

第 45 回日本小児感染症学会特別講演

ウイルス発見にまつわる話

—突発性発疹原因ウイルス—

山 西 弘 一*

はじめに

まず、第 45 回日本小児感染症学会は札幌医科大学小児科学教授 堤先生が会長を務められ、盛大に行われたことに敬意を表する。その折に特別講演に招かれ光栄に思っている。筆者は昭和 42 年に大阪大学医学部を卒業以来、一貫してウイルス学を専攻してきた。大学院は大阪大学微生物病研究所の奥野良臣教授の下で麻疹、風疹、ムンプスの生ワクチンの開発に携わり、特にムンプス生ワクチンの開発研究を行った。その後、当時助教授でおられた高橋理明先生（後の教授）のご指導で単純ヘルペスウイルス（HSV）の発癌研究を行った。さらに当時 HSV での世界的権威であった米国ペンシルバニア州立大学の Fred Rapp 教授の下で研究を行う機会に恵まれ、HSV、ヒトサイトメガロウイルスの基礎研究を行った。帰国後、高橋教授の下、水痘帯状疱疹ウイルスの基礎的研究を行った。そのときにはすでに高橋先生は世界で初めて水痘生ワクチンの開発に成功しておられた。このように筆者は研究初期はワクチン開発という応用研究を行い、その後さらにヘルペスウイルスの基礎研究を行ったことが、その後の突発性発疹原因ウイルスの発見の背景があったように思える。

I. HHV-6 の発見と血清疫学

1986 年米国国立癌研究所（NCI）の Gallo ら¹⁾に

より、以下の報告が Science 誌に掲載された。患者（2 名の HIV 陽性のリンパ腫およびリンパ腺炎、3 名の HIV 陰性のリンパ腫およびリンパ腺異常、1 名の HIV 陰性の白血病患者）の末梢血リンパ球を培養して巨細胞の出現を認めた。この巨細胞の核および細胞質には封入体がみられ、電子顕微鏡によりウイルス粒子が観察された。さらに患者自身の血清を用いた蛍光抗体法でも感染細胞が染色された。このウイルス粒子は 162 個のカプソメアが正 20 面体を形成し、エンベローブにおおわれ、その全体の直径は約 200 nm であった。続いてウイルス感染細胞に対する抗体反応が行われた結果、ウイルスの分離された患者は高い抗体値を示した。一般の成人は 220 人中 4 人が低い抗体を保有していたが、エイズ患者でもリンパ腫以外の人は抗体陰性であった。これらのことより、彼らはこのウイルスは全く新しいヘルペスウイルスで B リンパ球に感染性を示すことより human B lymphotropic virus (HBLV) と名づけた。その後イギリス、フランスの研究グループからも同様な発表がなされた。しかしその後、このウイルスは主として T 細胞向性であり（後記）、ヒトを主な宿主としている 6 番目のヘルペスウイルスであり human herpesvirus 6 (HHV-6) と命名された。

筆者は新たなヘルペスウイルスの発見に興味をもち、米国 NCI に分与を願い出たが、かなわなかった。しかし米国 CDC でも同様のウイルスが

* 一般財団法人阪大微生物病研究会
〔〒 565-0871 吹田市山田丘 3-1〕

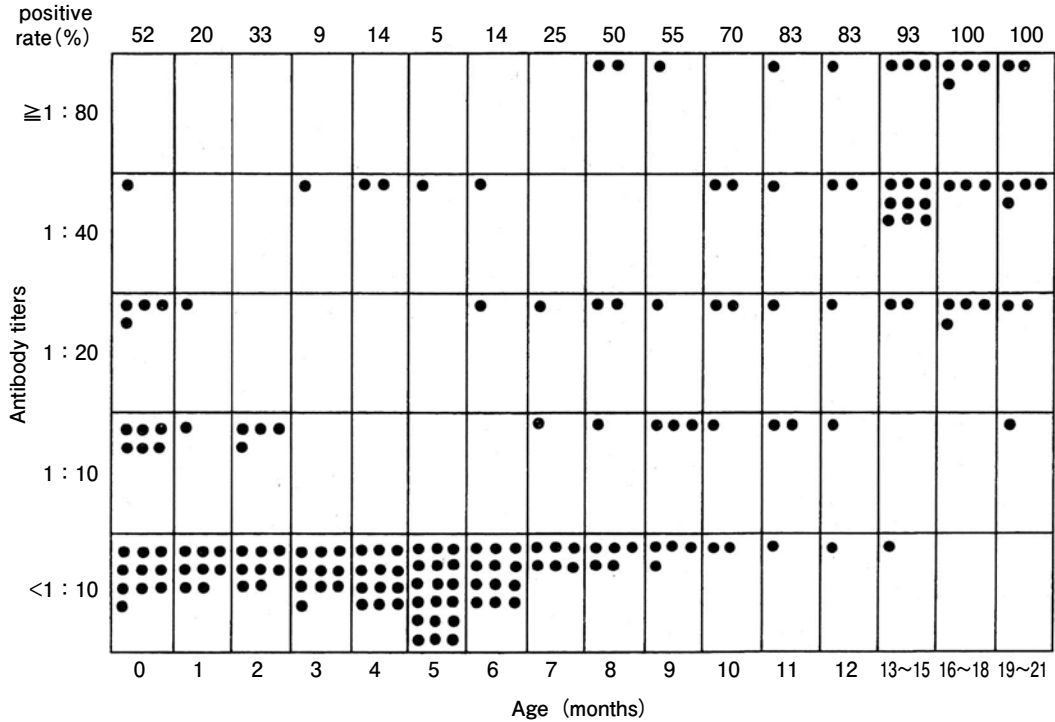


図 1 HHV-6 感染の血清疫学

エイズ患者から分離された²⁾ことを当時国立感染症研究所の倉田毅先生より聞き、早速、倉田先生を通じて分与を願い出た。CDC の Lopez 博士、Pellette 博士は非常に親切な方々で、1987 年 12 月に倉田先生と CDC を訪問し、快く分与していただいた。

当時は新ウイルスで正常人は感染していないと発表されていたが、われわれはこの抗原を用いて、まず血清疫学を行った³⁾。幸いにもわれわれの研究室にはワクチン接種者からの多くの血清が保存されていた。蛍光抗体法により検査を行った結果、多くの人は小児期にすでにこのウイルスに感染していて 10 歳以上の人でも 70~80% 抗体陽性であった。そこでさらに年齢を下げて検査をすると、5 カ月児までは陽性者が多く（母親からの移行抗体）、生後 5 カ月では陽性率はほぼ 0% になり、6 カ月後より上昇し、1 歳を越えるとほぼ 100% の子どもが抗体を保有していることが判明した（図 1）。この結果より HHV-6 はかなり低年齢で感染する、非常にポピュラーな感染症であることが想

像された。

そこで、当時いまだに不明であった突発性発疹の原因因子ではないかと思いついた。

II. 突発性発疹はウイルス病であるといわれていた

教科書には突発性発疹 (exanthema subitum または roseola infantum) は主として 6~12 カ月の幼児を中心に見出される疾患で、約 10 日の潜伏期の後突然の発熱で始まり、数日の高熱が続き解熱の後に発疹が全身に現れる。発疹は通常鮮紅色で斑状または丘疹状で融合することもある。発熱 1~2 日に口蓋垂根元の両側、扁桃腺上窩に近い軟口蓋粘膜に粟粒大のやや円形の薄い紅色の斑点が出現することがあると書かれている。粘膜疹は永山斑(発見者の故 永山徳郎・九州大学名誉教授に因む)と呼ばれ、早期診断の助けになる。その他、リンパ腺腫脹や下痢を伴う消化器症状が認められることがある。いずれにしても通常は重症になることはないが、まれには熱性けいれんがみられると書かれている。

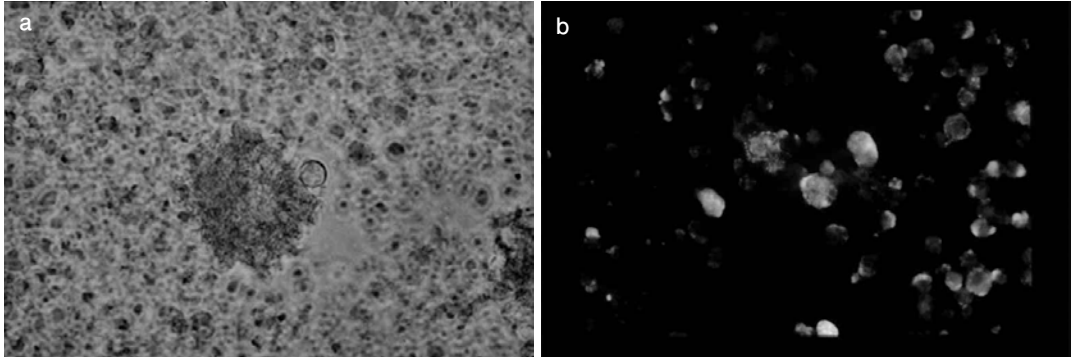


図 2 突発性発疹患者からのウイルス分離

a : 細胞変性 (CPE) b : IFA (回復期血清使用)

1950年代には米国の Kempe ら⁴⁾は発熱期の患者の血液を未罹患の6カ月の乳児に接種し9日後に典型的な突発性発疹の再現をすることに成功し、続いてスウェーデンの Hellstrom ら⁵⁾も同様なヒトへの接種実験を行い、病因因子が伝染性的のものであることを証明していた。わが国においては、前述の永山徳郎先生らもヒトへの接種実験を行ってその成果を発表しておられた⁶⁾。それ以後、多くの研究者が原因因子の分離を試み多くのウイルスが原因ウイルスとして候補に上がったが、同定には至らなかったようである。

III. ウイルス分離と同定

以上のように、われわれは血清疫学と臨床学的に突発性発疹が生後約6カ月以降に多発し、ウイルス病が予想されることより、HHV-6の感染初期像は突発性発疹を疑い、突発性発疹患者血液中よりウイルスの分離を試みた⁷⁾。材料は近医の近藤俊夫先生の熱心なご厚意によるものであった。年齢約6~12カ月の突発性発疹を疑われる発熱性疾患患者6名(後に、このうち4名は発疹が認められ突発性発疹と診断されたが、2名は解熱後も発疹が認められず臨床診断上は突発性発疹とは診断されなかった)より末梢血をヘパリン採血し、血液を Ficoll-paque 上に重層し、1,500 RPM, 30分遠心しリンパ球を分離した。リンパ球は RPMI 1,640 培地に 10% fetal bovine serum, 組換え DNA による interleukin-2, phytohemagglutinin 入りの培地で培養した。また、培地は少なくとも1週間

に1度は新しいものと交換し、顕微鏡下で細胞の状態を少なくとも1カ月観察した。その結果、第1例目の患者の細胞培養を始めて9日目に巨細胞状の細胞変性(CPE)が観察された(図2a)。他の3名も10~14日にはCPEが観察されたが、発熱のみの2名にはCPEが認められなかった。続いてCPEの観察されたリンパ球をアセトンで固定し、急性期および回復期血清で反応させ、蛍光抗体法で観察すると急性期血清には全く反応しなかった(1:10以下)が、回復期血清には強く反応する抗原を観察できた(図2b)。その抗体は発症後2~3週で1:2~1:80に上昇した。また、米国CDCのDr. Lopezより分与されたHHV-6ウイルス(Z29株)感染リンパ球とも同様に反応した。さらに感染細胞を電子顕微鏡で観察すると、核内には直径約100nmのヌクレオカプシッド様粒子が観察され、また直径約200nmのエンベロープを有する典型的なヘルペスウイルス粒子が細胞中および細胞外に見出された(図3)。その結果、分離されたウイルスはヘルペスウイルス属に属し、HHV-6と極めて類似していることが判明した。さらに突発性発疹既往歴のある血清(11名の急性期および回復期血清)で反応させると、急性期よりの患者抗体価は発症後5日目までは1:10以下であったが、日を追うにつれて抗体は上昇し、3週には1:80以上になった。このように既往歴と完全に対応することが判明した。ここでわれわれはHHV-6は突発性発疹の原因ウイルスであると確信した。

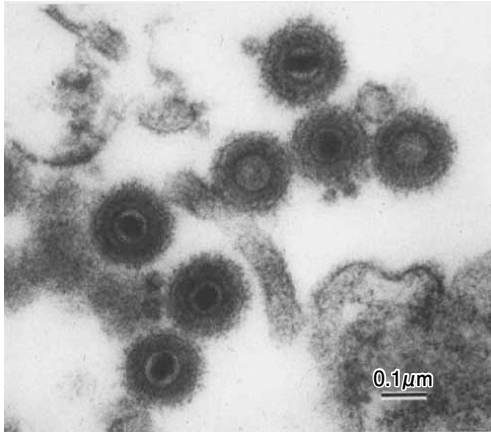


図 3 HHV-6 の電子顕微鏡写真

IV. 原因因子の証明のためのコッホ（またはヘンレ）の原則に符合するか

それでは HHV-6 が突発性発疹の原因ウイルスであることは、ヘンレの 3 原則（コッホの 4 原則）に符合するか検証する必要があった。ヘンレの 3 原則に照らし合わせるとは、まず突発性発疹患者の検体よりいつも HHV-6 が分離される必要がある。突発性発疹の患者にはいつも HHV-6 が見出され、突発性発疹患者の末梢血より高率に HHV-6 が分離されることより、また突発性発疹患者の急性期では HHV-6 抗体は陰性で、回復期に陽転化することより、2 つの条件は満たされた。ついで HHV-6 を未罹患者に接種し突発性発疹になるかであるが、これは倫理上より現在では困難である。しかし前記の 1950 年代の人体接種テストよりほぼ満たされているといつてよいと思われる。

V. HHV-6 の細胞親和性とバリエント

前述のように HHV-6 は当初 B リンパ球に親和性があると報告された。そこでわれわれは、リンパ球のどのサブセットに親和性があるかを検討した⁸⁾。突発性発疹を疑われる発熱患者の血液よりリンパ球を分離し、CD4 および CD8 に対する単クローン抗体を用いた cell sorter を用いてリンパ球を CD4⁺ および CD8⁺ のサブセットに分離し完全培地を用いて細胞を培養した。約 2 週間後に細胞を固定し HHV-6 に対する抗体を用いてウイ

ルス抗原を検索した。その結果、ウイルスは主として CD4 細胞より分離された。続いて *in vitro* ではどのような動態をするかを検討した。まず臍帯血リンパ球を 2 日間培養し、その後単クローン抗体を用いて CD4⁺ または CD8⁺ リンパ球に分離してウイルスを感染させ、1 週間後に細胞を固定し HHV-6 に対する抗体を用いて感染細胞を染色した結果、ウイルスは CD4⁺ 細胞で増殖することを見出した。以上の結果より当初の発表とは異なり、T 細胞向性がこのウイルスの特徴であった。

当初発見された HHV-6 とわれわれが突発性発疹より分離した HHV-6 はその後の分子生物学的解析や細胞親和性の研究で、HHV-6A と HHV-6B の 2 つのバリエントが存在することが認められた。突発性発疹より分離される HHV-6 はすべて HHV-6B である。HHV-6A の病原性についてはいまだに明らかではない。

最近になり、国際ウイルス命名委員会により HHV-6A、HHV-6B バリエントではなく独立したヘルペスウイルスとなった。すなわち、ヒトヘルペスウイルスは 9 種類存在することになったわけである。

おわりに

HHV-6 は 1986 年に初めて発見され、その後われわれはこのウイルス（HHV-6B）が突発性発疹の原因ウイルスであることを見出した。いったん原因ウイルスが発見されると、われわれをはじめ多くの研究者によりその合併症、潜伏感染の様子、さらに再活性化された折の病態も明らかにされてきた。また最近では HHV-6B の細胞側のレセプターが CD134 である⁹⁾ ことが、共同研究者の森康子神戸大学教授により発見されたことも特記されることである。ウイルス病が疑われてきた疾患は他にも考えられ、ご出席の小児科領域の第一線で活躍されておられる先生方により、今後も未知のウイルス感染とその病態が明らかになることが期待される。

前段で記した非常にお世話になった奥野良臣先生、高橋理明先生、近藤俊夫先生、Fred Rapp 先生は今では帰らぬ方々になり非常に残念であるが、心からご指導を感謝いたします。

文 献

- 1) Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al : Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234 : 596-601, 1986
- 2) Lopez C, Pilet P, Stewart J, et al : Characteristics of human herpesvirus-6. *J. Infect Dis* 157 : 1271-1273, 1988
- 3) Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, et al : Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol* 27 : 651-653, 1989
- 4) Kempe HC, Shaw ED, Lackson JR, et al : Studies on the etiology of exanthema subitum (Roseola infantum). *J Pediatrics* 37 : 561-568, 1950
- 5) Hellstrom B, Vahlquist B : Experimental inoculation of roseola infantum. *Acta Paediatrica* 40 : 189-197, 1951
- 6) 永山徳郎, 井上 鼎, 淵上勝男, 他 : 突発性発疹のウイルス学的研究. *小児臨* 8 : 927, 1955
- 7) Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, et al : Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthema subitum. *Lancet* i : 1065-1067, 1988
- 8) Takahashi K, Sonoda S, Higashi K, et al : Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 63 : 3161-3163, 1989
- 9) Tang H, Serada S, Kawabata A, et al : CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (22) : 9096-9099, 2013

* * *