

## シンポジウム 2 母子感染の診断と対応

パルボウイルス B19母子感染  
—胎児水腫の発症機転を中心に—

東北大学講師 八重 樫 伸 生

## 目 的

パルボウイルス (B19) の母子感染は胎児水腫 (以下 NIHF) や子宮内胎児死亡などを引き起こすことがあり、1984年の最初の症例報告以来注目されている。母体から胎児への胎内感染率は24%、実際に NIHF や子宮内胎児死亡などが起こるのは感染時期が20週未満の場合約12%と推測される。また従来原因不明とされていた NIHF 症例の約20%が B19によるものであろうとされている。B19母子感染による NIHF 発症のメカニズムは胎児赤芽球への感染とその破壊による重症貧血、心不全が主であろうと臨床的に推測されているが、B19ウイルスの安定した感染系が確立されていないため発症機転に関する実験的な裏付けがなされていない。

一方、母子感染で胎児障害の起こる病原体としては風疹ウイルスやサイトメガロウイルスなどがあり疫学や臨床像については比較的よく知られているが、その障害発生の分子機構に関しては残念ながらほとんど何も解明されていないのが現状である。近年、例えばヒトパピローマウイルス (HPV) やエイズウイルス (HIV) などさまざまなウイルスにおいて、ウイルスが宿主細胞のアポトーシス機構を巧妙に操作することにより自身の複製や増殖に役立てており、それが病態や症状と密接に関連していることが解明されてきた。しかし母子感染の領域ではこのような関連性について言及している研究報告はまだないようである。

そこで B19母子感染に関する疫学的調査から研究を始め、NIHF 発生のメカニズムについて検討し、さらに予防法や治療法についても研究をすすめた。

## 方 法

1. 疫学調査：1987年以来宮城県内の伝染性紅斑の患者数を小児科の協力で毎月サーベイした。一方同時期に NIHF 症例を集積し母体血清と胎児血清を収集した。2. meta-analysis：東北大学およびその関連病院で経験した B19母子感染例および文献から B19による NIHF 例を集め臨床的に解析した。3. *in vitro* 感染系：肝造血期にある胎児肝組織より赤芽球系細胞を分離回収し B19ウイルスを感染させた。感染細胞中の B19の増殖をわれわれの作製した単クローン抗体 (PAR3) を用いた間接免疫蛍光抗体 (IF) 法でウイルス抗原の発現を検出し、またドットプロットハイブリダイゼーション (DBH) 法でウイルス DNA の増加を解析した。また B19抗体陽性血清をウイルスと前処理することにより感染中和試験を施行した。さらに TUNEL 法およびアガロース電気泳動法を施行し感染細胞のアポトーシスを検出した。なお流産胎児の組織を実験に使用するにあたり本学倫理委員会の承認を得た。4. B19母子感染によって死産となり剖検した組織を収集し TUNEL 法で検討した。5. B19遺伝子がコードする非構造蛋白 NS1を細胞株 K562と UT7に遺伝子導入し、安定して NS1蛋白を誘導発現する系を確立し、NS1蛋白のアポトーシス誘導を検討した。

## 成 績

1. 疫学：原因不明の NIHF 44例中 5例 (11%) で B19が原因と診断された。これら B19に起因する NIHF 症例のほとんどが伝染性紅斑の流行期間中に発生していた。2. NIHF になりやすい母体感染時期の推定：B19による NIHF と診断された165例で meta-analysis を施行したところ、診断された妊娠週数は17週から28週の間全体

80%以上が集中し、症状発現から NIHF と診断されるまでの期間は平均6週間であった。これらのデータから B19で NIHF になりやすい母体感染時期は妊娠11週から22週と推定され、これは胎児肝造血期にほぼ一致していた。3. 胎児赤芽球への感染と細胞死の機構：肝組織より分離した赤芽球系細胞に B19を感染させるとウイルスが増殖し感染効率は骨髄の赤芽球系細胞よりも良好であった。さらに感染細胞数は時間経過と共に死滅減少し培養上清中には感染力のあるウイルスが産生された。PAR3を用いた IF 法では感染翌日から B19 抗原が感染細胞に発現し4日で蛍光抗体陽性細胞数がピークに達した。蛍光抗体二重染色法では感染細胞はすべて赤芽球系であった。DBH 法で B19 DNA 量を半定量とすると感染細胞の割合は感染4日まで増加したが以後細胞が死滅すると共に減少し感染により、培養上清中には B19 DNA が次第に蓄積された。感染2日以後から PAR3陽性細胞の核が TUNEL 法でも染色されその割合は時間経過と共に増加した。さらにこの感染細胞から DNA を抽出してアガロース電気泳動にかけると DNA の断片化が観察された。4. *in vivo* のアポトーシス：上記のような *in vitro* の現象が生体内でも起こっているかどうかを知るため B19 母子感染によって死産となり剖検した組織を検討した。HE 染色では8例全例で B19感染細胞に特徴的な好酸性のスリガラス様の核内封入体をもつ赤芽球が観察された。この細胞は PAR3に強陽性に免疫染色され TUNEL 法でも陽性となった。すなわち母子感染した胎児組織でも感染赤芽球がアポトーシスを起こしていることを確認した。5. 非構造蛋白 NS1を赤芽球系細胞株に発現させると細胞の生存率は減少した。野性型 NS1誘導発現した細胞では TUNEL 陽性で DNA の断片化も観察されたが変異 NS1蛋白を発現させた場合にはこのような現象は観察されなかった。6. B19母子

感染の予防法として受動免疫(免疫グロブリン投与)の有効性を検討するために、ウイルスをヒト血清と前処理してから感染実験を施行した。B19抗体陰性血清では感染が成立したが抗体陽性血清では感染が完全に中和された。すなわち、免疫グロブリンの投与が母子感染を防御しうることを基礎的実験で明らかにした。7. NS1発現誘導株を用いた実験で、Bcl-2を細胞に強制発現することによりアポトーシスは抑制され、また caspase 3の阻害剤でも抑制された。将来的にこのようなアポトーシスの情報伝達系を阻害することによって NIHF 発生を予防する道が開かれた。

### 結 論

胎生期の造血では時期により造血の場所が、卵黄囊から肝臓そして骨髄へと移り、それぞれの部位での造血の分子機構は若干異なっている。B19は赤芽球系細胞を主な感染宿主としているが、赤芽球の分化過程でもごく限られた時期にしか感染しない。このような非常に狭い宿主選択性には細胞側の因子が重要と考えられており、肝造血期にある赤芽球系細胞が B19の増殖に非常に効率よい増殖産生場となりうることを疫学的にもまた実験的にも示された。また感染細胞がアポトーシスを起こして細胞死に至ることが実験的に示され、B19による胎児造血の障害が胎児の重症貧血を起こし NIHF に至る主因であろうという臨床的推論を裏付けた。さらに感染細胞内ではウイルス蛋白の一つ(NS1)が細胞のアポトーシスの情報伝達経路を動かすことによって、感染細胞をアポトーシスへと誘導すると考えられた。一方で母子感染が成立しても胎児障害を起こさないこともあり、感染細胞内では B19によるアポトーシスを抑制する何らかの機構が働いている可能性が示唆された。また感染成立からアポトーシスが起るまでの過程を制御することによって臨床的に NIHF の発症を予防できる可能性が示された。