ウイルス感染の妊娠及び胎児に及ぼす影響

山 根 邦 男

日本医科大学 真柄産婦人科教室 (指導 真柄正直教授)

東京大学伝染病研究所第五細菌研究部 (部長 山本都夫教授)

〔受付: 7月13日1955年〕

Gregg¹⁾ が母体妊娠時、特に早期において風疹に感染すると多くの奇型を胎児に起すことを報告して以来、この問題は産科、小児科の領域において多くの関心を集めて来た。その後風疹の感染がもたらす奇型については、Albaugh²⁾ によつてまとめて報告されているし、又本邦においても詫摩³⁾ はこれに該当する1例を報告している。

風疹以外にも、小児麻痺⁴⁾ インフルエンザ^{5) 6)}、水痘⁷⁾、麻疹⁸⁾ 等のウイルスが胎児に奇型を起すと報告されている。

又実験的にもマウスにおいて、Lansing poliomyelitis⁹⁾、Murine poliomyelitis¹⁰⁾、Rickettsia prowazeki¹¹⁾、hog cholera^{12) 13)} 等が奇型を胎児にひき起すと報告されているし、孵化鶏卵を用いた研究もなされている。

然しながら、これ等の報告ではウイルスが直接胎児に到達し、病変を起すことは想像されていても実証を欠いている。

一方、他の部分におけるウイルス感染による何等かの毒性物質、或は胎児への栄養の阻害が二次的に胎児に病変を惹起する可能性も考えられる。例えば、妊娠動物或は孵化鶏卵に対するX線照射は、ウイルス感染によるものと似た奇型や、妊娠の停止を招来するし¹⁴⁾、又鶏胎においては無菌のヴィオン注射によつても病変が起る¹⁵⁾。しかしウイルスによる鶏胎の病変は、インフルエンザ、ニューキャッスル、ワクチニア、ヘルペス等では特異的な差は見られぬと云われている¹⁶⁾。

そこで著者は、胎児の病変はウイルスが直接胎児に作用を及ぼすものかどうか、又若し直接作用ならば、それは胎児組織中のウイルスの増殖によるものか、又は所謂ウイルスの増殖以外の今一つの特性、Cytotoxicity¹⁷⁾ によるものかを孵化鶏卵及び妊娠マウスを用いて実験考察を行つた。

実験材料及び実験方法

1. ウィルス

インフルエンザAウィルス (PR 8 株) は予研福見博士から対応する標準血清とともに分与をうけた。ED ウィルスは教室保存のもので、これ等2種類のウィルスは常時ドライアイス箱中に保存し、使用の際あらためて孵化鶏卵11日卵の尿膜腔に接種し48時間37°C培養した尿膜腔液を使用した。

2. 孵化鶏卵

伝染病所有指定の業者より一定のものを購入した。

3. マウス及び飼料

マウスは伝研飼育系(dd)を用い、オリエンタル酵母株式会社製固型飼料と水で飼育した。

4. Hemagglutination (以下 HA と略す)

Salk¹⁸⁾ の法により底面が正球形をなしている一定な小試験管に、0.85%食塩水にてウィルスの0.5 ml 2倍階段稀釈液を作り、これに0.25%ニワトリ血球浮遊液を0.5 ml 加え、よく振つて混合させてから室温に90~120分間放置して管底所見で判定した。

5. Egg Infecting Dose (以下 E.I.D. と略す)

各組織を無菌的に採取秤量して滅菌乳鉢に金剛砂を加えて磨碎し、滅菌0.85%食塩水で10%乳剤を作製、室温に暫らく放置して上澄をとり滅菌食塩水で10倍ずつ階段稀釈した。又尿膜腔液及び羊膜腔液はそのまゝ滅菌食塩水で10倍階段稀釈した。この各組織及び体液の稀釈液を1段階の稀釈に対し5個宛の孵化11日卵の尿膜腔内に0.25 ml ずつ注射し、37°C 48時間培養後尿膜腔液1 ml を採取し、これに3%のニワトリ血球浮遊液を1 ml 加えて室温に30分間放置してウィルス感染の有無

YAMANE Kunio: Experimental studies on the effect of the virus infection upon the pregnant animals and the embryonal tissues. The Department of Gynecology and Tokology, Nippon Medical College, and the Fifth Bacteriological Division of the Institute for Infectious Diseases University of Tokyo. — Jap. J. of Bact., 11(1), 31-35, 1956.

を判定した。その値から Reed Muench¹⁹⁾の方法に従い、卵に対する感染価の逆 log をとり E.I.D. 50 (50% 卵感染量) を計算した。

実験成績

I. 孵化鶏卵を用いた実験

1. 鶏胎に及ぼす致命作用

6 日, 10 日の發育鶏卵各々 20 個の卵黄囊内及び 10 日卵 10 個の尿膜腔内に, インフルエンザ A ウィルス (E.I. D. 10^{-7} HA 3200 倍) を (1 ml 中 400 単位のペニシリン G 及びストレプトマイシンを含む) 0.5 ml 接種し, 37°C

第 1 表 鶏胎に及ぼす致命作用

PR 8 E.I.D. 10^{-5} HA 3,200 倍 0.5 ml 接種

		24 時間	48 時間
卵黄囊内 接種	6 日 卵	30%	100%
	対 照	0 "	0 "
	10 日 卵	10 "	56 "
	対 照	0 "	10 "
尿膜腔内 接種	10 日 卵	20 "	40 "
	対 照	0 "	10 "

第 2 表 發育鶏卵の各組織及び体液におけるウィルスの分布

PR 8 E.I.D. 10^{-5} HA 3,200 倍 0.5 ml 接種

			6 日卵卵黄囊内接種		10 日卵卵黄囊内接種		10 日卵尿膜腔内接種	
			HA (倍)	E.I.D. ₅₀	HA (倍)	E.I.D. ₅₀	HA (倍)	E.I.D. ₅₀
24 時 間	生 卵	羊 膜 腔 液	40	6.75	160	6.25	320	5.5
		尿 膜 腔 液	320	7.75	5,120	7.5	2,560	7.0
		鶏 胎 (10%乳剤)	40	3.75	10	4.25	20	3.0
		卵 黄 囊 (10%乳剤)	2,560	6.2	640	5.5	10	5.0
	死 卵	羊 膜 腔 液	>10	2.8	200		>10	5.5
		尿 膜 腔 液	80	5.5	1,280	6.0	1,280	5.5
		鶏 胎 (10%乳剤)	20	3.2	10	1.33	10	>0.5
		卵 黄 囊 (10%乳剤)	2,560	6.75	1,280	4.25	10	3.75
	48 時 間	羊 膜 腔 液			5,120	7.75	5,120	7.5
		尿 膜 腔 液			2,560	5.2	2,560	5.0
		鶏 胎 (10%乳剤)			160	4.5	640	5.2
		卵 黄 囊 (10%乳剤)			640	5.8	640	5.8
	死 卵	羊 膜 腔 液	>10	5.25	2,560	8.5	5,120	8.2
		尿 膜 腔 液	160	6.0	2,560	4.75	5,120	5.0
		鶏 胎 (10%乳剤)	10	3.9	10	4.5	10	5.25
		卵 黄 囊 (10%乳剤)	5,120	6.5	2,560	4.8	5,120	4.75

で培養, 培養後 24 時間目並びに 48 時間目の生死を判定した。その結果は第 1 表に示すように, 6 日卵黄囊内接種では 48 時間後 100% 致死するが, 10 日卵では 56%, 尿膜腔内接種ではその致死率はさらに低くかつた。なお対照としては, 生理的食塩水を同量接種した。又死卵においては普通寒天培養で無菌試験を行つたが雑菌は認められなかつた。

2. 各臓器におけるウィルスの分布

ウィルスを卵黄囊内に接種した 6 日卵, 10 日卵の生卵及び死卵, 10 日卵尿膜腔内接種の生卵, 死卵について各々の羊膜腔液, 尿膜腔液, 鶏胎, 卵黄囊を別々に採取し

その各々について血球凝集反応及び E.I.D. を測定した。その結果は第 2 表及び第 1 ~ 第 3 図に示す。

ここに注目すべきは, いづれの場合でも鶏胎中のウィルス量が羊膜腔液, 尿膜腔液, 並びに卵黄囊のそれに比して少いことで, 特に 24 時間以内に死亡したものでは, 6 日卵でも 10 日卵でも共に鶏胎におけるウィルス量が著しく少いの羊膜腔液, 尿膜腔液, 並びに卵黄囊ではウィルスがかなり増殖しておることが認められたことである。

II. 妊娠マウスを用いた実験

dd 系マウス 7~8 週のもの雌雄各々 1 匹を 1 つのケー

第3表 妊娠マウスの各組織及び体液における
ウィルスの分布

PR 8 E.I.D.₅₀⁻⁵
ED E.I.D.₅₀⁻⁵ > 0.1 ml 静脈内接種

時間	妊娠 日数	組織及び体液	PR 8 E.I.D. ₅₀	ED E.I.D. ₅₀
1 時 間	5 日	妊娠子宮 (10%乳剤)	3.8	2.5
		肺 (10%乳剤)		2.5
		肝 (10%乳剤)		4.0
	10 日	羊 水	>0.5	>0.5
		胎 児 (10%乳剤)	>0.5	>0.5
		胎 盤 (10%乳剤)	2.7	1.8
		肺 (10%乳剤)		2.8
		肝 (10%乳剤)		2.75
	15 日	羊 水	1.1	>0.5
		胎 児 (10%乳剤)	>0.5	>0.5
		胎 盤 (10%乳剤)	2.5	2.25
		肺 (10%乳剤)		3.75
		肝 (10%乳剤)		3.0
48 時 間	5 日	妊娠子宮 (10%乳剤)	>0.5	>0.5
		肺 (10%乳剤)		3.75
		肝 (10%乳剤)		>0.5
	10 日	羊 水	>0.5	>0.5
		胎 児 (10%乳剤)	>0.5	>0.5
		胎 盤 (10%乳剤)	1.5	1.78
		肺 (10%乳剤)		4.0
		肝 (10%乳剤)		0.8
	15 日	羊 水	>0.5	>0.5
		胎 児 (10%乳剤)	>0.5	>0.5
		胎 盤 (10%乳剤)	2.2	1.75
		肺 (10%乳剤)		4.8
		肝 (10%乳剤)		0.8
1 時 間	対	非妊娠子宮 (10%乳剤)	3.8	2.25
		肺 (10%乳剤)		3.5
		肝 (10%乳剤)		3.9
	48 時 間	非妊娠子宮 (10%乳剤)	>0.5	>0.5
		肺 (10%乳剤)		3.75
		肝 (10%乳剤)		>0.5

デに入れ、24時間交配させ、その交配日より5日、10日、15日の3群に別け、1群は約50匹宛使用した。

そして各群のマウスにインフルエンザAウィルス及びEDウィルスを0.1 ml 宛静脈内接種を行い、接種後1時間、48時間に解剖して妊娠せるマウス各群5匹宛の羊

第1図 6日卵卵黄嚢内接種 PR 8 E.I.D.₅₀ 10⁻⁵
HA 3200倍 0.5 ml

(发育鶏卵の各組織及び体液におけるウィルスの分布)

第2図 10日卵卵黄嚢内接種 PR 8 E.I.D.₅₀ 10⁻⁵
HA 3200倍 0.5 ml

(发育鶏卵の各組織及び体液におけるウィルスの分布)

第3図 10日卵尿膜腔内接種 PR 8 E.I.D.⁻⁵
HA 3200 倍 0.5 ml

(発育鶏卵の各組織及び体液における
ウィルスの分布)

第4図 妊娠マウスの各組織及び体液に
おけるウィルスの分布

PR 8 E.I.D. 10⁻⁵ 0.1 ml 静脈内接種

水, 胎児, 胎盤を採取した。なお ED ウィルス接種群ではそれに加えて肺, 肝も同時に採取し, 対照として非妊娠マウスの子宮及び肺, 肝を取り出した。そしてこれら

第5図 妊娠マウスの各組織及び体液に
おけるウィルスの分布

ED E.I.D. 10⁻⁵ 0.1 ml 静脈内接種

の取り出した各臓器について E.I.D. を測定した。その結果は第3表及び第4～第5図に示す。

交配後5日目のマウスでは妊娠子宮から羊水, 胎児, 胎盤を分けて測定することが出来なかつたが, 10日, 15日ではそれぞれ分けて測定することが出来た。

その結果は子宮及び羊水, 胎児, 胎盤等におけるウィルスの増殖は証明されなかつた。又, 羊水, 胎児, 胎盤においては, 胎盤に著しくウィルスが存在するのに, これに反し羊水, 胎児におけるウィルスの量は, 注射後1時間でも48時間でも殆んど認められなかつたことは注目すべきであらう。

考 按

孵化鶏卵を用いた実験の結果から, 卵黄嚢に接種されたウィルスが或る程度は鶏胎に行き, ウィルスの直接作用によつて病変或いは死をもたらし事が推定される。ウィルスはさらに羊膜腔から尿膜腔に移つて夫々の所で増殖したと考えられる。

Howell によれば, インフルエンザ A ウィルス (PR 8 株) を羊膜腔内に直接注射した場合にも死を生ずると報告しているが, これは大量のウィルスが直接気道等から鶏胎に入る為と考えられるが, 著者の実験では, ウィルスは卵黄血管を通じて大量に鶏胎に至り, 所謂急性毒性死を遂げたものと考えられる。このことは6日卵の方が10日卵よりも致死率が高いこと, 卵黄嚢内注射の方が尿膜腔内注射より致死率が高いことからもうかゞわかる。その E.I.D. 測定の結果から見ても測定した鶏胎, 特に早期 (24 時間内) に死亡した鶏胎内のウィルスの量が少く, ウィルスが他の組織に比べて増殖していない事からして, 鶏胎に対する致命作用は所謂インフルエンザウィルスの Cytotoxicity によることが示唆される。

即ちウィルスの病原性は、ウィルスが細胞内で増殖する場合に勿論、増殖しなくても細胞内に取り込まれれば、その量によつて細胞に重大な障害を与えることは夙に Henle 等によつて指摘されて来たところであり、かかる現象がマウスの脳、肝細胞等に見られることが報告され、西岡、千賀²⁰⁾等はエーリッヒ腹水癌にも同様の作用のあることを報告している。この様なことが著者の実験においても鶏胎で証明され、それはウィルスの母体感染→Viremia→胎児のルートにより、直接的に大量のウィルスが胎児細胞に作用し、普通の意味のウィルスの増殖なしに胎児に障害を与えて致死せしめることを示している。

妊娠マウスを用いた実験で、胎盤中に大量のウィルスが証明されたにもかかわらず、胎児そのものからは証明されない事実は、胎盤がウィルスにより攻撃され、その結果胎盤に栄養障害を与え、二次的に胎児に病変を起す可能性のある事がわかつた。

従つて、ウィルスの感染による妊娠胎児に及ぼす影響は、単純にウィルスが胎児に感染して、ウィルスがその組織中で増殖する結果障害がもたらされるというよりは寧ろ、ウィルス自身の toxic effect (Cytotoxicity) 又、胎盤組織を通じての栄養障害という問題を考慮しなければならぬであろう。

此の問題は増殖するシステムが胎児より Neoplasma になつても当然考慮されねばならない問題であり、西岡等²¹⁾のウィルスの Oncolytic action に関する研究の所見と軌をいつにするものであり、ウィルスの特性として細胞内の増殖という以外のもう1つの重要な現象の要因となつてゐることは、今後のウィルス等における研究分野として注目されねばならぬであろう。

結 論

1. インフルエンザAウィルス (PR 8株) (E. I. D. 10⁻⁵) を6日卵及び10日卵の卵黄嚢内に注射すると、6日卵では100%、10日卵では56%の致死率を48時間後に示した。その際の鶏胎におけるウィルスの E.I.D. 価は羊膜腔液、尿膜腔液、卵黄嚢に比し極めて低い。

2. 妊娠マウスにインフルエンザAウィルス及び ED ウィルスを静脈内に注射して各臓器におけるウィルスの量を測定した結果、胎児及び羊水ではウィルス量は極めて少く、これに反し胎盤では非常に多量のウィルスが認められた。然しながらいずれも肺におけるような著明なウィルスの増殖は認められなかつた。

3. 妊娠及び胎児に及ぼすウィルス感染の影響は、ウィルスの胎児組織における単なる増殖のみにその原因が帰せられず、寧ろウィルスの Cytotoxicity 及び胎盤のウィルス侵襲による栄養障害という因子を考慮すべきであろう。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師真柄教授、東京大学羽里教授並びに東京大学伝染病研究所第五細菌研究部の西岡、千賀両先生はじめ教室員諸氏に深甚なる謝意を表す。

尙お、本研究は文部省科学研究費による。

文 献

- 1) Gregg, N. M.: Tr. Ophth. Soc. Australia, 3, 35, 1942.
- 2) Albaugh, C. H.: J. A. M., 129, (11) 719, 1945.
- 3) 詫摩: 東京医事新誌, 66, 22, 昭 24 (1949).
- 4) Baker, M. E. & Baker, I. M.: Minn. Med., 30 (7), 729, 1947.
- 5) Harris, J. W.: J. A. M. A., 72, 978, 1919.
- 6) Bland, P. B.: Am. J. Obst. & Gynec., 79, 184, 1919.
- 7) Ayeock & Ingall: Am. J. Med. Sci. 212, 366, 1945.
- 8) Mitman: Practitioner, 167, 241, 1951.
- 9) Byrd, Jr. C. L.: J. Neuropath. & Exper. Neurol., 9, 202, 1950.
- 10) Knox, A. W.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 74, 792, 1950.
- 11) Giroud, A., Giroud, P., Martinet, M. & Vargues, R.: Bull. Soc. Path. Exot., 44, 563, 1951.
- 12) Young, G. A.: J. A. V. M. A., 12, 394, 1952.
- 13) Sautter, J. H., Young, G. A., Luedke, A. J. & Kitchell, R. L.: Proceedings Book A. V. M. A. Meeting, 1953. In press.
- 14) Howell, J. E., Winters, L. M. & Young, G. A.: J. Imm., 71, 280, 1953.
- 15) Conference on Radiation Biology at Oak Ridge National Lab., 1952.
- 16) Brothlesion Smith et al.: Lancet, ii, 1189, (1951).
- 17) Henle, W. & Henle, G.: J. Exp. Med., 84, 623, 1946.
- 18) Salk, J. E.: J. Imm., 49, 87, 1944.
- 19) Reed, L. J. & Mnench, H.: Amer. J. Hyg., 27, 493, 1938.
- 20) Chiga, M. & Nishioka, K.: Japan. J. Exp. Med., 24, 211, 1954.
- 21) 印刷中.