

## 風疹ウィルスの経胎盤感染に関する研究

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8958">http://hdl.handle.net/2297/8958</a>

## 風疹ウイルスの経胎盤感染に関する研究

金沢大学がん研究所ウイルス部 (主任: 波田野基一教授)

金沢医科大学産科婦人科学教室 (主任: 桑原惣隆教授)

杉 浦 幸 一

(昭和56年12月26日受付)

先天性風疹症候群 (CRS) を研究するにあたり、風疹ウイルス (RV) の経胎盤感染について *in vitro* 実験を行なった。材料は正常または RV 感染妊婦から人工流産により得た絨毛、脱落膜、胎児組織を用いた。RV 感染妊婦の風疹赤血球凝集抑制抗体価および補体結合抗体価は、1:512, 1:16 であった。RV 感染妊婦より得た絨毛および胎児 (CR, FR) 細胞から RV が分離され、中和試験により分離ウイルスの抗原性、生物学的性質は RV 標準株 M-33 と類似していることが示された。これら CR および FR 細胞は培養液中に常に  $10^2 \sim 10^4$  FFU (フォーカス形成単位)/0.1ml の RV を放出し、蛍光抗体法 (IF) では 1~2 ヶ月の間陽性を呈し、RV 持続感染であることが証明された。しかし、RV 感染妊婦より得た脱落膜 (DR) 細胞では、RV 産生は認められず、IF も陰性であった。正常妊婦より得た絨毛 (CN) 細胞の *in vitro* 培養細胞に RV を感染させると、RV 持続感染となったが、正常脱落膜 (DN) 細胞では成立しなかった。これら RV 持続感染 CN 細胞においても RV が常に産生され、IF 陽性であることが証明された。また、絨毛癌由来 BeWo 細胞を用いて RV 感染実験を行った結果、CN 細胞の場合と同様、RV 持続感染系が容易に成立した。この時、BeWo 細胞における人絨毛性腺刺激ホルモン活性は RV 感染の初期に極めて抑制されたが、その後次第に正常域まで回復した。なお、絨毛細胞内に潜伏内在する C 型 RNA ウィルスが RV 感染により活性化され、CRS 発生に関与する可能性を考え、逆転写酵素活性を測定したところ、RV 感染 CR, CN 細胞培養系から抽出した培養液の少数例に有意に高い活性が見出された。以上の所見より、絨毛細胞は RV に対する感受性が強く、容易に RV 持続感染となるが、脱落膜細胞ではこれらの傾向を認めないことが示唆された。RV の経胎盤感染の実態は、絨毛細胞感染を経て、その結果成立する持続感染であると思われる。

**Key words** rubella virus, chorionic cell, trans-placental infection, persistent infection

妊娠中の風疹 virus (rubella virus: RV) 感染による胎児異常発生は、先天性風疹症候群 (congenital rubella syndrome: CRS) として知られており、その予防は近年社会問題ともなっている。

CRS の報告は 1941 年、オーストラリアの眼科医 Gregg<sup>1)</sup> が白内障との関係について報告したのが最初である。その後、特に 1962~1964 年、米国における風疹大流行後の大量の異常児発生について数多くの研究がなされ<sup>2)~10)</sup>、RV の研究は大きく発展する事となった。近年では、本症発生機転の解明には、免疫<sup>11)~14)</sup>、イン

ターフェロン<sup>7)15)</sup>などの概念も導入され、同時にその予防として弱毒風疹生 vaccine の開発に至っている。しかし、CRS 発生機序に関してはいまだ不明点も多く、ワクチンによる予防は可能であっても、治療あるいは CRS 発生の診断は容易ではなく、近年ますます一般の妊婦風疹感染に対する関心は高まりつつある。

CRS 発生機序解明には RV の経胎盤感染の実態、および胎盤經由 RV 感染成立の特異性を検討する必要がある。胎児への風疹感染経路は、経胎盤感染 (trans-placental infection) あるいは血行性胎盤胎児感染

Studies on Trans-Placental Infection of Rubella Virus. Kohichi Sugiura, Department of Virology (Director: Prof. M. Hatano), Cancer Reserch Institute, Kanazawa University and Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. S. Kuwabara), Kanazawa Medical University.

(hematogenous placento-fetal infection) と考えられている<sup>16)~20)</sup>。すなわち RV は母体循環に侵入し viremia となり、胎盤感染を起し、ここで増殖した virus が胎児血中へ入る。一方、胎盤は妊娠中の外部からの侵入を防禦する働きがあり、いわゆる胎盤関門(placental barrier)の存在が知られ<sup>18)</sup>、経胎盤感染が成立するには、この胎盤関門を通過しなくてはならない。しかし従来の CRS 発生などの疫学統計などからみると、RV は比較的容易に経胎盤感染がおこり、妊娠 8 週以前の母体の RV 感染では、胎盤へは 85% が、胎児へは 50% の感染移行があると言われている<sup>21)</sup>。CRS の発生頻度は報告者により異なり、妊娠初期感染で 9.7<sup>22)</sup>~57.9<sup>23)</sup>% とされている。著者は、これら経胎盤感染の詳細を検討する目的で、RV 感染と胎盤、特に絨毛細胞との関係について細胞培養法による研究を行なった。

## 材料および方法

### I. 実験材料

#### 1. 細胞

##### 1) 初代培養細胞

i) 風疹感染妊婦由来絨毛 (chorion), 脱落膜 (decidua), 胎児 (fetus) 細胞: 発疹, リンパ節腫脹など典型的な風疹症状が出現してから約 7 日目の妊婦に対し人工妊娠中絶術を施行し, 得られた子宮内容物を胎盤と胎児にわけ, さらに前者は絨毛および脱落膜に分離し, 各々を初代培養に供した。患者はこの時妊娠 12 週で, 血清学的検査にて風疹赤血球凝集抑制 (HI) 抗体価 512 倍, 補体結合 (CF) 抗体価 16 倍の陽性値が見られた。

ii) 正常ヒト絨毛および脱落膜細胞: 臨床的, 血清学的に風疹感染が否定され, また妊娠経過に流産傾向などの異常を認めない妊娠を対象として, 優性保護法に基づいて人工妊娠中絶術を施行し得られた子宮内容物を, 絨毛および脱落膜に分離し初代培養を行なった。本実験では, 風疹非感染初代ヒト絨毛細胞として 3 株 (CN-1: 妊娠 12 週, CN-2: 妊娠 7 週, CN-3: 妊娠 6 週), および風疹非感染初代ヒト脱落膜細胞として 1 株 (DN-3: 妊娠 6 週) を用いた。

これら, i), ii) の細胞培養には 10% 牛胎児血清加 Dulbecco's modified MEM を用いた。

2) 絨毛癌細胞 (BeWo): 既に樹立化された絨毛癌細胞として Pattillo ら<sup>24)</sup>による BeWo がよく知られている。この細胞は, ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin: HCG) などの hormon を分泌し, 癌細胞ではあるが絨毛細胞の性格を有する cell line として RV の経胎盤感染の 1 つのモデルに本細胞を用いた。BeWo 細胞培養には Weymouth's MB752

-150%, Gey's BSS 40%, 牛胎児血清 10% の培養液を用いた。

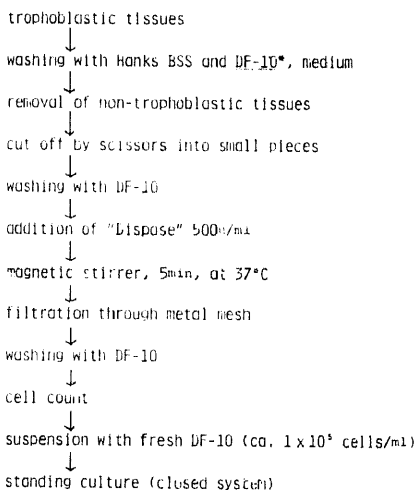
3) Vero 細胞: RV による特異的細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) を観察し, RV 分離に本細胞を用いた。2% calf serum を含む Eagle's MEM で継代培養し, RV sample 感染後は calf serum 無添加 Eagle's MEM で維持した。

4) RK-13 細胞: RV の力価測定, すなわち focus forming assay に用いた。通常の増殖継代には 5% calf serum を含む Eagle's MEM を使用した。

2. Virus: RV の標準株として, 既に金沢大学がん研究所ウイルス部にて cloning された M-33 株を用いた。Vero 細胞を用いて継代増殖させ 80°C にて保存したものを用いた。

## II. 実験方法

1. 絨毛, 脱落膜, 胎児組織の初代培養法: 従来より, 特に絨毛細胞の初代培養は比較的困難とされているが, いくつかの報告がある<sup>25)26)</sup>。著者は, 種々の条件のもとに初代絨毛細胞の培養法について基礎実験を行い検討した<sup>27)</sup>。その結果, Fig.1 に示す方法が, 収量およびその後の増殖率の点において最も適当であると考え, 本法によって培養実験を行なった。脱落膜および胎児細胞も同様の方法によった。すなわち組織を分離し, 十分に洗滌後 Dispase<sup>28)</sup> 500u/ml にて 37°C, 5 分間緩徐にかくはんして細胞を分散し, closed system にて 37°C で静置培養を行なった。細胞培養には常に  $1\sim 2 \times 10^6$ /



\* DF-10: Dulbecco's modified MEM, Fetal calf serum (10%), NaHCO<sub>3</sub> (0.1%) and antibiotics

Fig 1. Method of primary culture of trophoblastic cells

mlの細胞濃度を用いた。

2. RV 感染妊婦由来細胞初代培養およびそれよりのウィルス分離と同定。

1) 初代培養とRV分離：前述の1.と同じ方法で *in vivo* 風疹感染妊婦由来絨毛、脱落膜および胎児細胞を継代培養した。その培養液の1000rpm, 10分、遠沈した上清を細胞外放出RVの検出に用いた。また、この時の細胞の凍結融解3回後、1000rpm, 10分、遠沈した上清を細胞内RVの検出に供した。

Hanks BSS で2回洗滌した confluent な Vero 細胞に検体を0.5ml, 37°Cで90分間吸着させた後、再びHanks BSS で洗滌し、維持液(血清無添加MEM)を加え、連日位相差顕微鏡にてCPE出現の有無を観察した。CPE出現時の培養液は1000rpm, 10分、遠沈後、-80°Cに保存し、後にRK-13細胞のfocus assayにてそのRV力価を測定した。

2) ウィルス力価測定：RVの力価測定はRK-13細胞を用いたfocus forming assay (名和法<sup>29)</sup>によった。すなわち、先ず組織培養用マルチトレー (Falcon, φ17mm, 24穴) に0.5ml 培養液EC-5でRK-13細胞を培養した。細胞シート形成後、細胞を洗い、2%仔牛血清加Eagle's MEMで段階希釈したvirus液を0.1ml当り、37°C, 90分吸着させた。その後virus液を捨て、Hanks BSSで洗滌後、寒天含有10%仔牛血清加Eagle's MEM (0.2%NaHCO<sub>3</sub>, 0.9% noble agarを等量加)を0.5ml当り重層し(1st overlay) 37°C, 2日間培養した。2日後に15000倍neutral redを含む二次寒天培地を重層し(2nd overlay), 34°Cにてさらに2日間培養後0.3~0.5mmのfocusを肉眼的に計測しfocus forming unit (FFU)/0.1mlを算定し、本文ではlog<sub>10</sub>FFU/0.1mlで表現した。

3) ウィルスの同定および局在

i) 中和試験：分離virusと標準RVの抗原性を比較検討する目的で、micro plate法を用いたRK-13細胞におけるfocus形成法を利用して中和試験を行なった<sup>29)</sup>。被検virusは約100FFU/0.1mlとなるように調節し、RV標準株としてM-33株を用いた。中和抗体は、抗RV(M-33株)家兎血清と免疫前家兎血清(Flowlab.)を20倍希釈より2倍段階希釈を行なった。被検virus抗原と中和抗体の等量を37°Cで60分間反応させ、型の如くfocus形成法を行なった。5日目に判定しfocus形成能を50%減少させる抗RV家兎血清希釈倍数の逆数を被検virusによる中和抗体価として標準M-33株のそれと比較した。

ii) 蛍光抗体法：間接法による蛍光抗体法により細胞内RV局在と抗原性を検討した(Coonsら<sup>30)</sup>, およびWoodsら<sup>31)</sup>の方法)。RV感染各細胞を自然乾燥後

アセトンで10分間固定し、一次血清(HI価512倍の風疹患者血清の20倍希釈)で37°C, 60分間反応させた。その後PBSで良く洗滌後、二次血清(FITC標識抗ヒトγ-globulin家兎血清:HYLAND製)と30~60分反応させ、PBSで洗滌後10%glycerinでmountし、蛍光顕微鏡にて観察した。

3. 正常ヒト絨毛、脱落膜およびBeWo細胞におけるRVの*in vitro*感染実験：1.の方法で培養したRV非感染正常ヒト絨毛、脱落膜細胞およびBeWo細胞をHanks BSSで2回洗滌し、RV標準株M-33を0.5ml (MOI=5FFU/0.1ml), 37°Cで90分間吸着させた。その後virus液を捨て、Hanks BSSで洗滌し、各細胞増殖培養液(growth medium)を加え、連日位相差顕微鏡にてCPEの出現の有無を観察した。同時に、かかる血清添加growth mediumにて維持しながら増殖した細胞は、さらに維持培養をつけ、RV持続感染細胞の樹立化を計った。一方、随時液交換でharvestされた培養液は1000rpmで10分間遠沈後-80°Cに保存し、後のRV力価測定に用いた。培養液中のRV力価測定法およびRV感染細胞確認のための蛍光抗体法は2-3)-ii)に依った。

4. HCG測定：ヒト絨毛細胞に特異的なmarkerとしてHCG産生があるが、RV感染によりHCG合成能がどのように変化するかをみる目的で絨毛細胞培養液中のHCGを測定し、その変化を検討した。

測定は二抗体法によるRIAを用い、測定キットはCIS製HCG-I-125kit(ミドリ十字KK)を使用した。HCG量はngで表現した(100ng≒660mIU)。

5. 逆転写酵素(reverse transcriptase: RT)活性の測定<sup>32)-34)</sup>。RTは動物のRNA型腫瘍virus (oncornavirus)に内在し、ウィルスRNAを鋳型として、それに相補的なDNA(provirus)の合成に関与する酵素(RNA dependent DNA polymerase)である。従って、RT活性の存在は、oncornavirusの存在とその関与を意味していることが多い<sup>32)-36)</sup>。ヒト絨毛細胞内C型oncornavirusの存在が報告され<sup>37)</sup>、一方動物細胞でRVとoncornavirusのinteraction, hybridizationによる風疹変異virusの発生が知られている<sup>49)</sup>。著者もこれらの問題に関連して、RV感染絨毛細胞培養液中のRT活性測定を試みた。

今回使用した反応系はexogenous method(外因性反応)で、RTの鋳型、プライマーとして(γA)n·(dT)<sub>12-18</sub>を用いる方法である<sup>40)</sup>。被検培養液は、あらかじめ24時間前に交換しておき、harvest後、1000rpm, 10分間遠沈した上清を用い、測定まで-20°Cに保存した。測定法の詳細はFig.2に示すが、主としてLieberら<sup>33)</sup>, およびSarinら<sup>34)</sup>の方法に従った。

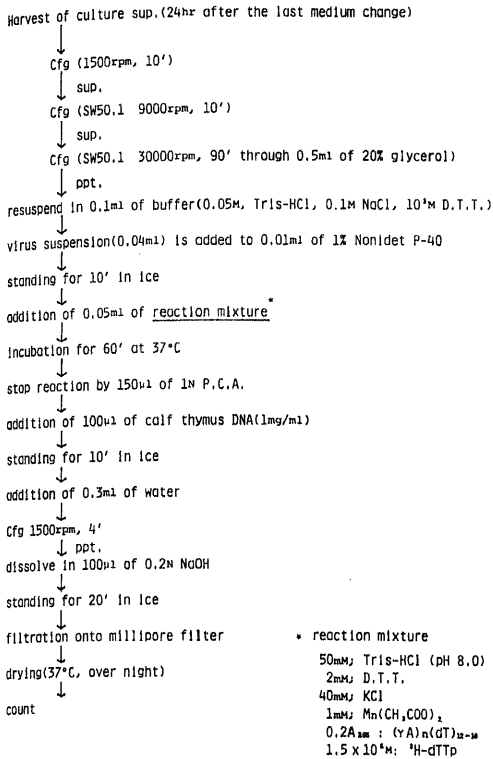


Fig. 2. Procedure of RT (reverse transcriptase) assay: Exogenous method

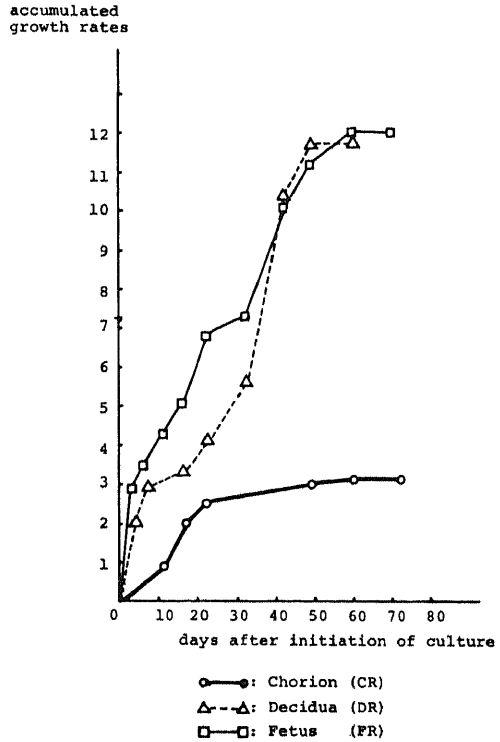
成 績

I. RV 感染妊婦由来培養細胞による経胎盤感染の検討.

1. RV 感染妊婦より得た絨毛, 脱落膜, 胎児組織の細胞培養

1) 形態: 絨毛 (RV 感染ずみ故に CR と略, 以下同様), 脱落膜 (DR) および胎児 (FR), いずれの組織も初代培養に成功した.

Fig.3 は培養 7 日目の CR, 4 日目の DR および FR を示す. CR 細胞は, そのほとんどが多形性, 不定形の上皮様細胞であり典型的な cytotrophoblast の形態を呈し, multi-nucleated cell, spindle cell の混在は肉眼的には認められなかった. 従って本実験においては, ほぼ cytotrophoblast (Langhans cell) のみが実験材料として得られたと考えられた. DR 細胞は CR 細胞よりやや細長い紡錘形であるが, 一応上皮様細胞であると思われた. FR 細胞はさらに細長く, ほとんど fibroblast であった. なお CR 細胞は正常絨毛細胞と比較して形態学的に異なる点は認められなかった.



\* ratio of proliferating to original cell counts

Fig. 4. Accumulated cell growth rates\* of CR, DR and FR cells in-vitro

2) 継代培養と異積増殖度: 細胞の増殖に従って各細胞の継代培養を行なった. CR 細胞は, 2代継代後, すなわち培養開始後 17 日目より増殖率は停滞したが, 約 70 日間, 6代まで継代が可能であった. DR, FR 両細胞は約 40~50 日間良好に増殖し, 両者とも 10代, in vitro 培養が可能であった.

各細胞の累積増殖度を Fig.4 に示すが, CR 細胞は DR, FR 両細胞と比較して明らかに増殖程度が悪かった. これら増殖度は正常絨毛および脱落膜細胞 (後述 Fig.6 参照) と比べ有意な差はなく, また, この間いずれの細胞においても RV による CPE を認めなかった.

3) HCG 分泌産生能: CR 細胞において初代培養では 42~52ng/ml の大量 HCG が培養液中に検出された (後述 Table.2 参照). しかしその後継代が進むにつれ, 急激に HCG 値は低下し, 3~4 代以降は常に 1ng/ml 前後の値を示すようになった. これらの傾向および値は, 非 RV 感染正常絨毛細胞の場合と同様であった. DR および FR 両細胞の培養液中から HCG は検出されなかった (0.1ng/ml 以下).

2. 各培養細胞よりの RV 分離の試み

1の各細胞培養液および各細胞抽出液を感染させた Vero 細胞における CPE 出現を示標として RV の分離を試みた。CR, DR 細胞は培養後それぞれ 7 日目と 22 日目に, FR 細胞は 6 日目と 22 日目に得られた sample を用い, 対照として培養液(陰性対照), および RV 標準株 M-33 (MOI=1FFU/cell) (陽性対照)を用いた。

1) CR 細胞の 7 日目, 22 日目, 両 sample とも, 細胞外(培養液上清 supernate: sup と略す)および細胞内(細胞凍結融解後の抽出物 cell extract: extract と略す)よりウイルスを分離し得た (Table.1)。7 日目の材料(初代)では, sup, extract いずれも Vero 細胞に感染後 25 日目に明瞭な CPE が出現し, 得られたウイルス力価を RK-13 細胞にてフォーカス形成法で測定すると, それぞれ 4.20, 4.12 ( $\log_{10}$ FFU/0.1ml)であった。22 日目(継代 3 代)の sup を感染させると 22 日目に, extract 感染では 20 日目に CPE を認め, ウィルス力価は各々 3.82, 4.15 であった。

2) DR 細胞では 7 日目(初代), 22 日目(継代 4 代)の sup および extract いずれも Vero 細胞における CPE の発現を認めなかった (Table 1)。

3) FR 細胞の 6 日目(初代), 22 日目(継代 5 代)における sup では, それぞれ感染後 24 日目と 22 日目に CPE が発現し, この時の RV 力価は 3.65, 3.40 であった。しかし extract 感染においては 6 日目, 22 日目の両 sample ともに CPE 出現を来さず, ウィルスを分離

し得なかった (Table 1)。

4) M-33 を用いた陽性対照では, 感染後 6 日目の Vero 細胞に CPE が現われ, その時の産生ウイルス力価は 4.70 であった。培養液のみを感染させた陰性対照では CPE を終始認めなかった。

3. CR, DR, および FR 各細胞培養液中へ放出されるウイルスの経時的測定: これら CR, DR および FR 細胞からのウイルス分離は 2 で証明されたが, さらにその確認もかねて, 細胞の継代に伴う放出ウイルス力価の経時変化を測定した (Table 2)。

CR 細胞での放出ウイルス力価 ( $\log_{10}$ FFU/0.1ml) は, 初代 3 日目は 3.52 であり, 4 代継代 32 日目でも 3.36 と, ほぼ変わらぬ力価を持続したが, 4 代継代 42 日目に至ると 2.75 とやや低下し, 6 代継代 72 日目では 2.21 となった。従って低力価ではあっても, CR 細胞の培養液中には常にウイルスが放出されていることが証明された。しかし, DR 細胞では, 初代よりまったく RK-13 細胞におけるフォーカス形成をしようとするウイルスの放出を認めなかった。FR 細胞においては, CR 細胞と同様, 培養液中に常にウイルスの存在を認めたが, その値は CR 細胞に比べ低値であり, 初代 3 日目で 2.80, 10 代継代 72 日目で 2.11 に過ぎなかった。

4. 分離ウイルスの同定(中和試験): 標準株(M-33,  $7.02 \log_{10}$ FFU/0.1ml)を対照として CR および FR 両細胞より分離されたウイルスの中和試験を行なった。

Table 1. Virus isolation from CR, DR and FR cells obtained from RV-infected women

Inoculum (culture days)	CPE on Vero cells	Virus titer $\log_{10}$ FFU/0.1 ml on RK-13 cells
CR (7) sup*	+	4.20
CR (7) extract**	+	4.12
CR (22) sup	+	3.82
CR (22) extract	+	4.15
DR (7) sup	-	/
DR (7) extract	-	/
DR (22) sup	-	/
DR (22) extract	-	/
FR (6) sup	+	3.65
FR (6) extract	-	/
FR (22) sup	+	3.40
FR (22) extract	-	/
RV : M-33	+	4.70

\* sup : supernate of cells culture medium

\*\* extract : extract of cultured cells

§ ( ) : culture days required for CPE occurrence on Vero cells after inoculation

そのために、CR 細胞は培養 3 日目の培養液上清と、一度 Vero 細胞で増殖させた培養 7 日目のウイルス sample が、また FR 細胞の 3 日目の培養液上清と Vero 細胞経由の 6 日目のウイルス sample がそれぞれ用いられた。

M-33 株による RV 免疫家兎血清の中和抗体価は 160, CR または FR 分離ウイルスを用いるといずれも 80 を示し、免疫前家兎血清では、いずれも 20 倍希釈でもフォーカス形成能の抑制がなかった。

CR および FR 両細胞から分離されたウイルスは何れも M-33 株と抗原性の変わらない RV である事が証明された。その他、Vero 細胞での CPE, RK-13 細胞でのフォーカスの大きさなども M-33 株に類似し、特に大きな差はみられなかった。

5. 分離 RV の CR, DR, FR 各細胞内局在：蛍光抗体間接法によって、CR, DR, および FR 各培養細胞内の RV 局在を検討した。CR 細胞は培養 11 日目と 49 日目、DR 細胞は培養 15 日目と 42 日目、FR 細胞は培養 15 日目と 49 日目の細胞を本実験用に subculture して、5~8 日培養の細胞を用いた (Table 2)。

CR 細胞：Fig.5-(A), FR 細胞：Fig.5-(C), 両者とも核周囲、細胞質中に粗大顆粒状の特異蛍光のウィ

ルス抗原を認めた。いずれの細胞でも、蛍光抗原陽細胞の数は全体の約 50% 程度であり、培養日数が進んだ細胞でも同様であった。DR 細胞：Fig.5-(B) では、かかる特異蛍光をまったく認めなかった。同時に RV 非感染、および感染 Vero 細胞を対照として用いたが、前者では蛍光陰性、後者では陽性であった。

CR, FR の両培養細胞は、細胞質内に RV 抗原の存在する持続感染細胞であることが明らかになった。

## II. RV 経胎盤感染の in vitro 実験による検討

1. 正常ヒト絨毛、脱落膜初代培養細胞における RV の増殖

異なる個体より得た 3 例の初代正常ヒト絨毛細胞 (CN-1, CN-2, CN-3) と 1 例の初代正常ヒト脱落膜細胞 (DN-3) に RV 標準株 M-33 を in vitro にて MOI=5FFU/cell で感染させ CPE 出現の有無、および培養液中への産生ウイルス力価を RK-13 細胞における focus 形成態で測定した。

1) RV 感染による CPE の出現

i) 絨毛細胞 (CN-1, -2, -3) における CPE 出現時期を累積増殖度とともに Fig.6 に示す。いずれも RV 感染後 7~8 日目より CPE の出現を認めた (Fig.7-(A), (B))。同時に Vero 細胞を対照として用いると、

Table 2. Periodical changes of virus titer and HCG concentration observed in culture media of CR, DR and FR cells in vitro

culture cells	passage Nos. of culture	days of culture	virus titer (log <sub>10</sub> FFU/0.1 ml)	IF*	HCG (ng/ml)
CR	1	3	3.52		48.8
	1	7	3.70		52.0
	1	11	3.15	(+)	42.0
	3	22	3.65		2.0
	4	32	3.36		
	4	42	2.75		
	4	49	2.65	(+)	0.8
	5	60	2.83		
DR	6	72	2.21		1.0
	1	3	--		
	3	15	--	(-)	0.1
	4	22	--		
	6	42	--	(-)	0.1
FR	8	60	--		
	1	3	2.80		
	2	6	2.85		
	4	15	2.65	(+)	0.1
	5	22	2.33		
	6	32	2.52		
	8	49	1.94	(+)	0.1
10	70	2.11			

\* IF : immunofluorescent staining

同様に6日目よりCPEを認めた (Fig.7- (C), (D)).

CPEの出現様式は Fig.7 に示すように、Vero細胞と類似した円形化細胞集塊を形成しつつ一部ガラス壁より剝離した。また、絨毛細胞の場合は培養液中に顆粒様物質の増加するのが特徴的であった。Vero細胞に比べると、CPEの起り方は比較的弱く、増殖を続ける細

胞も多く、1~2回継代培養を行ううちにCPEが消失し、形態的にRV非感染対照群と同じ状態となった。発現期間はCN-1:21日間、CN-2:13日間、CN-3:17日間であった。

累積増殖度は対照 (RV非感染) に比較し、CPE出現時にやや低下するようであるが、有意な差ではな

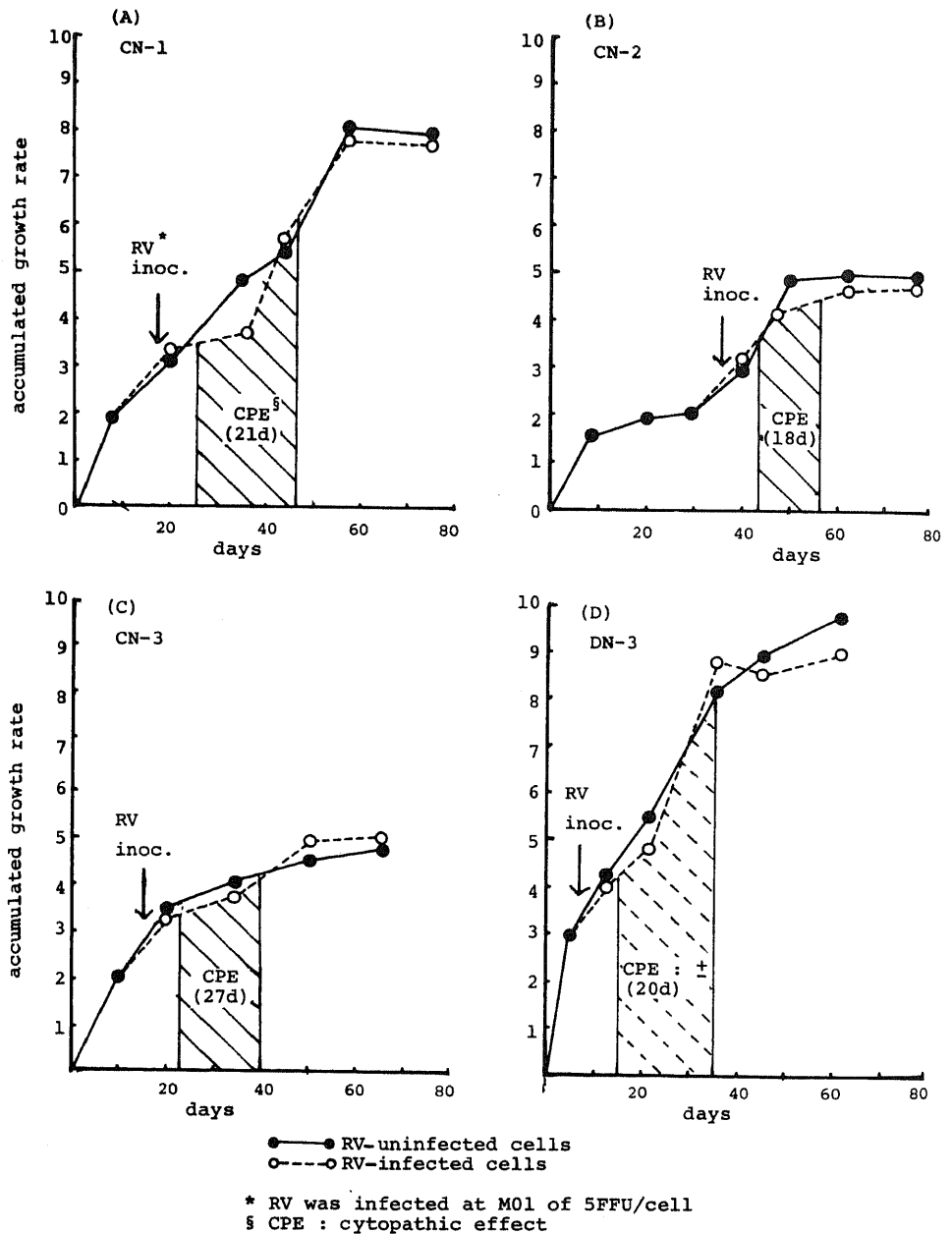


Fig. 6. Occurrence of RV specific CPE and accumulated growth rate of RV-infected chorionic (CN-1, -2, -3) and decidal (DN-3) cells



った(Fig.6). CPE 消失後は、まったく control と同じ状態で増殖したが、いずれも培養開始後 70 日間で aging による死滅がみられた。

ii) 脱落膜細胞 (DN-3) においては、絨毛細胞の場合ほど明確な CPE を認めず、RV 感染後 8 日目より約 20 日間、control (RV 非感染脱落膜細胞) に比べ、やや培養液中に顆粒様物質が増加したに過ぎなかった。Fig.6-(D) では、この期間を CPE: ± と表現した。増殖度は両者の間に差を認めなかった。

2) 増殖産生 RV 力価の経時的变化

培養液中に放出された RV の力価と CPE の変動を Table 3 に示す。CN-1 細胞において CPE 発現時は  $\log_{10}$ FFU/0.1ml が 4.20~4.65, CN-2 細胞: 4.10~4.55, CN-3 細胞: 4.15~4.38 であったが、CPE 消失後は CN-1 細胞: 3.85~4.10, CN-2 細胞: 3.14~3.82,

CN-3 細胞: 2.95~3.04 とやや低下はしたが、培養液中への産生ウィルスの放出が認められた。従って、CPE 消失後の各時点でこれらの細胞は RV 持続感染となっていることが証明された。Vero 細胞を用いた対照では 6 日目に CPE 出現し、その時のウィルス力価は 7.02 であった。なお DN-3 細胞では CPE も明瞭でなく、産生ウィルスの放出は陰性と考えられた。

3) RV 感染絨毛細胞 (CN) における RV の局在。

RV 感染 CN-1 細胞の 10 日目の細胞を用いて蛍光抗体間接法を行なった。10 日目 (Fig.8-(A)) は CPE (+) で放出 RV 力価は  $4.65 \log_{10}$ FFU/0.1ml の細胞、39 日目 (Fig.8-(B)) は CPE (-) であるが放出 RV 力価が  $4.10 \log_{10}$ FFU/0.1ml と持続感染の考えられる細胞である。両者とも、前述 CR および FR 細胞におけると同じく、細胞質内に顆粒状の特異蛍光を認めた。

Table 3. Periodical changes of RV growth in CN-1, -2, -3 and DN-3 cells

culture cells	passage Nos. and (days) when RV was inoculated	passage Nos. after RV inoculated	days after inoculated	CPE	virus titer ( $\log_{10}$ FFU/0.1 ml)
CN-1	2 (18d)	0	2	-	-
		1	8*	+	4.50
		1	10	+	4.65
		1	18	+	4.25
		2	20	+	4.35
		3	26**	+	4.20
		4	39	-	4.10
		5	57	-	3.85
CN-2	4 (36d)	0	4	-	-
		1	9*	+	4.55
		1	11	+	4.35
		2	21**	+	4.10
		2	26	-	3.82
		3	41	-	3.14
CN-3	2 (15d)	0	5	-	-
		1	8*	+	4.25
		1	19	+	4.38
		2	25**	+	4.15
		2	35	-	2.95
		3	50	-	3.04
DN-3	2 (7d)	0	5	-	-
		1	8*	±	-
		1	14	±	-
		2	28**	±	-
		3	38	-	-
		4	54	-	-

RV(M-33) inoculation: MOI=5FFU/cell

\* initiation of CPE

\*\* end of CPE

4) 絨毛細胞における HCG 分泌能への RV 感染効果  
CN - 1, - 2, - 3 細胞培養液中の HCG を随時測定したが、既に 1~2 代 in vitro 継代した後の状態であるため、何れも 0.8~1.5ng/ml と低値陽性であった。これ

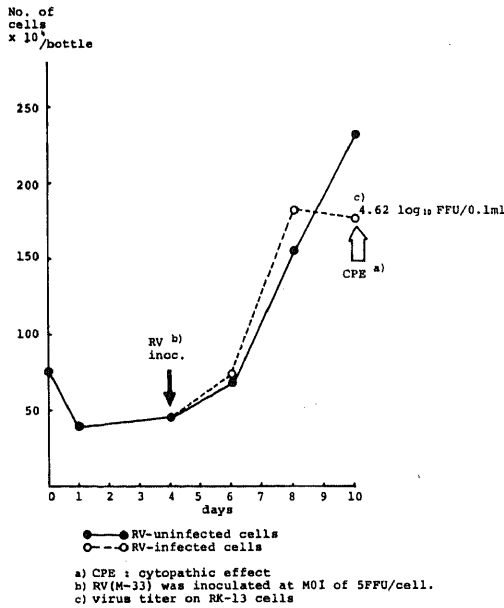


Fig. 9. Cell growth and CPE occurrence after RV infection on BeWo cell cultures

らに RV を感染させたものも同様の低値陽性を示し、両者間に有意の差を見出し得ず、RV 感染の影響をみることでできなかった。

## 2. 絨毛癌 (BeWo) 細胞における RV の増殖、

BeWo 細胞に RV 標準株 M-33 を感染させ、CPE の発現およびその後の RV 持続感染化について検討し、特にその間の HCG 産生能の変化に注目した。

### 1) RV 感染後の CPE の出現と RV 持続感染化、

RV を MOI=5FFU/cell で BeWo 細胞に感染させると 16 日目に CPE が出現した。CPE 出現までの感染細胞増殖は、非感染のものと同様と認めなかった。CPE 出現時、培養液中に放出された RV 力価は  $4.62 \log_{10}$  FFU/0.1ml であった (Fig.9)。

また、RV 感染後 2 日目、4 日目、6 日目に passage を行ない、その後 blind passage を数回行った結果、2 日目と 4 日目の細胞から RV 持続感染 BeWo 細胞ができた (BeWo-RV<sub>1</sub>, BeWo-RV<sub>2</sub>)。その後の経過を Table 4 に示す。BeWo-RV<sub>1</sub> 細胞では RV 感染後 3 回継代後に CPE が消失し、この時培養液中の RV 力価は 3.22 であった。BeWo-RV<sub>2</sub> 細胞は、4 回継代後 CPE は消失し、持続感染となり、その時の培養液中に産生された RV 力価は 2.80 で、以後 Table 4 に示すごとくウイルス産生を行ないながら 10 代、62 日にわたり維持された。これら持続感染 BeWo 細胞は形態、増殖度も非感染 BeWo 細胞とほとんど変わらなかった。

### 2) RV 感染と HCG 分泌能の関係、

Table 4. Rubella virus production and HCG-secreting activity of RV persistently infected BeWo cell cultures

culture cells	passage Nos. after RV inoculation	days after RV inoculation	CPE	titer of RV produced in the culture fluid ( $\log_{10}$ FFU/0.1ml)	HCG produced in the culture fluid ( $10^{-4}$ ng/cell)
BeWo-RV <sub>1</sub>	0	2	-	/	3.5
	1	7	+	4.52	
	2	14	+	4.10	
	3	19	-	3.22	
BeWo-RV <sub>2</sub>	0	4	-	/	2.8
	1	7	+	4.33	
	2	11	+	3.95	
	3	17	+	/	
	4	24	-	2.80	
	5	29	-	/	
	6	36	-	3.12	
	7	42	-	/	
	8	50	-	/	
	9	57	-	3.08	
10	62	-	3.20		

RV inoculation : MOI=5FFU/cell

RV 感染後 CPE 発現までの BeWo 細胞と、RV 持続感染 BeWo 細胞における、細胞増殖に伴う HCG 分泌能の変化を検討した。

i) RV 感染前に 35ng/ml であった産生 HCG 量は、感染後 2 日目には 10ng/ml にまで低下した。しかし、4 日目には 58.0ng/ml に、CPE 出現時 6 日目は 80ng/ml となった。これに対し、RV 非感染 BeWo 細胞では、産生 HCG 量は直線的に上昇し、6 日目には 200ng/ml を示した (Fig.10)。ところが、細胞の増殖は Fig.9 で示したように RV 感染、非感染細胞の間に CPE 出現時までは差を認めていない。従って、細胞 1 コあたりの HCG 産生量 ( $\times 10^{-4}$ ng/cell) に換算すると、RV 感染細胞では  $0.7 \sim 2.2 \times 10^{-4}$ ng/cell となり、非感染細胞の同じ増殖時期の  $3.8 \sim 7.4 \times 10^{-4}$ ng/cell より明らかに低値を示し (Fig.10)、RV 感染の影響が考えられた。

ii) RV 持続感染となった BeWo 細胞増殖と HCG 分泌能の関係を BeWo - RV<sub>2</sub>, 4 代継代 (感染後 24 日目) 細胞を用いて検討した (Fig.11)。

同じ条件で同時に培養した RV 非感染 BeWo 細胞を対照とし、グラフに示すと、細胞増殖率、分泌 HCG 値ともに両細胞の間で違いはなかった。細胞 1 コあたりの HCG 分泌能は、両細胞とも培養開始後 2 日目には約

$2 \times 10^{-4}$ ng, 6 日目には約  $5 \times 10^{-4}$ ng となった。

### III. RV 感染細胞における RT (reverse transcriptase) 活性の検討。

1. in vivo にて RV に感染した妊婦より得た絨毛細胞 (CR), 脱落膜細胞 (FR) の培養液中の RT 活性 (Table 5)。

培養 3 日目の CR の培養液中に 2380cpm の RT 活性が認められた。この値は control (growth medium) と比較して有意な値であった。しかし、17 日目の CR, および 3 日目の DR, FR では RT 活性を認めなかった。

2. in vitro にて RV を感染させた初代正常絨毛細胞 (CN - 1, - 2, - 3) における RT 活性 (Table 6)。

CN - 1 細胞において RV 感染後 7 日目より培養液中に有意の RT 活性を認め、RV 感染後 20 日目まで同様の活性を観察し得た。その値は、約 10000cpm/ $10^6$ cell で対照群 (非感染各細胞) の約 2 倍であった。しかし、他の 2 例 (CN - 2, CN - 3) においては CN - 3 でやや高い傾向を認めるのみで、CN - 1 細胞におけるがごとき有意さはなかった。

3. RV 感染 BeWo 細胞での RT 活性。

Table 5 に示すごとく、7 日目のみであるが、有意な上昇を認めなかった。

## 考 察

I. 本研究は RV の経胎盤感染の詳細を明らかにすることを目的として、細胞培養法を用いて行なわれた in vitro 実験である。

Parkman ら<sup>39)</sup>の、初代アフリカミドリザル腎細胞

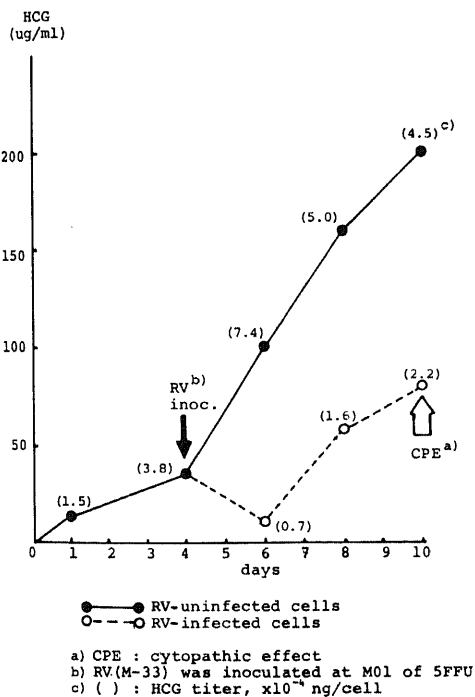


Fig. 10. Effect of rubella virus infection on HCG-secreting activity of BeWo cells

Table 5. RT(reverse transcriptase) activity in culture medium of in vivo RV-infected tissues cells and in vitro RV-infected BeWo cells

cells	RT activity (cpm/sup. of med: 5 ml)
in vivo RV-infected	
chorion	
CR (3d)	2380*
CR (17d)	848
decidua	
DR (3d)	628
fetus	
FR (3d)	776
in vitro RV-infected BeWo (7d)	723
growth medium	712

\* significantly high  
 ( ): days after infection

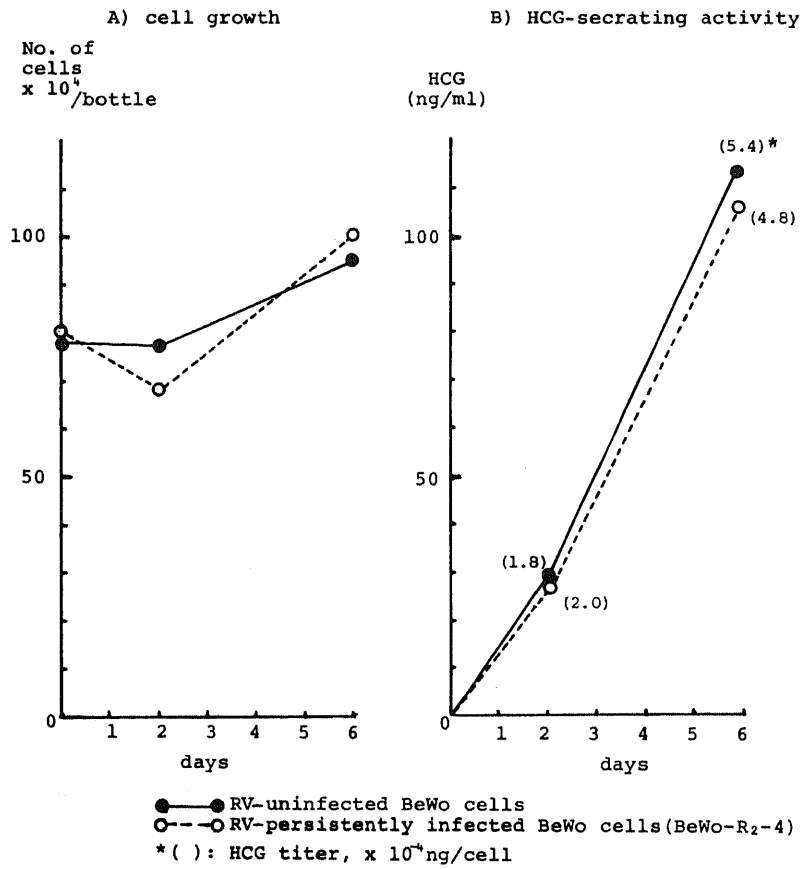


Fig. 11. Cell growth and HCG-secreting activity of rubell virus persistently infected BeWo cells

Table 6. RT (reverse transcriptase) activity in culture medium of in vitro RV-infected chorionic cells (CN)

cells	RT activity (cpm/ $10^6$ cells)	
	RV(+)	RV(-)
in vitro RV infected chorion		
CN-1 (0d)	4350	3870
(7d)	11470*	5300
(14d)	11510*	4910
(17d)	11050*	5620
(20d)	12120*	4400
CN-2 (0d)	3050	2395
(6d)	3730	3390
(14d)	3420	3420
CN-3 (0d)	3310	2505
(7d)	3805	3580
(14d)	5740	3960

\* significantly high  
( ): days after RV infection

(PGMK)でのRVによるecho-11 virusへの干渉成立の発見以来、Wellerら<sup>40)</sup>の、ヒト羊膜初代培養細胞(PHA)でのRV分離、さらにGünalap<sup>3)</sup>の樹立したアフリカミドリザル腎細胞におけるRV増殖が報告されるに至り、とかく困難視されていたRV分離、または増殖も近年比較的容易になってきた。その一連の仕事として、ペビーハムスター腎細胞(BHK-21)<sup>9)</sup>、ウサギ腎細胞(RK-13)、ベルベット腎細胞(Vero)なども、より容易なRV分離増殖系として今日よく使われている。本研究でもVero細胞、およびRK-13におけるCPEを利用してRV分離と力価測定を行なった。

胎児のCRS原因究明を目的とした実験では、Plotkinら<sup>2)</sup>のヒト胎児細胞におけるRV増殖実験がある。ヒト二倍体胎児細胞、特に肺細胞でRVはよく増殖するが、RV感染をうけた宿主細胞自身の増殖は抑制された。これに対し、fibroblast様の皮膚細胞では態度が異なりRV持続感染状態とな、その宿主細胞の増殖にはほとんど影響しなかった。以上の結果より、ヒト胎児細胞におけるRV増殖には臓器組織特異性があり、また容易に持続感染の状態となり得ることが明らかにされた。Smithら<sup>41)</sup>はウサギ胎児軟骨の初代培養細胞を用いて、in vitroにおけるRV持続感染系の樹立に成功した。彼らはまた、感染細胞はepithelialな形態からfibroblast様になると述べている。Rawlsら<sup>4)</sup>もCRS胎児の腎、骨髄、肺、脾、甲状腺、臍帯をin vitroで培養することにより、RVを100%検出したが、各細胞は終始CPEを認めず、持続感染の状態にあり、その持続感染系樹立に成功している。以上の如く、RVはin vivoでもin vitroでも持続感染状態になり得ることが既にRVの特性として知られており、この現象がCRSの発生と関連していると考えられている。このように、RVと胎児細胞との関係については多くの研究があり、CRSの直接的または間接的原因として、持続感染の結果、細胞染色体における高頻度のbreakage<sup>6)10)</sup>や細胞分裂の抑制<sup>4)10)42)</sup>などがさらに知られている。

胎盤細胞のRV感染増殖の実験は、いまだ報告されていない。Tönduryら<sup>10)</sup>は病理組織学的に、CRSの場合絨毛上皮にcellular damageの結果と思われるsporadic fociを認め、RVの胎児への感染ルートは特にchorionが重要な役割を果しているらしいと述べている。さらに胎盤における炎症所見、あるいは母体のviremia消失後も、胎盤からRVが分離証明されたという報告も見うけられる。矢吹<sup>43)</sup>は、絨毛初代培養細胞でヒトサイトメガロウィルスの持続感染化に成功しているが、これからも絨毛細胞は一般にウィルス感受性に富むことが予想される。これら諸家の報告にかんがみ、著者は、RVの経胎盤感染を明確なものとするばさらにCRS

発生機序の解明に寄与すると考え、胎盤組織細胞へのRV感染実験を行なった。すなわち生体内in vivo(utero)およびin vitroでRVに感染した、または感染させた胎盤組織を、絨毛細胞、特にcytotrophoblastと母体側成分である脱落膜細胞にわけ、その各々の初代培養系を用いて本実験を行なった。

RVに感染した生体(妊婦)より得た絨毛細胞には、 $4 \log_{10}$  FFU/0.1ml未満ではあるが常にRVが検出され、その力価は同じ患者から得た胎児細胞のRV( $3 \log_{10}$  FFU/0.1ml未満)より常に大であった。脱落膜細胞からはRVを分離し得なかった。この事実はRVと絨毛細胞の強い親和性を示すものであり、また胎児細胞の場合と同様<sup>2)4)</sup>、生体内においては、絨毛細胞はRV持続感染状態となり易いことを示唆し、経胎盤感染の実態は“経絨毛、持続感染”であると考えられた。

これらRV持続感染絨毛細胞は、初めcytotrophoblastに特徴的な多形性のepithelial細胞であるが、継代を重ねる毎にfibroblast様になる。しかし、非感染絨毛細胞の形態も同様の経過を示すので、これはtrophoblastのin vitro実験において通常起こり得る現象であると思われ、胎児細胞で知られているようなRV感染の影響<sup>41)</sup>とは考えられない。細胞分裂に関しては増殖速度も正常絨毛と同程度であり、この点でも胎児細胞とは<sup>4)10)42)</sup>異なっている。

RV持続感染絨毛および胎児細胞より分離されたRVは、抗RV家兔血清にて、RV標準株M-33と同程度に中和され、RK-13細胞にて形成されるfocusもM-33と同じであり、抗原性およびその生物学的性質に特に差はないと考えられた。また、蛍光抗体法にてRVの局在を調べると、他の報告<sup>3)1)</sup>あるいはVeroまたは正常絨毛細胞におけるin vitro RV感染による自験例と同様、細胞質内に顆粒状の特異RV抗原を認めた。その蛍光陽性細胞は全体の約50%程度であり、本実験にて得られた細胞はcell populationの持続感染細胞で、他の報告<sup>41)</sup>(5~50%)とほぼ同様であった。

正常絨毛、脱落膜の初代培養細胞によるin vitro RV感染実験の結果は、in vivo(生体内)感染細胞の培養実験を裏付けるものであった。正常絨毛細胞にRV(M-33)を感染させると、6~7日目より比較的弱いCPEが出現し、 $4\sim 5 \log_{10}$  FFU/0.1mlのRVを放出するが、次第にCPEは消失し、細胞は修復され、持続感染細胞となった。持続感染状態でのRV力価は $3\sim 4 \log_{10}$  FFU/0.1mlであった。in vitroでも生体内と同様に持続感染状態となり得る点は、他の細胞を用いた実験報告と同じである。この持続感染細胞は対照の非感染細胞と比較して、形態、増殖率に違いはなく、in vivo感染によって得られた持続感染細胞と同様の性格を有し

ていた。なお、癌細胞ではあるが絨毛細胞の性格を有する安定した cell line である BeWo 細胞を用いて同様の実験を行なったところ、正常絨毛と同じく容易に持続感染となった。しかし、脱落膜細胞では CPE は終始認められず、RV も検出され得なかった。

以上より、胎盤組織では絨毛細胞が特に RV と親和性があり、持続感染が成立し易いと思われる。従って、RV の経胎盤感染は viremia となった母体血液が絨毛間腔まで至り、RV と親和性のある絨毛細胞 (trophoblast) に先ず感染し、速かに持続感染化することから始まると考えられる。このように、一たん絨毛細胞で増殖し、さらに持続感染化して放出される RV が二次的に胎児へ感染することが経胎盤感染の実態であり、これが胎児持続感染、さらには CRS と発展していく可能性が大きい。

一方、生体内における RV の胎盤および胎児への感染成立を母体および胎児の免疫能低下で説明する考え方が近年注目されるようになってきた。実際、母体の細胞性免疫の低下は、胎児側組織としての絨毛と、母体側組織としての脱落膜との間に存在する immunological barrier に介在すると考えられる種々の免疫抑制物質によるものであるという考え方もある<sup>14)</sup>。免疫抑制物質として、性ステロイドホルモン、HCG<sup>12)</sup>、human chorionic somatomammotropin (HCS) などがあげられている。また CRS 児では体液性、細胞性免疫不全がおこるとも言われ<sup>11)</sup>、RV 感染妊婦 T-cell の intrinsic dysfunction を認めたとの研究がある<sup>13)</sup>。さらに、RV の経胎盤胎児感染において interferon (IFN) の役割に注目する報告も近年増加しているが、いまだ明確な見解は確立されていない<sup>15)41)</sup>。RV 持続感染化に伴う本症発生機作の解明には、さらに多くの、多面的研究が必要であろう。

II. 絨毛細胞内 RV の増殖と HCG 合成能の関係について、: HCG は cytotrophoblast で合成されると言われており、絨毛細胞の重要なマーカーである。細胞内における RV 増殖と、細胞の HCG 合成能との間に何らかの相関があれば、経胎盤感染のメカニズムを究明するうえで一つの手掛りとなり得、さらに臨床応用も可能であると考え、検討を行なった。

初代絨毛細胞では、培養初期には比較的多くの HCG 産生分泌を検出できるが、継代培養を重ねるにつれ低下してくることが判明し、RV 感染との因果関係を見出すことはできなかった。従って、常に安定して多量の HCG を分泌している、樹立化した絨毛癌細胞 (BeWo) を用いて検討した。

RV 感染後、2 日目まで未だ CPE も出現しない初期に HCG 分泌能は急激に低下したが、その後は CPE 出現

までに再び次第に回復傾向を示すという興味ある現象が認められた。この事は、核あるいは細胞内機能のどこかに、感染初期の RV 合成と HCG 合成に必要な共通の場の可能性が示唆され、今後の問題である。臨床的には、RV 感染が妊娠初期に HCG 合成能を低下させるとすれば、それが妊娠初期の RV 感染による流産などの胎児異常につながる可能性も考えられ、同様に興味深い。

III. RV 感染と RT 活性との関係について: 逆転写酵素 (reverse transcriptase: RT) が動物の RNA 型腫瘍 virus (oncornavirus) に内在し、virus genome にコードされている事が判明して以来、ヒトにおいても RNA 型腫瘍 virus の関与の有無を検索する方法の一つとして、RT 活性の検出が利用されている<sup>32)~36)</sup>。一方、ヒトにおける RNA 型腫瘍 virus の存在はいまだ明らかではないが、幾つかの傍証的報告がある。Kalter ら<sup>37)</sup> は電顕的に正常ヒト胎盤 6 例中 4 例に C 型 RNA virus を見出ししている。他の哺乳動物では多くの報告があり、特に胎盤によく検出されるようである。

RV と C 型 RNA 腫瘍 virus との関係について、Satoh ら<sup>38)</sup> は RV 持続感染 BHK-21/wi-2 細胞より放出されている virus 粒子は RV と BHK 細胞の潜伏 virus (RNA 型腫瘍 virus) との hybrid であり、この事実は RV の持続感染細胞を確立するためには宿主細胞に潜在 virus が存在することが必須の条件であると述べている。

ヒト胎盤、特に絨毛細胞に C 型 oncornavirus が存在していると仮定すれば、絨毛細胞内で RV が内在 virus と hybrid をつくり、RV 変異株となり持続感染化するという考え方も成り立つわけである。今回の RV 経胎盤感染における研究において、RV 感染絨毛培養細胞の培養液中の RT 活性を測定したところ、in vitro、および in vivo RV 感染絨毛細胞で、それぞれ 1 例ずつ有意の RT 活性を認めた。BeWo、脱落膜、胎児の RV 感染細胞では活性を認めなかった。本データを一つの根拠とすれば、前述の如く、絨毛細胞中に C 型 virus が潜伏内在し、感染 RV がそれと hybrid をつくるに至った風疹変異株が、持続感染化し、さらには胎児の異常化に結びつくのではないかという仮説も成り立つ。これに関しては勿論、今后症例を増し、放出された virus の characterization も充分しなければならぬ。CRS 発生をこれまでとは異なった C 型 RNA 腫瘍 virus と RV との hybrid 形成という観点から考え得ることは大いに興味があり、またヒトにおける virus による発癌の問題にまで発展する可能性があり、今后さらに検討の価値のある問題であろう。

## 結 論

RVの経胎盤感染について検討する目的で主に絨毛細胞の培養系におけるRV感染の動態を追求し、以下の結論を得た。

1. *in vivo* (utero) RV感染妊婦由来絨毛培養細胞から、低力価のRVが常に分離されたが、培養細胞には外観上RV特異的CPEを認めず、生体内で持続感染化していると考えられた。同時に得られた胎児細胞では、より低力価のRVであったが同様の傾向を示した。しかし、脱落膜細胞からはRVを分離し得なかった。従って、RVは絨毛細胞に対する感受性が高く、RVの経胎盤感染の実態は“経絨毛、持続感染”であると推測される。

2. *in vitro*で正常妊婦由来絨毛培養細胞にRVを感染させると、比較的弱いCPEを認めるが、その後容易に持続感染化した。しかし、正常脱落膜細胞ではRVの増殖は認められなかった。これらの結果は、前記1.の結論を裏づけるものである。

3. 絨毛癌由来BeWo細胞を用いてRV増殖とHCG合成能の関係を検討した結果、宿主細胞のHCG合成能は、RV感染により感染初期に極めて抑制されるが、その後徐々に回復し、持続感染状態ではまったく影響をうけなかった。

4. *in vivo*および*in vitro*RV感染絨毛細胞培養液中に、それぞれ1例ずつ有意の逆転写酵素活性を認めた。その意義について、ヒト絨毛細胞内におけるC型RNA腫瘍ウィルス潜伏内在の可能性、RV感染によるその活性化、さらにCRSなどのRV感染による胎児異常化に結びつく可能性が論じられた。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った波田野基一教授、御教示、御鞭達を賜った桑原惣隆教授に深甚なる謝意を表します。

また、有益なる御助言、御指導を頂いた田中淳之助教授、RT測定に御協力を頂いた神谷茂先生に心から感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は、第33回日本産婦人科学会総会(1981年、新潟)にて発表した。

## 文 献

- 1) Gregg, N. M.: Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans. Ophthalmol. Soc. Aust.*, **3**, 35-46(1941).
- 2) Plotkin, S. A., Boué, A. & Boué, J. G.: The *in vitro* growth of rubella virus in human embryo cells. *Am. J. Epidemiol.*, **81**, 71-85(1965).
- 3) Günalp, A.: Growth and cytopathic effect on rubella virus in a line of green monkey kidney cells.

*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **118**, 85-90(1965).

4) Rawls, W. E., Melnick, J. L.: Rubella virus carrier cultures derived from congenitally infected infants. *J. Exp. Med.*, **123**, 795-816(1966).

5) Vaheri, A., Sedwick, W. D., Plotkin, S. A. & Maes, R.: Cytopathic effect of rubella virus in suspension culture. *Fed. Proc.*, **25**, 239-241 (1966).

6) Chang, T. H., Moorhead, P. S., Boué, J. G., Plotkin, S. A. & Hoskins, J. M.: Chromosome studies of human cells infected *in utero* and *in vitro* with rubella virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 236-243 (1966).

7) Desmyter, J., Rawls, W. E., Melnick, J. L., Yow, M. D. & Barrett, F. F.: Interferon in congenital rubella: Response to live attenuated measles vaccine. *J. Immunol.*, **99**, 771-777 (1967).

8) Plotkin, S. A. & Vaheri, A.: Human fibroblasts infected with rubella virus produce a growth inhibitor. *Science*, **156**, 659-661 (1967).

9) Downie, J. C. & Oxford, J. S.: Persistent rubella virus infection in hamster lung cells. *J. Gen. Virol.*, **5**, 11-17 (1969).

10) Boué, A. & Boué, J. G.: Effect of rubella virus infection on the division of human cells. *Am. J. Dis. Child.*, **118**, 45-48 (1969).

11) Cooper, L. Z.: Loss of rubella hemagglutination inhibition antibody in congenital rubella, failure of seronegative children with congenital rubella to HPV-77 rubella vaccine. *Am. J. Dis. Child.*, **122**, 397-403 (1971).

12) Adcock, E. W., Francois, T., August, C. S., Cox, S., Meschia, G., Battaglia, F. C. & Naughton, M. A.: Human chorionic gonadotropin: Its possible role in maternal lymphocyte suppression. *Science*, **181**, 845-846 (1973).

13) Thong, Y. H., Steel, R. W., Vincent, M. M., Hensen, S. A. & Bellanti, J. A.: Impaired *in vitro* cell-mediated immunity to rubella virus during pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, **289**, 604-606 (1973).

14) 堀 誠, 国分義行: 妊婦, 胎児, 新生児の感染症 (日本周産期医学研究会編), 231頁-247頁, 東京, 科学評論社, (1978).

15) Alford, C. A.: Immunoglobulin determinations in the diagnosis of fetal infection. *Pediatr. Clin. North. Am.*, **18**, 99 (1971).

16) Töndury, G. & Smith, D. W.: Fetal rubella

- pathology. *J. Pediatr.*, **68**, 867-879 (1966).
- 17) **Blanc, W. A.** : Pathways of fetal and early neonatal infection (viral placentitis, bacterial and fungal chorioamnionitis). *J. Pediatr.*, **59**, 473-496 (1961).
- 18) **Sever, J. & White, L. R.** : Intrauterine viral infections. *Annu. Rev. Med.*, **19**, 471-486 (1968).
- 19) **Levin, M. J., Oxman, M. N., Moore, M. G., Daniels, J. B. & Scheer, K.** : Diagnosis of congenital rubella in utero. *N. Engl. J. Med.*, **290**, 1187-1188 (1974).
- 20) **Alestig, K., Bartsch, F. K., Nilsson, L. A. & Strannegard, O.** : Studies of amniotic fluid in women infected with rubella. *J. Infect. Dis.*, **129**, 79-81 (1974).
- 21) 吉田浩介 : 羊水炎, 胎盤炎—先天感染成立の機序. *周産期医学*, **10**, 1781-1786 (1980).
- 22) **Greenberg, M., Pellitteri, O. and Barton, J.** : Frequency of defects in infants whose mothers had rubella during pregnancy. *J. Am. Med. Assoc.*, **165**, 675-678 (1957).
- 23) **Rundle-Short, J.** : Maternal rubella (The practical management of a case). *Lancet*, **2**, 373-378 (1964).
- 24) **Pattillo, R. A. & Gey, G. O.** : The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblast cells in vitro. *Cancer Res.*, **28**, 1231-1236 (1968).
- 25) **Thiede, H. A.** : Studies of the human trophoblast in tissue culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **79**, 636-647 (1960).
- 26) **Tao, T. & Hertig, A. T.** : Viability and differentiation of human trophoblast in organ culture. *Am. J. Anat.*, **116**, 315-327 (1965).
- 27) 杉浦幸一, 桑原惣隆 : ヒト絨毛培養細胞における風疹 virus 感染実験—CPE の発現および C 型 virus との関係について. *日産婦誌*, **33**, 1589-1590 (1981).
- 28) **Matsumura, T., Nitta, K., Yoshikawa, M., Takaoka, T. & Katsuta, H.** : Action of bacterial neutral protease on the dispersion of mammalian cells in tissue culture. *Jap. J. Exp. Med.*, **45**, 383-392 (1975).
- 29) **Nawa, M.** : Focus formation by rubella virus in rabbit kidney (RK-13) cell cultures and its application to the virus titration. *Arc. Virol.*, **60**, 75-78 (1979).
- 30) **Coons, A. H. & Kaplan, M. H.** : Localization of antigen in tissue cells II. improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, **91**, 1-12 (1950).
- 31) **Woods, W. A., Johnson, R. T., Hostetler, D. D., Lepow, M. L. & Robbins, F. C.** : Immunofluorescent studies of rubella-infected tissue cultures and human tissues. *J. Immunol.*, **96**, 253-260 (1965).
- 32) 小野克彦, 伊藤洋平 : RNA ウィルス関連酵素の測定. *医学のあゆみ*, **106**, 437-445 (1978).
- 33) **Lieber, M. M., Sherr, C. J. and Todaro, G. J.** : S-tropio murine type-C viruses: Frequency of isolation from continuous cell lines, leukemia virus preparations and normal spleens. *Int. J. Cancer*, **13**, 587-598 (1974).
- 34) **Sarin, R. S., Friedman, B., and Gallo, R. C.** : Purification and characterization of Baboon endogenous virus DNA polymerase. *Biochi. Biophys. Acta*, **479**, 198-206 (1977).
- 35) **Temin, H. M. & Mizutani, S.** : RNA-dependent DNA polymerase in virions of rous sarcoma virus. *Nature*, **226**, 1211-1213 (1970).
- 36) **Spiegelman, S., Burny, A., Das, M. R., Keydar, J., Schlom, J., Trávnicek, M. & Watson, K.** : Synthetic DNA-RNA hybrids and RNA-RNA duplexes as templates for the polymerases of the oncogenic RNA viruses. *Nature*, **228**, 430-432 (1970).
- 37) **Kalter, S. S., Helmke, R. J., Panigel, M., Fowler, A. K., Strickland, J. E. & Hellman, A.** : Brief communication : C-type particles in normal placentas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**, 1081-1084 (1973).
- 38) **Sato, M., Yamada, T., Yamamoto, K. & Yamamoto, N.** : Evidence for hybrid formation between rubella virus and a latent virus of BHK21/WI-2 cells. *Virology*, **69**, 691-699 (1976).
- 39) **Parkman, P. D., Buescher, E. L. & Artensen, M. S.** : Recovery of rubella virus from army recruits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 225-230 (1962).
- 40) **Weller, T. H. & Neva, F. A.** : Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella-like illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 215-225 (1962).
- 41) **Smith, J. L., Early, E. M., London, W. T., Fuccillo, D. A. & Sever, J. L.** : Persistent rubella virus production in embryonic rabbit chondrocyte



cell cultures. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **143**, 1037-1041 (1973).

42) Naeye, R. L. : Cytomegalic inclusion disease. Amer. J. Clin. Pathol., **47**, 738-744 (1967).

43) 橋本和予, 平山宗広 : 先天性風疹. 周産期医学, **80**, 1797-1801 (1980).

44) 矢吹朗彦 : ヒト初代絨毛培養細胞におけるヒトサイトメガロウイルス持続感染細胞の樹立とその意義. 日産婦誌, **32**, 1937-1944 (1980).

photographs legends

Fig. 3. : Morphology of cultured CR (A), DR (B) and FR (C) cells (X40). (A) 7 days; (B) 4 days; (C) 4 days.

Fig. 5. : Immunofluorescent staining of CR (A), DR (B) and FR (C) cells with rubella virus specific antibody (X1000). (A) 11 days; (B) 15 days; (C) 15 days.

Fig. 7. : Occurrence of rubella virus-specific CPE in cultured chorionic cells and Vero cells by rubella virus infection (X100). (A) chorionic cells (CN-1), CPE (-); (B) chorionic cells (CN-1), CPE (+), 6 days P. I. \*; (C) Vero, CPE (-); (D) Vero, CPE (+), 6 days P. I. \*P. I. : post infection.

Fig. 8. : Immunofluorescent staining of rubella virus-infected CN-1 cells by rubella virus-specific antibody (X1000). (A) 10 days P. I.; (B) 39 days P. I.

**Studies on Trans-placental Infection of Rubella Virus** Kohichi Sugiura, Department of Virology (Director: Prof. M. Hatano), Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 and Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. S. Kuwabara), Kanazawa Medical University, Uchinada, 920-02 — *J. Juzen Med. Soc.*, **91**, 42—61 (1982)

**Key words:** rubella virus, chorionic cell, trans-placental infection, persistent infection

#### Abstract

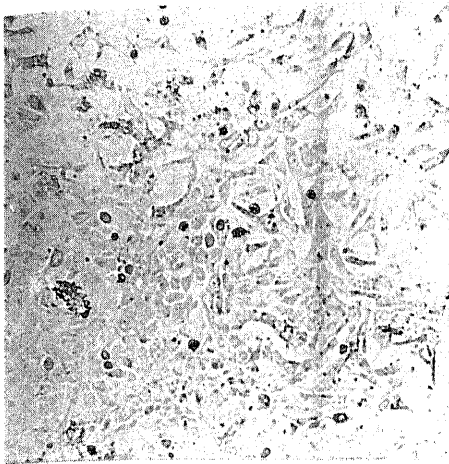
In the course of studies on congenital rubella syndrome (CRS), the placental-fetal infection with rubella virus (RV) was investigated in vitro in the human chorionic, decidual and fetal tissues obtained by artificial abortion from normal or RV-infected pregnant women having hemagglutination-inhibiting and complement-fixing RV antibodies (1:512 and 1:16).

RV was isolated from chorionic (CR) and fetal (FR) cells derived from RV-infected pregnant women and the neutralization test disclosed that the antigenical and biological properties were similar to those of the standard RV strain, M-33. These CR and FR cells showed a constant release of RV ranging between  $10^2$  and  $10^4$  FFU (focus forming unit)/0.1 ml into the culture media and a positive staining by immunofluorescent technique (IF) over 1-2 months, showing the RV persistent infection in these cells. However, decidual (DR) cells derived from RV-infected pregnant women were negative in the RV production and IF staining.

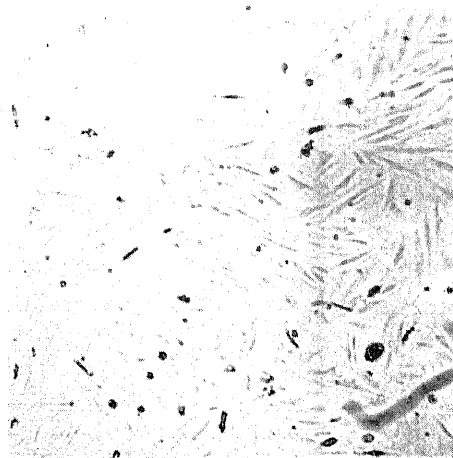
The RV infection in normal chorionic cells (CN) cultured in vitro resulted in an establishment of RV persistent infection but not in normal decidual cells (DN). Continuous production of RV and positive IF staining were also found in these RV-persistently infected CN cells. In the experiments of RV infection on another cell line, BeWo cells, derived from chorionic carcinoma, RV persistent infection similar to the above cases was easily established. In addition, human chorionic gonadotropin producing activity of BeWo cells was markedly suppressed during an early period of the RV infection, but it gradually recovered to normal levels. In an attempt to examine a possibility of activation of latent endogenous C-type RNA virus in the chorionic cells by the RV infection and to see its possible causative relation to a development of CRS, reverse transcriptase activity was measured. The activity was significantly high in a few cases of the culture media harvested from RV-infected CR or CN cell culture.

All these findings imply that the chorionic cells are highly susceptible to RV infection and are easily converted to the RV-carrier, but the decidual cells are not. The true mode of trans-placental RV infection seems to proceed, via an infection of the chorionic cells, to the subsequent establishment of the RV-carrier state.

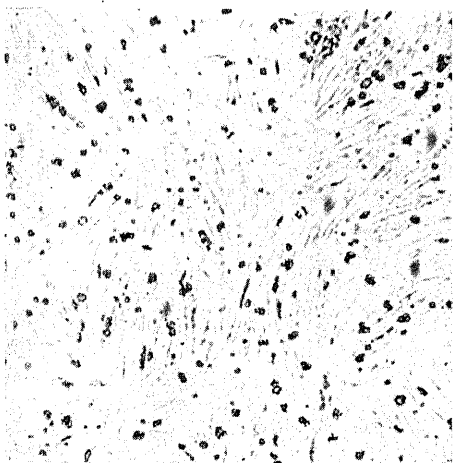
Fig. 3.



(A)

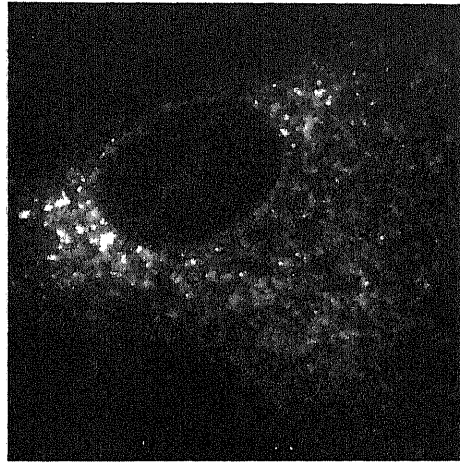


(B)

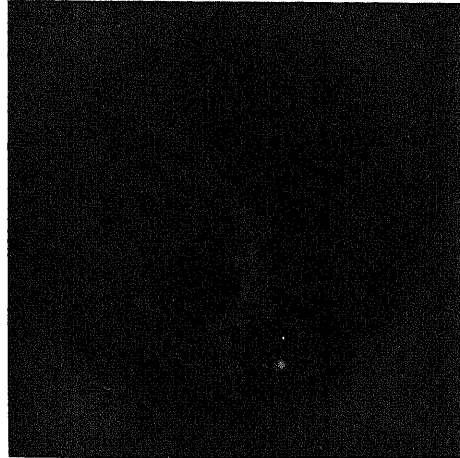


(C)

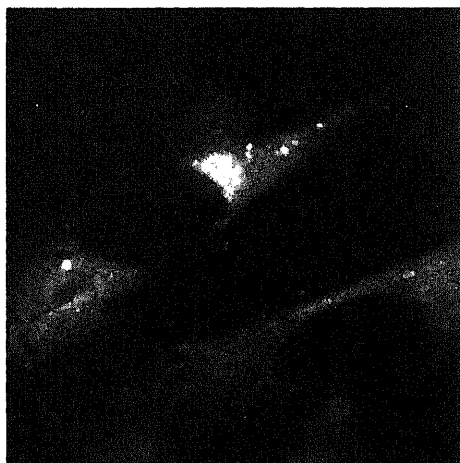
Fig. 5.



(A)

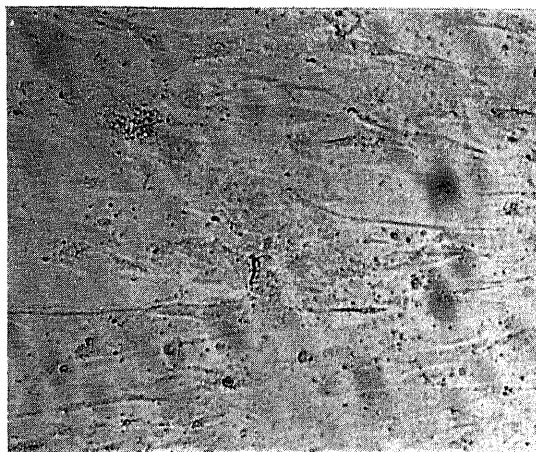


(B)

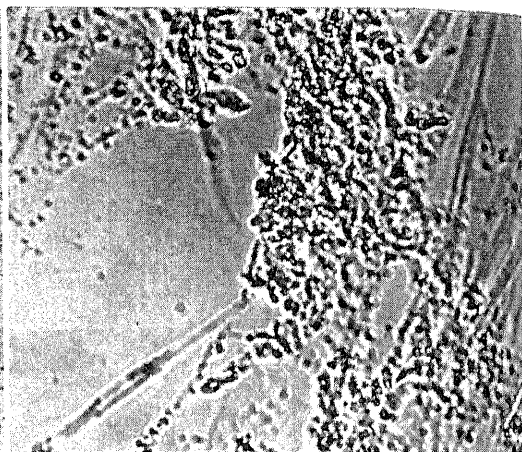


(C)

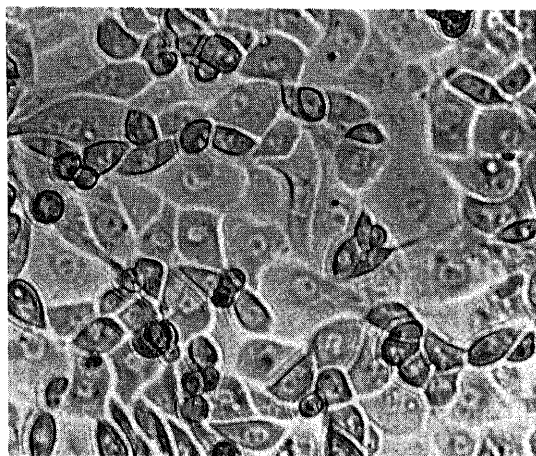
Fig. 7.



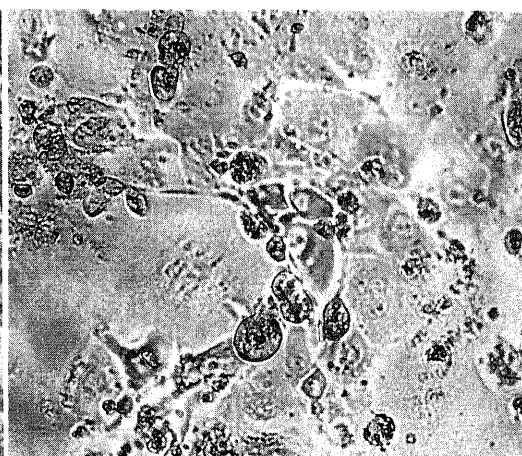
(A)



(B)

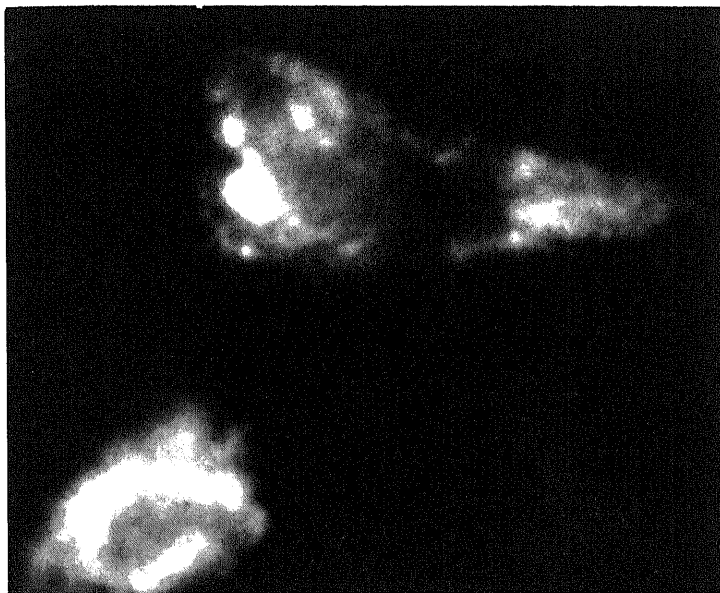


(C)

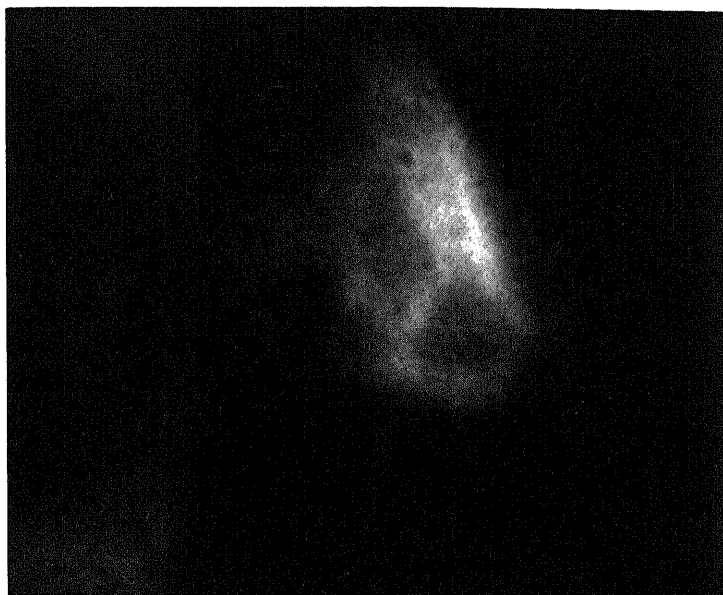


(D)

Fig. 8.



(A)



(B)