、成人からは 4.3%(1/23)であり、年長小児のほうが有意に高かった(P<0.01)。

唾液サンプルからのウイルス分離

初回に採血した急性期末梢血単核球からの HHV-6 分離は、16 例中 11 例で成功した。しかしながら、唾液からの HHV-6 の分離は、HHV-6 DNA コピー数が高い場合でも、宿主細胞として臍帯血単核球あるいは MT-4 細胞のどちらを用いても不成功であった。対照的に HHV-7 は、唾液からウイルス DNA が検出された場合において、コピー数の高低にかかわらず分離できた。HHV-6B による突発性発疹で、先行して唾液から HHV-6 DNA が検出されていて、その後 HHV-7 DNA が検出された例では、HHV-7 DNA が検出されるようになると、ほどなく何度も HHV-7 の分離ができるようになったが、HHV-6 については、全経過を通じて、また HHV-6 と HHV-7 の DNA コピー数が同等であっても、HHV-6 は分離できなかった。

【考察】

本研究では、HHV-6Bによる突発性発疹後の唾液中のHHV-6 DNAコピー数は、有熱期および急性期では低く、3~7ヵ月の回復期において最大になり、その後漸減することを報告した。部分的に類似の既報があるが、本研究の研究デザインとは、大きく異なる。すなわち、既報の一つでは、出生後277例について、臨床症状のみから推定したHHV-6感染時期を基に、唾液へのHHV-6の排泄を追跡している。本研究は、突発性発疹のウイルス学的確認ができた16例について、詳細に唾液中へのHHV-6の排泄動態を検討した。

ウイルス分離に関して、今回は唾液からのHHV-6の分離は不成功に終わったが、これには、いくつかの制約があったと考えている。第一に、より安全な方法で乳幼児から唾液サンプルを得るために、唾液サンプルをフロックスワブで収集し、UTMに懸濁させた。このプロセスで唾液は約1:10に希釈されているが、既報では唾液を直接使用している。第二に、HHV-6およびHHV-7のDNA定量およびウイルス分離を行うために、当初は診療所から一晩かけて輸送したサンプルを、臍帯血単核球に接種していた。輸送中の感染性の低下を最小限に抑えるために、途中からはMT-4細胞を診療所に持ち込み、採取直後に唾液サンプルを接種したが、HHV-6の分離は成功しなかった。MT-4細胞については、HHV-6B実験室株のZ29株及び今回分離株を用いた段階希釈による感受性の比較で、臍帯血単核球に匹敵する感受性を示すこと、HHV-6B侵入のための細胞受容体CD134を十分に発現することを確認している。既報では、唾液サンプルからのHHV-6の分離が成功したという初期の成績もあるが、HHV-7の発見が同年に報告されており、分離されたのは、性状の類似するHHV-7であった可能性が高いと考えられる。

本研究では、HHV-6Bによる突発性発疹後の唾液サンプル中のHHV-6 DNAコピー数は、有熱期および急性期では低く、3~7ヵ月の回復期において最大になり、その後漸減することを報告した。突発性発疹を発症した乳幼児の兄弟と両親を含む、3~9歳の年長小児および成人各23名から採取した唾液サンプルの排泄状況を比較したところ、HHV-6 DNAの検出率は、年長小児のほうが有意に高かった。これらの知見は、突発性発疹の回復期にある小児の唾液は、成人の唾液よりもHHV-6の感染源となる可能性が高いことを示唆している。欧米の既報においても、年長の同胞からの感染を示唆する成績がある。

また日本では、突発性発疹の罹患率の低下と発症年齢の高月齢化が報告されており、出生数の減少、核家族化による感染源との接触頻度の低下と関連していることも考えられる。これらのことを加味すると、兄弟だけでなく、保育園、幼稚園、孤児院の同年以上の小児も潜在的な感染源となると考えられる。

【結論】

HHV-6Bによる突発性発疹後のHHV-6 DNAの唾液中への排泄は、発症後1ヵ月以内では低率・低値にとどまり、2ヵ月以降上昇し、回復期の3~7ヵ月の間、長期にわたって高いコピー数で排泄され、その後漸減することが示された。また、HHV-6Bによる突発性発疹の感染源については、突発性発疹回復期において唾液中から長期にわたって高いコピー数でHHV-6のDNAが排泄されること、両親を含む成人よりも患児の兄弟を含む3~9歳の小児のほうが唾液中からのHHV-6 DNA検出率が高いことから、両親よりも兄弟あるいは年長の小児の唾液である可能性が高いことが示唆された。