

乳幼児におけるヒトヘルペスウイルス-6(HHV-6)初感染の臨床免疫学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9119

乳幼児におけるヒトヘルペスウイルス-6 (HHV-6) 初感染の 臨床免疫学的研究

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)
新 谷 尚 久

突発性発疹症は、2日から5日間の高熱が持続、解熱後全身的に発疹が出現するという臨床的特徴を有し、乳幼児が罹患する熱性疾患である。突発性発疹症は長い間ある種の感染症と信じられてきたが、1988年ヒトヘルペスウイルス-6 (human herpesvirus-6, HHV-6) 感染が突発性発疹症の本体であることが証明された。血清学的研究より、HHV-6 初感染は主に乳幼児期に起き、成人期には潜伏感染することが示された。本研究は、乳幼児に生後初めて認める発熱の原因として HHV-6 初感染がいかに関与するかを明らかにすることを目的とした。生後初めて発熱を認めた小児の血液より抽出した DNA を HHV-6 に特異的なプライマーを用い増幅、PCR 産物をエチジウムブロマイド染色にて判定、血液中 HHV-6 DNA の有無を検討した。PCR 法により、生後初めて発熱を認めた小児の約40%に血中 HHV-6 DNA が検出できた。他方、このような血中 HHV-6 DNA の検出は、突発性発疹症の既往のある成人や小児対照例ではみられなかった。血清抗 HHV-6 IgG 抗体は血中 HHV-6 DNA 陽性者全例になく、血中 HHV-6 DNA 陰性者の一部には様々なレベルの血清抗 HHV-6 IgG 抗体が存在した。突発性発疹症に典型的な解熱後発疹を来した例は、血中 HHV-6 DNA 陽性者 (65%) のみならず、血中 HHV-6 DNA 陰性者 (14%) にもみられた。ペア血清での抗 HHV-6 IgG 抗体価の検索より、解熱後発疹を来した例は、血中 HHV-6 DNA の検出の有無に関わらず、HHV-6 初感染と考えられたが、リンパ節腫大、消化器症状、呼吸器症状等の発疹以外の臨床症状については両者間に有意な違いはみられなかった。PCR 法による血中 HHV-6 DNA の検出の有無は、HHV-6 初感染急性期にみられる HHV-6 血症の程度を単に反映しているようであった。以上の観察より、HHV-6 初感染は生後初めて認める発熱の50%以上に関わっているものと考えられた。本研究では、血中 HHV-6 DNA 陽性例を HHV-6 初感染として選別し、HHV-6 初感染における末梢血リンパ球サブセット比の特徴をさらに解析した。末梢血リンパ球サブセットの比率に関しては HHV-6 初感染者と非 HHV-6 感染例と酷似していたが、重要な所見として、HHV-6 初感染者でリンパ球サブセットの CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞やナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞において、早期活性化抗原の CD69 抗原の著明な発現がみられた。ことに、NK 細胞においてこのような CD69 抗原発現が顕著であった。本研究の検討より、HHV-6 初感染が日本において乳幼児に生後初めて発熱を来す主要な原因であることが示された。HHV-6 初感染は、不顕性感染、発疹を伴わない発熱、突発性発疹症を含め様々な臨床症状を呈する可能性がある。PCR 法による血液中 HHV-6 DNA の検出、血清抗 HHV-6 IgG 抗体価測定、あるいは NK 細胞における CD69 抗原発現の評価を補助的手段としたさらなる研究により、HHV-6 初感染の全体像が一層鮮明にされるであろう。

Key words human herpesvirus-6, primary infection, polymerase chain reaction, natural killer cells, CD69

乳幼児期にしばしばみられる突発性発疹症は、摂氏38度以上の高熱が2日から5日間の続き、急激に解熱し、解熱と共に全身的に小丘疹性ないし紅斑性の発疹の出現、治癒に至る比較的前後良好な熱性発疹症である¹⁾。突発性発疹症は臨床的観察より長い間ウイルス感染症を疑われてきたが、1988年 Yamanishi らの研究によりヒトヘルペスウイルス-6 (human herpesvirus-6, HHV-6) が突発性発疹症の原因ウイルスであることが証明された²⁾。HHV-6 は1986年米国においてヒト免疫不全症ウイルス感染者リンパ組織より新しいヘルペスウイルスとして分離され、当初Bリンパ球に親和性がある³⁾とされたが、

突発性発疹症患者リンパ球の培養実験よりむしろTリンパ球、とりわけCD4陽性ヘルパーT細胞がHHV-6の標的細胞であることが判明⁴⁾し、生体内では主として単球/マクロファージ系細胞に潜伏感染する可能性が指摘されている⁵⁾。血清学的検索により、HHV-6 初感染は主に生後6ヶ月から12ヶ月の乳幼児期に起き⁷⁻⁹⁾、多くの成人血清中に有意な量の抗 HHV-6 IgG 抗体が検出できることより、単純ヘルペス¹⁰⁾、水痘/帯状疱疹ウイルス¹⁰⁾、サイトメガロウイルス¹¹⁾、Epstein-Barr (EB) ウイルス¹²⁾等の他のヘルペスウイルスと同様に初感染後は生涯を通じて生体内に潜伏感染するものと考えられている。

平成6年12月16日受付、平成7年2月2日受理

Abbreviations: bp, base pair; EB, Epstein-Barr; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; HHV-6, human herpesvirus-6, mAb, monoclonal antibody; NK, natural killer; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin

血清学的診断¹⁹⁾, リンパ球培養による HHV-6 分離法の確立¹⁰⁾, PCR による DNA 診断の導入^{16)~17)}等, 比較的容易な HHV-6 感染の診断法の開発と相俟って, HHV-6 による初感染は, 突発性発疹症に留まらず, 乳幼児期にあって種々の臨床像を呈することが明らかになっている。つまり, 発疹を伴わない発熱¹⁸⁾に加え, 熱性痙攣¹⁹⁾, 腸重積²⁰⁾, 劇症肝炎²¹⁾²²⁾の原因となりうること, まれに脳脊髄炎²³⁾²⁴⁾を併発, けいれんや精神運動発達障害を残す例²⁴⁾の報告もみられる。より感度の高い PCR 法の改良に伴い, 健康成人の一部の唾液²⁵⁾²⁶⁾や血液中⁶⁾より HHV-6 DNA が検出され, 初感染後の HHV-6 再活性化が示唆されている。ことに, ヒト免疫不全症ウイルス感染者や臓器移植後免疫不全状態での HHV-6 の再活性化²⁷⁾²⁸⁾が臨床問題となっている。さらに, HHV-6 初感染や再活性化が, ウイルス関連血球貧血症候群²⁹⁾, ある種のリンパ球増殖性疾患^{30)~32)}, 単核球様疾患^{33)~35)}, 全身性紅斑性狼瘡やシェーグレン症候群といった膠原病³⁶⁾の病因との関係が指摘されている。

突発性発疹症例の詳細な研究より, 本症における HHV-6 血症は主として発疹出現前の発熱期にみられることが明らかとなっている。本研究では, 乳幼児期における突発性発疹症を含めた HHV-6 初感染の臨床的全体像を明らかにする一つの手掛かりを得る目的で, 生後初めて発熱を認めた乳幼児を対象に, PCR 法により患児末梢血液細胞における HHV-6 DNA の検出を試み, 臨床症状ならびに血中の抗 HHV-6 IgG 抗体価と比較検討した。加えて, 血液中の HHV-6 DNA の存在しない血中抗 HHV-6 IgG 抗体価の動きより HHV-6 初感染の診断のついた例について, 末梢血リンパ球サブセット比率, 各サブセットにおける早期活性化抗原としての CD69 抗原発現を検討, これらリンパ球サブセットの動態が HHV-6 初感染の補助的手段となりうるかを検討した。

対象および方法

I. 対象

対象は, 金沢大学医学部附属病院小児科または関連病院小児科に生後初めて 38.0℃ 以上の発熱を認め来院した乳幼児, 血液は保護者の承諾を得て採取した。対照として, 来院時発熱を有し過去に突発性発疹の既往のある 2 才の幼児, 健康診断目的に来院された発熱を認めない 2 才以上の幼児, 加えて健康成人コントロール, 感染対照として, 溶連菌感染症, 伝染性単核球症, 水痘, 流行性耳下腺炎, 手足口病症例を用いた。

II. DNA の抽出

静脈血は EDTA を抗凝固剤として 1ml 採取した。採取後すみやかに微量高速冷却遠心機 (トミー精工, 東京) にて, 4℃, 15,000rpm, 5 分間遠心, 血漿成分と血球成分に分離, 血漿成分

は抗 HHV-6 抗体測定用に -20℃ に凍結保存した。血球成分については, 4℃ に冷却した細胞溶解液 (0.32M 白糖, 1% トリトン X-100, 5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH7.5) を等量加え攪拌, 4℃, 15,000rpm において再度 5 分間の遠心を行い核分画を得た。得られた核分画は, 蒸留水に浮遊, さらに 200μg/ml のプロテナーゼ K (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CN, USA) を添加, DNA/RNA/プラスミド抽出システムモデル 341 (Perkin Elmer Cetus) を用い DNA を抽出, 得られた DNA は蒸留水 0.5ml に溶解した。

III. プライマーの作製

PCR 法に用いるプライマーは, Buchbinder ら³⁷⁾の塩基配列にならって DNA シンセサイザーモデル 391 (Perkin Elmer Cetus) を使用して合成した。NENSORB™ PREP (E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc., Boston, MA, USA) の使用説明書に従いトリチル基を除去した後, アンモニア処理を行い, ダイナミックミキサーモデル 811B (GILSON, Villierle Bel, France) カラム M&S パック C18 (エムエス機器, 大阪) を使用し, 移動相は A 液を 0.1M 酢酸トリエチルアミン緩衝液加 5% アセトニトリル, B 液を 0.1M 酢酸トリエチルアミン緩衝液加 60% アセトニトリルとして, 直線濃度勾配溶出法により精製した。合成したプライマーは HHV-6 の DNA のうち pZVH14 蛋白を構成する塩基配列の一部を増幅するものである。その塩基配列を表 1 に示す。このプライマーにより特異的に増幅される DNA 断片 (PCR 産物) の長さは 177 塩基対 (base pair, bp) である。

IV. PCR 法

PCR による DNA 断片の増幅には, 調整した DNA 0.5μg を鋳型 DNA として, 1μM の 5' 側および 3' 側の各プライマー 1 セット, 200μM の dATP, dCTP, dGTP, dTTP と 2.5 単位の Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus) を PCR 反応緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM 塩化カリウム, 1.0mM 塩化マグネシウム) に加え全量 100μl で行った。加熱による反応液の蒸散を防ぐため, 100μl のミネラルオイル (Sigma, St. Louis, MO, USA) を重層した。反応は DNA サーマルサイクラーモデル 480 (Perkin Elmer Cetus) を使用し, 熱変性は 94℃, 60秒, アニーリングは 58℃, 60秒, DNA 伸長は 72℃, 120秒とし, これを 1 サイクルとして, 40 サイクル繰り返した。

V. PCR 産物の検出

増幅された PCR 反応液に 10μl の泳動緩衝液 (0.25% ブロモフェノールブルー, 0.25% キシレンシアノール FF, 15% フィコール 400) を加え攪拌, その 10μl を 4.0% アガロースゲル (NuSieve 3:1 agarose, FMC corporation, Rockland, ME, USA) にて, 定電圧 50mV, 40分間, 電気泳動した。泳動後, エチジウムブロマイド染色を行い, 紫外線照射装置 (トランスイルミネーター) (フナコシ, 東京) で PCR 産物を観察した。

PCR の特異性を確認するために, 他の 5 種類のヘルペスウイルスである単純ヘルペス 1 型 (HF 株), 単純ヘルペス 2 型 (169株), 水痘/帯状疱疹ウイルス (河口株) (いずれも金沢大学がん研究所ウイルス部佐藤 博博士供与), EB ウィルス (Daudi 株), サイトメガロウイルス (Towne 株) (金沢大学がん研究所ウイルス部田中淳之博士供与) で感染した各々の細胞株培養上清を陰性コントロールとして, HHV-6 については藤田保健衛生大学小児科浅野善造博士より供与された FG106 株培養上清を使用, 比較検討した。図 1 にみられるように, 本研究で使用し

Table 1. Synthetic oligonucleotide primers for the detection of HHV-6 DNA

Primer	Sequences (5'-3')
P-1	TTACGATTTCTGCACCACCTCTCGC
P-2	GGGACCGTTATGTCATTGAGCATGTGC

Primers specific to HHV-6 were synthesized using an automatic DNA synthesizer. The sequences used for the primers were part of the pZVH14 sequence. The expected length of the amplified product was 177 base pairs.

たプライマーの組み合わせでは、HHV-6 以外のヘルペスウイルス感染細胞株培養上清からは、明らかな 177bp の PCR 産物を認めなかった。

VI. ヒト抗 HHV-6 IgG 抗体価の測定

血清ヒト抗 HHV-6 IgG 抗体価の測定は、HHV-6 感染リンパ芽球を用いた間接免疫蛍光抗体法で行なった。HHV-6 感染リンパ芽球細胞は、Asano らの方法¹⁴⁾に準じ、突発性発疹患者リンパ球を刺激培養して得た。つまり、6ヶ月の突発性発疹患児のヘパリン加静脈血より単核細胞を Ficoll-Hypaque 比重遠心法にて分離、10%非働化牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Flow Laboratories, McLean, VA, USA)、25mM HEPES、 5×10^{-5} M2-メルカプトエタノール、0.3mg/ml L-グルタミン、200U/ml ペニシリン、10 μ g/ml ゲンタマイシンを含む RPMI 1640 培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) に浮遊、100U/ml のヒトリコビナント IL-2 (塩野義製薬、大阪) と 0.1% フィトヘマグルチニン (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) と共に、7~10日間炭酸ガス培養器 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) にて培養、位相差顕微鏡下で多形性かつ風船様の細胞変性を来した巨細胞の出現を確認後、培養細胞を回収した。培養細胞の中の HHV-6 感染リンパ芽球細胞の存在は、HHV-6 に特異的なマウス単クローン抗体 (monoclonal antibody, mAb) (OHV-1)¹⁵⁾を用い、間接免疫蛍光抗体法で確認した。このようにして得た HHV-6 感染培養細胞は、0.1M 磷酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS, pH7.4) に再浮遊、12穴

HT コーティングスライド (CEL-LINE associates inc., New Field, NJ, USA) 上に浮遊細胞 10 μ l ずつ滴下、風乾、-20 $^{\circ}$ C に冷却したアセトンおよびメタノール (1:1) 混合液中で30分間固定、さらに PBS にて充分洗浄、抗 HHV-6 IgG 抗体測定に供した。血漿サンプルは、10倍希釈をスタートとして2段階希釈し、それらの 10 μ l をスライドにて塗布した HHV-6 感染培養細胞上に滴下、37 $^{\circ}$ C、30分間反応、PBS にて洗浄、続いて、2次抗体であるフルオレゼン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (5 μ g/ml, Tago Inc., Burlingame, CA, USA) 10 μ l と 37 $^{\circ}$ C、30分間反応、PBS にて洗浄、蛍光顕微鏡下にて HHV-6 感染細胞の蛍光染色を確認した。血漿サンプルの抗 HHV-6 IgG 抗体価は蛍光陽性細胞の観察される最大希釈倍数の逆数で表した。10倍以下を陰性と判定した。

VII. 免疫蛍光染色によるリンパ球サブセットの解析

リンパ球サブセット比率および各サブセットにおける早期活性化抗原 CD69 抗原発現を評価するために、EDTA 加静脈血 1ml を 0.83% 塩化アンモニウム溶液にて溶血、細胞を PBS にて再浮遊、二重標識免疫蛍光染色を行い、フローサイトメーター Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic Systems, K. K., 東京) を用いて解析した。各リンパ球サブセットの同定には FITC 標識各種 mAb [抗 Leu-3a (CD4), 抗 Leu-2a (CD8), OKNK (CD16), 抗 Leu-16 (CD20)] を使用、各サブセットの CD69 抗原発現はフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗 Leu-23 (抗 CD69) mAb を用いた。これら mAb のうち OKNK は Ortho Diagnostic Systems Inc. (Raritan, NJ, USA),

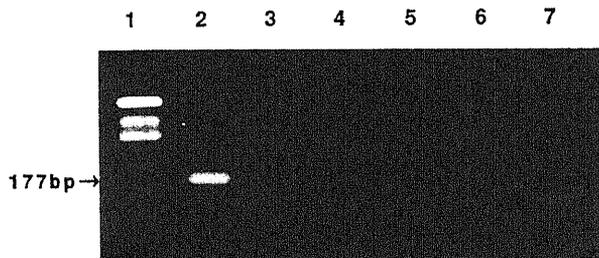


Fig. 1. Specific detection of HHV-6 DNA by PCR. The specificity of the synthetic primers for HHV-6 was determined by PCR. Supernatant samples from various cell lines were amplified by PCR using the oligonucleotide primers for HHV-6. Presence of 177 base pair product was examined by direct gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Lane 1 denotes molecular weight markers (ϕ X 174/*Hinf* I digest). Lanes 2 to 7 are HHV-6, HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, and CMV, respectively.

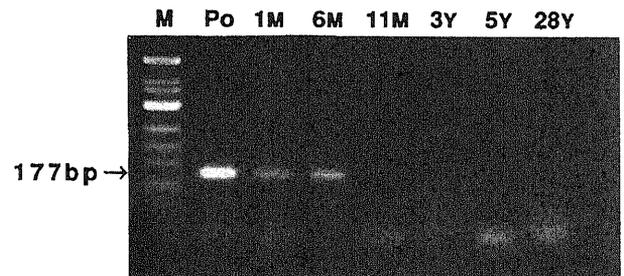


Fig. 2. Detection of HHV-6 DNA in peripheral blood from children with first febrile episodes after birth. M denotes molecular weight markers and Po denotes positive control. 1M, 6M, 11M, 3Y, 5Y, and 28Y denote the ages of the patients (1 months, 6 months, 11 months, 3 years, 5 years and 28 years, respectively).

Table 2. PCR detection of HHV-6 DNA in blood samples

Subjects	Number of cases tested	Number (%) of HHV-6 DNA-positive cases
Infants with the first febrile episode after birth	98	40(41)
Febrile control children ^{a)}	24	0(0)
Afebrile control children ^{a)}	25	0(0)
Healthy adults ^{a)}	20	0(0)

Peripheral blood samples from different groups were examined for the presence of HHV-6 DNA by PCR.

^{a)} Control children and adults had experienced exanthema subitum previously.

他は Becton Dickinson Immunocytometry Systems (CA, USA) より購入した。細胞の免疫染色は、4℃, 30分間施行, 洗浄は 3% FBS および 0.1% アジ化ナトリウムを含む PBS でおこなった。

Ⅷ. 有意差検定

統計的有意差検定は chi-square 試験にて行った。

成 績

Ⅰ. PCR 法による血液中 HHV-6 DNA 検出

PCR 法で、解析した一例を図 2 に示す。重要なことは、エチジウムブロマイド染色にて検出可能な PCR 産物は生後初めて発熱を認めた乳幼児症例血液サンプルのみにみられたことであ

Table 3. Changes of anti-HHV-6 antibody titers during convalescence of the first febrile episodes after birth

Febrile children	Number of cases tested	Number of cases	
		Change in anti-HHV-6 IgG antibody	
		Rised	Not changed
HHV-6-positive	8	8(4)*	0(0)
HHV-6-negative	13	3(1)	10(0)
Total	21	11(5)	10(0)

Anti-HHV-6 antibody titers were examined during acute febrile period and two weeks after defervescence. A rise in the antibody titer was defined as the rise greater than four-fold.
* Numbers in parentheses indicate the cases with postfebrile rash.

Table 4. Clinical characteristics of HHV-6-positive and HHV-6-negative children with the first febrile episodes after birth

HHV-6 infection ¹⁾	Number of cases examined	Number (%) of cases with			
		Postfebrile rash	Cough or rhinorrhea	Diarrhea	Lymphadenopathy
Positive	40	26(65)	22(55)	23(58)	13(33)
Negative	58	8(14)	33(57)	12(21)	5(9)

¹⁾Based on PCR results
* p<0.001 by chi-square test.

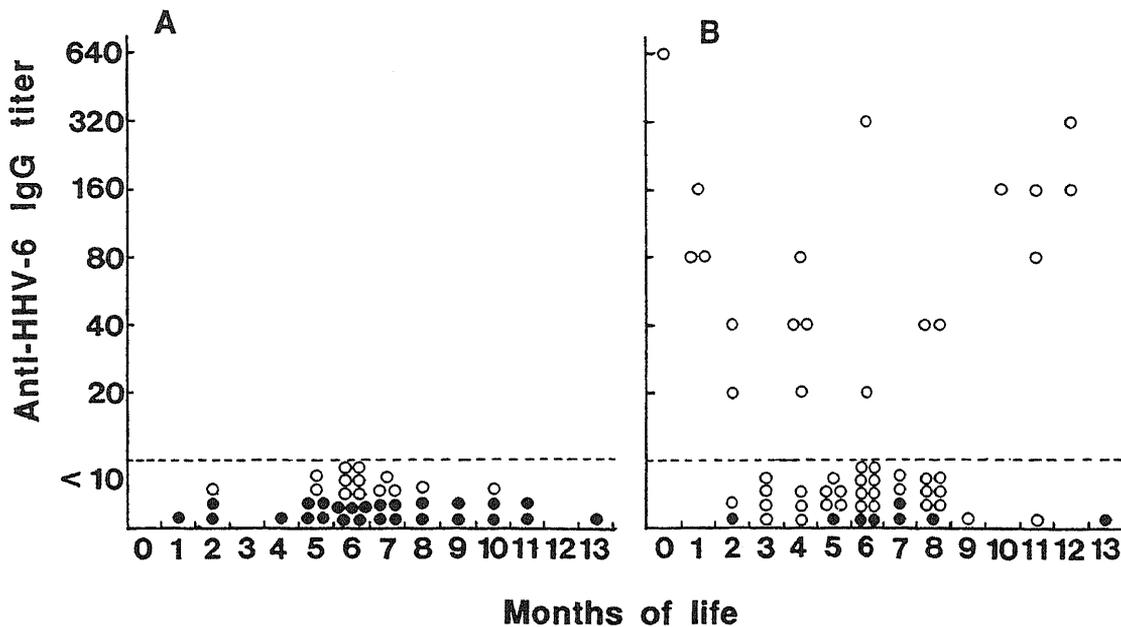


Fig. 3. Plasma levels of anti-HHV-6 IgG antibody titers in patients with the first febrile episodes after birth. Titers of anti-HHV-6 were compared between HHV-6-DNA positive (A) and HHV-6-DNA negative (B) groups. Anti HHV-6 titers were determined by indirect immunofluorescence using HHV-6 infected lymphocytes. Closed circles indicate the patient with rash and open circles indicate the patients without rash.

る。以上の方法により検討すると、生後初めて発熱を認めた乳幼児98例中40例、約41%にHHV-6 DNA陽性例がみられた。他方、HHV-6初感染の既往があると推測される健康成人コントロールのみならず、2才以上の小児対照でも有熱、無熱に関わらずHHV-6 DNAは検出できなかった(表2)。

Ⅱ. 血液中HHV-6 DNAと抗HHV-6 IgG抗体価の関係
乳幼児期のHHV-6初感染は母体由来のHHV-6に対するIgG抗体の消退後に起きるものと考えられる。そこで、生後初めて発熱をみた乳幼児について、血中HHV-6 DNAの検出の有無と抗HHV-6 IgG抗体価との関係を比較検討した(図3)。当

Table 5. Clinical characteristics of HHV-6-positive and HHV-6-negative children with postfebrile rashes

HHV-6 infection ^d	Number of cases examined	Number (%) of cases with		
		Cough or rhinorrhea	Diarrhea	Lymphadenopathy
Positive	26	15(58)	17(65)	11(42)
Negative	8	2(25)	4(50)	1(13)

Table 6. Distribution of lymphocyte subpopulations in infants with the first febrile episodes

Subjects	Number of subjects examined	CD4	CD8	CD16	CD20
Age-matched control	15	52.0±4.9	15.2±4.2	8.1±2.8	16.7±5.4
First fever without HHV-6 infection	8	57.4±4.1	13.3±8.7	8.5±3.8	15.1±3.6
First fever with HHV-6 infection	12	51.6±7.9	13.5±10.0	10.5±6.3	14.2±7.8
Non-HHV-6 infection	11	30.0±12.4	36.0±17.0	12.3±7.0	11.4±5.8

The study group consisted of 20 children who experienced fever higher than 38°C for the first time after birth. The patients with first febrile episodes were further divided into two groups, with or without HHV-6 infection, based on PCR results. Fifteen children without fever served as age-matched controls. Eleven cases of infection control consisted of patients with other infectious diseases, such as mumps, rubella, varicella, infectious mononucleosis, coxsackieviral infection, bacterial pneumonia, and streptococcal infections.

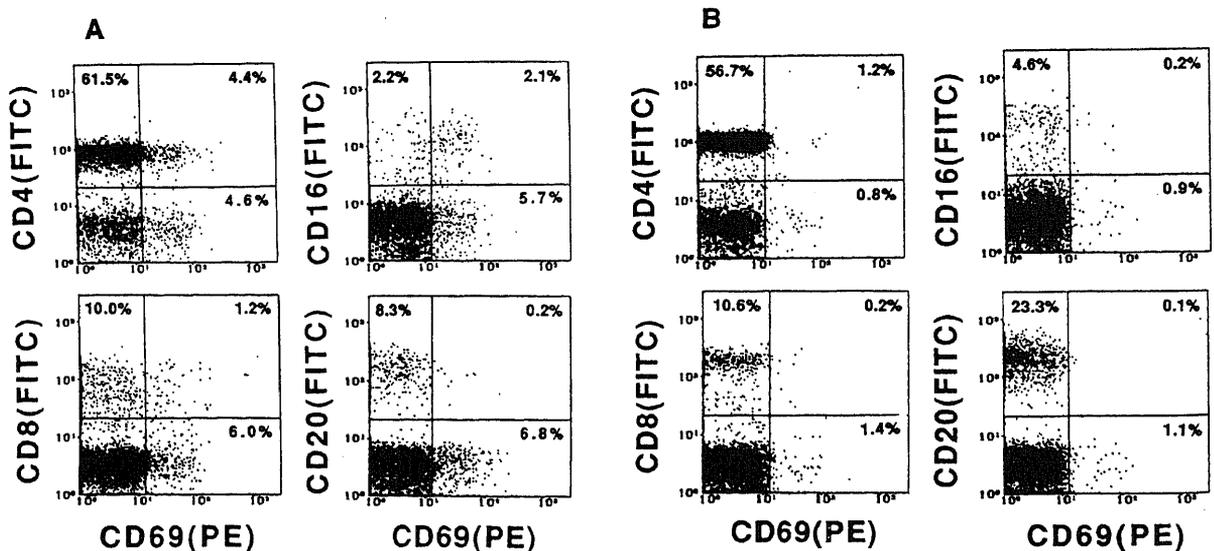


Fig. 4. Expression of CD69 on various lymphocyte subpopulations. Expression of an early activation antigen, CD69, was examined by two-color immunofluorescence. Representative staining patterns of peripheral blood mononuclear cells from patients with HHV-6 infection (A) and other viral infection (B) were compared using Cytoron Absolute flowcytometer.

然ながら、血中 HHV-6 DNA 陽性者は、全例、抗 HHV-6 IgG 抗体は陰性であった。血中 HHV-6 DNA 陽性者は月齢が5ヶ月を越えた児に多かったが、3ヶ月未満の乳児にも HHV-6 DNA 陽性例がみられた。他方、HHV-6 DNA 陰性者では、かなりの例で有意なレベルの抗 HHV-6 IgG 抗体がみられた。このような高い抗 HHV-6 IgG 抗体価を有する乳幼児については、3ヶ月以下では抗 HHV-6 IgG 抗体は母体由来のものを示し、8ヶ月以上の例ではすでに無症状に HHV-6 初感染を経過した可能性がある。

図3に示すごとく、解熱後発疹が出現するという突発性発疹症に特徴的な臨床経過をとった例は、血中 HHV-6 DNA 陽性者のみならず陰性者にもみられた。しかも、解熱後発疹をみた乳幼児は、全例、抗 HHV-6 IgG 抗体が感度以下であった。このことは、PCR 法によっても HHV-6 初感染の一部の例で血液中 HHV-6 DNA を検出できない場合があることを示した。HHV-6 初感染の真の診断は、回復期での抗 HHV-6 IgG 抗体価の上昇で確認できよう。本研究で、生後初めて発熱を認めた一部(21例)で、急性期と回復期のペア血清を入手できたので、それらについて血中 HHV-6 DNA と抗 HHV-6 IgG 抗体の動きを比較した(表3)。血液中に HHV-6 DNA の検出できた8例全てに抗 HHV-6 IgG 抗体の上昇がみられた。他方、血中 HHV-6 DNA 陰性者13名のうち3例(1名が解熱後発疹をみた)に、同様な抗 HHV-6 IgG 抗体の上昇が観察された。

Ⅲ. 血液中 HHV-6 DNA と臨床症状の関係

PCR 法による血液中 HHV-6 DNA の検出の有無は、HHV-6 初感染における HHV-6 血症のウイルス価と関係するものと推測される。HHV-6 血症の程度が臨床症状に反映する可能性はある。次に、血液中 HHV-6 DNA の検出の有無と臨床症状を比較検討した(表4)。突発性発疹症では、臨床的にリンパ節腫大や下痢等の症状をしばしば経験されるが、このような症状は血液中 HHV-6 DNA 陽性者で有意に観察された。呼吸器症状は血中 HHV-6 DNA 陽性者と陰性者の間で明らかな相違はみられなかった。解熱後発疹は血中 HHV-6 DNA 陽性者の

65%、HHV-6 DNA 陰性者の14%にみられた。上記の検討からも、発疹例は血中 HHV-6 DNA の有無に関わらず、HHV-6 初感染を示唆されるが、両者間にはリンパ節腫大、下痢、呼吸器症状等の臨床症状の違いはみられなかった(表5)。

Ⅳ. リンパ球サブセットの変動と CD69 抗原発現

上記の結果をもとに、生後初めて発熱を来たした乳幼児のうち血中 HHV-6 DNA が検出された場合を HHV-6 初感染の確診例、一方抗 HHV-6 IgG 抗体陽性例を非 HHV-6 感染例として選別、末梢血における CD4 陽性ヘルパー T 細胞、CD8 陽性サブレッサー T 細胞、CD16 陽性ナチュラルキラー (natural

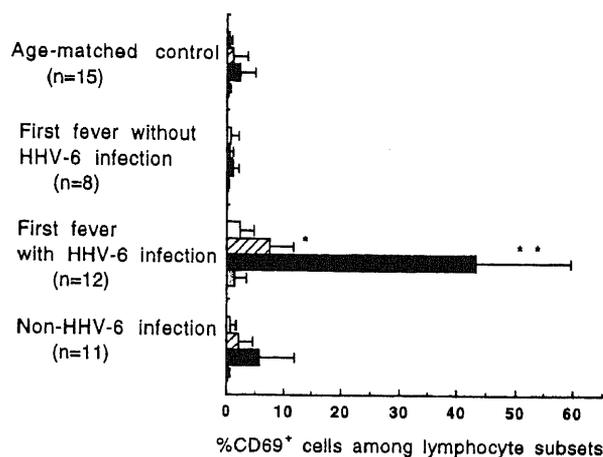


Fig. 5. Comparison of CD69 expression on various lymphocyte subpopulations in different groups. Expression of CD69 on CD4 (□), CD8 (▨), CD16 (■), and CD20 (▩) was examined and the percentages of the CD69⁺ cells within each subpopulation were quantitated by flowcytometry. Healthy, afebrile children served as age-matched control. Infection control consisted infections other than HHV-6 such as, mumps, rubella, varicella, infectious mononucleosis, hand, coxsackieviral infection, bacterial pneumonia, and streptococcal infection. *, $7.6 \pm 4.0\%$; **, 43.2 ± 16.2 .

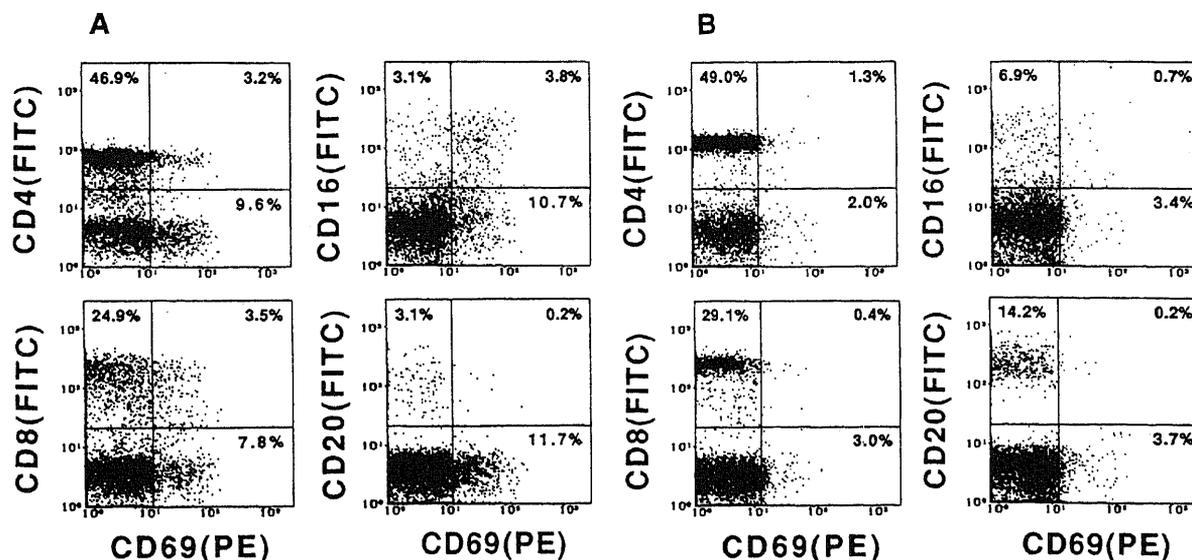


Fig. 6. CD69 expression during acute phase (A) and convalescence (B) of a representative case of primary HHV-6 infection. Expression of CD69 on different lymphocyte subpopulations was compared between acute and convalescent phases of HHV-6 infection.

killer, NK) 細胞, CD20 陽性 B 細胞の比率を比較した。しかしながら、これらリンパ球の比率については、HHV-6 初感染者および非 HHV-6 感染者、いずれも、正常コントロールと大きな差は認められなかった (表 6)。

更に、本研究では、各サブセットにおける早期活性化抗原 CD69 抗原の発現が HHV-6 初感染の指標となりうるか、二重標識免疫蛍光法を用いたフローサイトメトリー解析でさらに検討した。通常、正常人リンパ球では CD69 発現がみられない。興味あることに、HHV-6 初感染例ではリンパ球サブセットにおける著明な CD69 発現が観察された (図 4)。このようなリンパ球サブセットの CD69 発現は非 HHV-6 感染例でみられなかった。HHV-6 初感染例でのリンパ球サブセットの CD69 発現は、CD4 陽性 T 細胞のみならず CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞にもみられた。図 5 に示すごとく、CD4 陽性 T 細胞の CD69 発現は統計的には正常者と有意な違いは認めなかったが、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞の CD69 発現の程度は正常者や非 HHV-6 感染と比べて際だっていた。ことに、NK 細胞における CD69 発現が顕著であった。急性期と回復期サンプルをともに検索できた 1 例を図 6 に示す。本例の回復期サンプルは解熱後発疹出現 2 日目のもので、HHV-6 初感染におけるリンパ球の CD69 発現は発熱を呈示する急性期にのみみられるようである。

考 察

生後間もない乳幼児は、母親から経胎盤的に児に移行した母体由来の IgG 抗体の恩恵により、種々の病原微生物の感染の危険から免れているが、母体由来 IgG はその半減期 (約 20 日) に則り血液中より消失、児の月齢につれ様々なウイルスや細菌による感染の機会が増すこととなる。Huang らは 3 種類のヒトヘルペスウイルスのサイトメガロウイルス、EB ウイルスと HHV-6 に対する血清抗体の小児期の推移を調べ、それぞれのヘルペスウイルスの初感染が生後どのような時期に起きるかを検討した²⁰⁾。Huang らは、サイトメガロウイルスの初感染は生後早期より始まるが、EB ウイルスと HHV-6 初感染は母体由来 IgG 抗体の消滅する生後 6 ヶ月から 12 ヶ月をピークとして起きることを示した。EB ウイルス初感染はまれに発熱、リンパ節腫脹、扁桃炎を主徴とする伝染性単核症を来す⁴⁾ が、大部分の小児にあって無症状で経過する不顕性感染である。他方、HHV-6 初感染像の一つとしての突発性発疹症は多くの乳幼児が経験することはよく知られていることである。したがって、発疹を伴わない発熱を含め、かなりの割合の乳幼児で HHV-6 初感染が生後初めての発熱の原因となるものと予想される。

本研究では、PCR 法による血液中 HHV-6 DNA の検出の有無をもとに、HHV-6 初感染が乳幼児の生後初めて認める発熱にいかに関与するかを検討した。PCR 法には、潜伏感染した生体サンプル中の少量の HHV-6 DNA の存在をより鋭敏に検出するために、異なる 2 種類のプライマーを用いた 2 段階 PCR 法の開発や PCR 産物をさらにサザンブロットハイブリダイゼーションを行う等の工夫がなされている^{15)~17)}。これら高感度の PCR 法では、健康人に潜伏感染する少数の HHV-6 をも増幅する可能性がある。事実、このような方法で、健康成人の血液⁶⁾や唾液²⁵⁾²⁶⁾に HHV-6 DNA の存在が指摘されている。本研究では、HHV-6 初感染時の HHV-6 血症と潜伏感染とを分別す

るために、あえて血液細胞より得た DNA を 1 種類のプライマーにて増幅し、PCR 産物はエチジウムブロマイド染色のみで判定するという、いわば感度の劣る PCR 法により、HHV-6 初感染急性期にみられる HHV-6 血症を潜伏感染と区別して評価できることを明らかにした。この点に関して、Kondo らも PCR 産物のエチジウムブロマイド染色では、血中 HHV-6 DNA の検出は突発性発疹症急性期に限られることを報告している¹⁶⁾。HHV-6 初感染急性期にみられる HHV-6 血症の診断に関して、本研究で用いた PCR 法の妥当性は、血中 HHV-6 DNA の検出が生後初めて発熱を認めた乳幼児にのみ見いだされたこと、他方、突発性発疹症の既往のある健康成人や小児でみられなかったことより、明らかである。ペア血清での抗 HHV-6 IgG 抗体の上昇によって、HHV-6 初感染のより正確な診断ができる。ここでは、一部の症例でペア血清を入手できたが、検討できた血中 HHV-6 DNA 陽性者全例に抗 HHV-6 IgG 抗体価の上昇が確認され、血中 HHV-6 DNA 陽性例は全て HHV-6 初感染と考えることができる。PCR 法による血中 HHV-6 DNA 検出結果より、生後初めて発熱を来すエピソードの少なくとも 40% には HHV-6 初感染が関与することが推測された。このうち約 65% に突発性発疹症としての解熱後発疹がみられ、HHV-6 初感染には発疹を伴わない発熱のみで経過する例のあることも明らかとなった。血中 HHV-6 DNA 陽性者と異なり、血中 HHV-6 DNA 陰性者の中に抗 HHV-6 IgG 抗体の保有する例がみられた。3 ヶ月未満児では母体由来の抗 HHV-6 IgG 抗体の存在を示し、8 ヶ月以上の幼児は過去すでに無症状に HHV-6 初感染を経験している不顕性感染例と考えられる。これらは、他のウイルス感染などの要因で生後初めて発熱をみたものと推測された。血中 HHV-6 DNA 陰性者のかなりの例で、抗 HHV-6 IgG 抗体の検出されない場合がみられ、しかも、一部に突発性発疹症に典型的な解熱後発疹を来した例があった。これらのケースは、回復期での抗 HHV-6 IgG 抗体価の上昇を伴い、HHV-6 初感染と考えられた。HHV-6 初感染例で血中 HHV-6 DNA 陽性者と陰性者の間にはリンパ節腫大、消化器症状、呼吸器症状といった付随する症状について大きな差異はなく、血中 HHV-6 DNA の検出の有無は、HHV-6 血症の程度の違いを反映したものと考えられる。

本研究の検討より、少なくとも日本においては乳幼児が生後初めて経験する発熱のエピソードの 50% 以上が HHV-6 初感染に起因するものと考えられた。最近の研究によれば、HHV-6 初感染の感染経路は唾液腺に潜伏感染したウイルスの飛沫感染²⁵⁾²⁶⁾によることが指摘されている。母体由来抗 HHV-6 抗体の消失する 6 ヶ月前後の乳幼児が、その時期に家族からの飛沫感染に曝されるものと推測される。したがって、HHV-6 初感染の機会は偏に母体の抗 HHV-6 抗体価に依存する。事実、本研究でも生後 1 ヶ月未満児に解熱後発疹を含めた HHV-6 初感染例を認めた。米国の Hall らは、救急外来を訪れた 2 才以下の小児例を詳細に検討、その約 20% が HHV-6 感染に起因することを報告した⁴⁾。HHV-6 初感染の時期について人種間の相違が興味のもたれるところであるが、HHV-6 感染が生後初めて認める発熱の原因としていかに関わるかを検討した研究は、国内外問わずみられない。

HHV-6 は CD4 陽性ヘルパー T 細胞等のリンパ球を標的細胞として感染することが明らかとなっているが、HHV-6 初感染時における末梢血リンパ球サブセットの比率の特徴についての

報告はみられない。本研究では、臨床的に手軽なフローサイトメトリーによるリンパ球サブセット検査が HHV-6 初感染の補助的診断の手段となりうるかを検討した。しかしながら、生後初めた発熱を認めた HHV-6 初感染例のリンパ球サブセット比は、正常小児コントロールのみならず非 HHV-6 感染例と大きな違いはみられなかった。HHV-6 がリンパ球を標的細胞とすることより、HHV-6 血症のみられる HHV-6 初感染急性期末梢血リンパ球が HHV-6 からの影響を受ける可能性は充分にある。従来よりリンパ球の活性化の指標として HLA-DR 抗原発現が用いられているが⁴²⁾、本研究では早期活性化抗原としての CD69 抗原に着目した。NK 細胞を含めた全てのリンパ球が活性化された時に一過性に発現する機能的早期活性化抗原として注目されている^{43,44)} CD69 抗原について、HHV-6 初感染におけるリンパ球サブセットの CD69 抗原発現をさらに検討した。重要なことには、リンパ球サブセットの CD69 抗原発現は非 HHV-6 感染ではさほど顕著でなかったが、HHV-6 初感染例では、CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞のみならず、NK 細胞においても著明な CD69 抗原発現がみられた。とりわけ、NK 細胞の CD69 抗原発現が際だっていた。最近の培養実験より、NK 細胞が HHV-6 の標的細胞になりうる事が明らかにされている⁴⁵⁾。NK 細胞の CD69 発現は、生体における NK 細胞の HHV-6 感染の一プロセスを示すのか、HHV-6 初感染時に血液中に遊離されるある種のサイトカインの NK 細胞への影響を表すのか、今後の研究課題である。いずれにせよ、NK 細胞における CD69 発現を評価することは、他のリンパ球サブセットの CD69 発現と合わせて、HHV-6 初感染の補助的診断として有用と考えられる。

本研究では、HHV-6 初感染が生後初めての発熱を来す主要な原因ウイルスであることを明らかにしたが、乳幼児期の HHV-6 初感染は不顕性感染、発疹を伴わない発熱、突発性発疹症等の他、多くの未知の臨床像を呈する可能性がある。HHV-6 初感染の診断的手段としての PCR 法による DNA 診断や血清抗体測定に加えて、リンパ球サブセットの CD69 抗原発現の同定を補助の手立てとして、綿密な観察と症例の積み重ねにより、HHV-6 初感染の臨床的全体像が一層鮮明にされるものと期待される。

結 論

HHV-6 初感染の臨床像を明らかにするために、生後初めて発熱を認めた乳幼児を対象に、PCR 法による血液中 HHV-6 DNA の検出、抗 HHV-6 IgG 抗体測定、加えてリンパ球サブセットの変動を検討し、以下の結果を得た。

1. 血液細胞より得た DNA の PCR 産物をエチジウムブロマイド染色にて判定したところ、血中 HHV-6 DNA は生後初めて発熱を認めた乳幼児の約 40% に検出され、その約 65% に突発性発疹症に典型的な解熱後発疹がみられた。他方、突発性発疹症の既往のある健康成人のみならず小児対照でも有熱、無熱に関わらず血中 HHV-6 DNA は検出されなかった。

2. 血中 HHV-6 DNA 陽性者は抗 HHV-6 IgG 抗体が全例検出されず、ベア血清の検討からも、HHV-6 初感染と考えられた。血中 HHV-6 DNA 陰性者では抗 HHV-6 IgG 抗体を有する例がみられたが、一部に抗 HHV-6 IgG 抗体が陰性で、解熱後発疹や回復期に抗 HHV-6 IgG 抗体の上昇をみる HHV-6 初感染例が含まれていた。

3. HHV-6 初感染と考えられる血中 HHV-6 DNA 陽性者と陰性者の間には、リンパ節腫大、消化器症状、呼吸器症状等の随伴症状の違いはなく、血中 HHV-6 DNA の検出の有無は、HHV-6 初感染急性期にみられる HHV-6 血症の程度と関係するものと考えられた。

4. 血中 HHV-6 DNA 陽性者を HHV-6 初感染として、リンパ球サブセットを検索したが、リンパ球サブセット比に関して非 HHV-6 感染例と大きな違いは観察されなかったが、HHV-6 初感染でリンパ球サブセット、とりわけ NK 細胞における早期活性化抗原である CD69 抗原発現が顕著であった。

以上より、乳幼児に生後初めて認める発熱の半数以上は HHV-6 初感染に起因することが明らかになった。HHV-6 初感染の診断には、PCR 法による DNA 診断や血清抗体測定に加えて、リンパ球サブセットの CD69 抗原発現を評価することが有用であることが示された。これらをもとに、HHV-6 初感染が乳幼児に及ぼす臨床的全体像がさらに明らかにされるものと期待される。

謝 辞

稿を終えるに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科学講座谷口 昂教授に深甚なる感謝の意を表します。終始、接の御教示、御指導頂きました宮脇利男講師、協力頂いた小児科第 7 研究室の皆様へ深謝いたします。さらに、貴重な細胞を提供頂いた JCRB 細胞バンク、各種ウイルスを提供頂いた藤田保健衛生大学小児科浅野善造博士、富山医科薬科大学医学部ウイルス学教室白木公康教授、大阪大学微生物病研究所奥野寿臣先生、筑波大学臨床医学系小児科須崎亮先生、金沢大学がん研究所ウイルス部門の皆様、ならびに臨床検体を提供頂いた西田直己先生、渡辺礼二先生、横井 透先生に深く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第 24 回日本小児感染症学会(高知)にて発表、小児感染症学会誌(小児感染免疫, 5, 123-126, 1993)に推薦論文として掲載された。

文 献

- 1) Cherry, J. D.: Roseola infantum (Exanthem Subitum). In R. D. Feigin & J. D. Cherry (eds.), Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 2nd ed., p1842-1845. W. B. Saunders, Philadelphia, 1987.
- 2) Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. & Kurata, T.: Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. Lancet, 1, 1065-1067 (1988).
- 3) Salahuddin, S. Z., Ablashi, D. V., Markham, P. D., Josephs, S. F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B. & Gallo, R. C.: Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. Science, 234, 596-601 (1986).
- 4) Josephs, S. F., Salahuddin, S. Z., Ablashi, D. V., Schachter, F., Wong-Staal, F. & Gallo, R. C.: Genomic analysis of human B-lymphotropic virus (HBLV). Science, 234, 601-603 (1986).
- 5) Takahashi, K., Sonoda, S., Higashi, K., Kondo, K., Takahashi, H., Takahashi, M. & Yamanishi, K.: Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus-6-related virus. J. Virol., 63, 3161-3163 (1989).

- 6) Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M. & Yamanishi, K.: Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J. Gener. Virol.*, **72**, 1401-1408 (1991).
- 7) Ueda, K., Kusuhara, K., Hirose, M., Okada, K., Miyazaki, C., Tokugawa, K., Nakahama, M. & Yamanishi, K.: Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus-6. *J. Infect. Dis.*, **159**, 750-752 (1989).
- 8) Okuno, T., Takahashi, K., Balachandra, K., Shiraki, K., Yamanishi, K., Takahashi, M. & Baba, K.: Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 651-653 (1989).
- 9) Huang, L. M., Lee, C. Y., Chen, J. Y., Yang, C. S., Wang, J. W., Chang, M. H., Hsu, C. Y. & Kuo, P. F.: Primary human herpesvirus 6 infection in children: a prospective serologic study. *J. Infect. Dis.*, **165**, 1163-1164 (1992).
- 10) Straus, S. E.: Clinical and biological differences between recurrent herpes simplex virus and varicella-zoster virus infection. *JAMA*, **262**, 3455-3458 (1989).
- 11) Toorkey, C. B. & Carrigan, D. R.: Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues. *J. Infect. Dis.*, **160**, 741-751 (1989).
- 12) Kikuta, H., Taguchi, Y., Tomizawa, K., Kojima, K., Kawamura, N., Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Matsumoto, S., Imai, S., Kinoshita, T., Koizumi, S., Osato, T., Kobayashi, I., Mamada, I. & Hirai, K.: Epstein-Barr virus genomic-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature*, **333**, 455-457 (1988).
- 13) Couillard, M., Joly, J. R., Deschenes, L. & Richer, G.: Evaluation of variables in immunofluorescence procedures for the detection of antibodies against human herpesvirus 6 (HHV-6). *Virology*, **15**, 313-320 (1992).
- 14) Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Yazaki, T., Hata, T., Nagai, T., Kajita, Y., Ozaki, T. & Yoshida, S.: Viremia and neutralizing antibody response in infants with exanthem subitum. *J. Pediatr.*, **114**, 535-539 (1989).
- 15) Cuendem, J. I., Ruiz, J., Civeria, M. P. & Prieto, J.: High prevalence of HHV-6 DNA in peripheral blood mononuclear cells of healthy individual detected by nested-PCR. *J. Medic. Virol.*, **43**, 115-118 (1994).
- 16) Kondo, K., Hayakawa, Y., Mori, H., Sato, S., Kondo, T., Takahashi, K., Minamishima, Y., Takahashi, M. & Yamanishi, K.: Detection by polymerase chain reaction amplification of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood of patients with exanthem subitum. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 970-974 (1990).
- 17) Aubin, J. T., Collandre, H., Candotti, D., Ingrand, D., Rouzioux, C., Burgard, M., Richard, S., Huraux, J. M. & Agut, H.: Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by southern blotting and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 367-372 (1991).
- 18) Suga, S., Yoshikawa, T., Asano, Y., Yazaki, T. & Hirata, S.: Human herpesvirus-6 infection (exanthem subitum) without rash. *Pediatr.*, **83**, 1003-1006 (1989).
- 19) Asano, Y., Nakashima, T., Yoshikawa, T., Suga, S. & Yazaki, T.: Severity of human herpesvirus-6 viremia and clinical findings in infants with exanthem subitum. *J. Pediatr.*, **118**, 891-895 (1991).
- 20) Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Hata, T., Yamazaki, T. & Yazaki, T.: Simultaneous occurrence of human herpesvirus 6 infection and intussusception in three infants. *Pediatr. Infect. Dis. j.*, **10**, 335-337 (1991).
- 21) Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Yazaki, T., Kondo, K. & Yamanishi, K.: Fatal fulminant hepatitis in an infant with human herpesvirus-6 infection. *Lancet.*, **335**, 862-863 (1990).
- 22) Miyazaki, H., Hirano, M., Suga, S. & Asano, Y.: Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. *N. Engl. J. Med.*, **324**, 1290 (1991).
- 23) Irving, W. L., Chang, J., Raymond, D. R., Dunstan, R., Smith, P. G. & Cunningham, A. L.: Roseola infantum and other syndromes associated with acute HHV6 infection. *Archiv. Dis. Child.*, **65**, 1297-1300 (1990).
- 24) Yoshikawa, T., Nakashima, T., Suga, S., Asano, Y., Yazaki, T., Kimura, H., Morishima, T., Kondo, K. & Yamanishi, K.: Human herpesvirus-6 DNA in cerebrospinal fluid of a child with exanthem subitum and meningoencephalitis. *Pediatr.*, **89**, 888-890 (1992).
- 25) Fox, J. D., Briggs, M., Ward, P. A. & Tedder, R. S.: Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet*, **336**, 590-593 (1990).
- 26) Krueger, G. R. F., Wassermann, K., DeClerck, L. S., Stevens, W. J., Bourgeois, N., Ablashi, D. V., Josephs, S. F. & Balachandran, N.: Latent herpesvirus-6 in salivary and bronchial glands. *Lancet*, **336**, 1255-1256 (1990).
- 27) Yoshikawa, T., Suga, S., Asano, Y., Nakashima, T., Yazaki, T., Ono, Y., Fujita, T., Tsuzuki, K., Sugiyama, S. & Oshima, S.: A prospective study of human herpesvirus-6 infection in renal transplantation. *Transplantation*, **54**, 879-883 (1992).
- 28) Drobyski, W. R., Dunne, W. M., Burd, E. M., Knox, K. K., Ash, R. C., Horowitz, M. M., Flomenberg, N. & Carrigan, D. R.: 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 (1993).
- 29) Huang, L. M., Lee, C. Y., Lin, K. H., Chuu, W. M., Lee, P. I., Chen, R. L., Chen, J. M. & Lin, D. T.: Human herpesvirus 6 associated with fatal haemophagocytic syndrome. *Lancet*, **336**, 60-61 (1990).
- 30) Jarret, R. F., Gledhill, S. & Qureshi, F.: Identification of human herpesvirus-6 specific DNA sequences in two patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, **2**, 296-302 (1991).

- (1988).
- 31) Eizuru, Y., Minematsu, T., Minamishima, Y., Kikuchi, M., Yamanishi, K., Takahashi, M. & Kurata, T.: Human herpesvirus 6 in lymph nodes. *Lancet*, 1, 40 (1989).
- 32) Levine, P. H., Jahan, N., Murari, P., Manak, M. & Jaffe, E. S.: Detection of human herpesvirus 6 in tissues involved by sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai-Dorfman disease). *J. Infect. Dis.*, 166, 291-295 (1992).
- 33) Linde, A., Dahl, H., Wahren, B., Fridell, E., Salahuddin, S. & Biberfeld, P.: IgG antibodies to human herpesvirus-6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*, 21, 117-123 (1988).
- 34) Irving, W. I., Ratnamohan, M., Hueston, L. C., Chapman, J. R. & Cuningham, A. L.: Dual antibody rises to cytomegalovirus and human herpesvirus-6: frequency of occurrence in CMV infections and evidence for genuine reactivity to both viruses. *J. Infect. Dis.*, 161, 910-916 (1990).
- 35) Linde, A., Fridell, E., Dahl, H., Andersson, J., Biberfeld, P. & Wahren, B.: Effect of primary Epstein-Barr virus infection on human herpesvirus 6, cytomegalovirus, and measles virus immunoglobulin titers. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 211-215 (1990).
- 36) Levy, J. A., Ferro, F., Greenspan, D. & Lennette, E. T.: Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population. *Lancet*, 335, 1047-1050 (1990).
- 37) Buchbinder, A., Josephs, S. F., Ablashi, D., Salahuddin, S. Z., Klotman, M. E., Manak, M., Krueger, G. R. F., Wong-Staal, F. & Gallo, R. C.: Polymerase chain reaction amplification and in situ hybridization for the detection of human B-lymphotropic virus. *J. Virol. Methods*, 21, 191-197 (1988).
- 38) Okurto, T., Shao, H., Asada, H., Shiraki, K., Takahashi, M. & Yamanishi, K.: Analysis of human herpesvirus 6 glycoproteins recognized by monoclonal antibody OHV1. *J. Gen. Virol.*, 73, 443-447 (1992).
- 39) Huang, L. M., Lee, C. Y., Chang, M. H., Wang, J. D. & Hsu, C. Y.: Primary infections of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus-6. *Arch. Dis. Child.*, 68, 408-411 (1993).
- 40) Brown, N. A.: The Epstein-Barr virus (Infectious Mononucleosis, B-lymphoproliferative disorders). In R. D. Feigin & J. D. Cherry (eds.), *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 2nd ed., p1566-1577, W. B. Saunders, Philadelphia, 1987.
- 41) Hall, C. B., Long, C. E., Schnabel, K. C., Caserta, M. T., Mcllytyre, K. M., Costanzo, M. A., Knott, A., Dewhurst, S., Insel, R. A. & Epstein, L. G.: Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Eng. J. Med.*, 331, 432-438 (1994).
- 42) Miyawaki, T., Kasahara, Y., Kanegane, H., Ohta, K., Yokoi, T., Yachie, A. & Taniguchi, N.: Expression of CD45RO (UCHL1) by CD4+ and CD8+ T cells as a sign of in vivo activation in infectious mononucleosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 83, 447-451 (1991).
- 43) Cabrera, M. L., Santis, A. G., Ruiz, E. F., Blacher, R., Esch, F., Mateos, P. S. & Madrid, F. S.: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J. Exp. Med.*, 178, 537-547 (1993).
- 44) Borrego, F., Pena, J. & Solana, R.: Regulation of CD69 expression in human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Eur. J. Immunol.*, 23, 1039-1043 (1993).
- 45) Lusso, P., Malnati, M. S., Garzino-Demo, A., Crowley, R. W., Long, E. O. & Gallo, R. C.: Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature*, 362, 458-462 (1993).

The Clinical and Immunological Study of Primary Infection with Human Herpesvirus-6 (HHV-6) in the Infantile Period Naohisa Shintani, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 104, 132—142 (1995)

Key words human herpesvirus-6, primary infection, polymerase chain reaction, natural killer cells, CD69

Abstract

Exanthem subitum is an acute febrile illness affecting infants and young children, characterized by a fever of 3 to 5 days' duration, rapid defervescence, and the subsequent appearance of a generalized rash. Although exanthem subitum has long been considered to be an infectious disease of unknown origin, human herpesvirus-6 (HHV-6) was identified as the causative agent of exanthem subitum in 1988. Serological studies have shown that primary HHV-6 infection occurs mainly in the infantile period, and the HHV-6-infected situation persists latently during adulthood. The present study was undertaken to elucidate the contribution of primary HHV-6 infection to the first febrile illness after birth in infants. DNA extracted from blood samples of children with the first febrile episode after birth was amplified by the PCR method with a set of primers specific for HHV-6. The amplified PCR products were assessed in ethidium bromide-stained agarose gel. PCR analysis could detect blood HHV-6 DNA in some (about 41%) of examined cases. In contrast, HHV-6 DNA in the blood was detectable in neither adult nor children controls, both of whom had experienced exanthem subitum. The anti-HHV-6 IgG antibody was not found in the serum of the HHV-6 DNA-positive group, whereas the HHV-6 DNA-negative group exhibited variable levels of serum anti-HHV-6 IgG antibody. Postfebrile rash, typical of exanthem subitum, was seen not only in HHV-6-positive children (65%), but also in HHV-6-negative ones (14%). Paired serum samples of anti-HHV-6 IgG antibody confirmed that all cases with postfebrile rash, whether positive or negative for blood HHV-6 DNA, might be due to primary HHV-6 infection. There was no significant difference between HHV-6-positive and negative children with postfebrile rash with respect to clinical findings such as lymph node swelling and gastrointestinal or respiratory symptoms. These observations implied that PCR detection of HHV-6 DNA in the blood might be simply reflected by the degree of HHV-6 viremia in the acute phase of primary HHV-6 infection. Thus, it was supposed that primary HHV-6 infection might be responsible for more than 50% of the first febrile episode after birth. In this study, the frequency of lymphocyte subsets in the peripheral blood was further examined for blood samples from children who were diagnosed as having primary HHV-6 infection based on the presence of HHV-6 DNA in the blood. It was found that the percentages of lymphocyte subsets in HHV-6-infected children were similar to those found in non-HHV-6-infected individuals. The important finding was that an appreciable expression of the early activation antigen, termed CD69 antigen, was found on CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and natural killer (NK) cells, and that the expression of CD69 antigen on NK cells was especially marked. The results described above suggest that primary HHV-6 infection is a common cause of the first febrile illness after birth in Japanese infants. There is a possibility that primary HHV-6 infection causes various clinical manifestations in young infants, including asymptomatic infection, fever without rash or exanthem subitum. The whole spectrum of primary HHV-6 infection would be clarified by further studies employing PCR detection of HHV-6 DNA in the blood, measurement of serum anti-HHV-6 IgG antibody and evaluation of CD69 antigen expressed on NK cells.