

## 論文の内容の要旨

### **Study on placental infection of influenza virus A(H3N2) using immortalized human first trimester trophoblast cell lines**

ヒト初期絨毛細胞株を用いたインフルエンザウイルス

### **A(H3N2)の胎盤感染の研究**

指導教員 水口 雅 教授

東京大学医学系研究科国際保健学専攻博士後期課程

平成 19 年 4 月入学

トリン ズィ クアン

氏名: Trinh Duy Quang

### はじめに

季節性インフルエンザの主要標的臓器は上気道であるが、脳症を含め生命予後に影響を与える合併症を起こすことがある。周産期領域では妊娠中にインフルエンザウイルスに感染した場合、過去に起きたパンデミックでは妊婦の死亡率は高率であった。軽症であっても、流・早産や子宮内胎児死亡が増加すること、児が思春期以降に統合失調症を発症するリスクが4〜7倍に増加することが知られている。実験的にも妊娠マウスにインフルエンザを接種することで仔マウスの行動異常が誘起されることが報告されているが、病理組織学的には変化が見られた中枢

神経系を含む仔マウスの臓器にインフルエンザ RNA は検出されないこと、また、インフルエンザウイルスは胎盤を通過しないことから、炎症性サイトカインを介した病態が想定されるが詳細な機序は不明である。

私は胎児と母体を隔てる胎盤がインフルエンザウイルスの標的臓器になる可能性があると考え、不死化したヒト浸潤絨毛細胞株 HTR8/SVneo (H8) および Swan71 (Sw. 71) にインフルエンザウイルスを *in vitro* で感染させ、その複製と感染細胞の動態を検討した。併せて浸潤絨毛が母体の免疫学的攻撃を免れるうえで重要な HLA-G の発現を検討した。

## 対象と方法

### 細胞

ヒト初期絨毛細胞株 Sw.71 と H8 は Yale 大学より分与され、各々10%FCS 加 DMEM (Sw.71) 、 RPMI 1640 (H8)で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。

### ウイルスとその感染

季節性インフルエンザウイルスの実験に頻用されるインフルエンザ A/Udorn/307/72 (H3N2) は日本大学微生物学教室において維持している株を用いた。ウイルスは有精鶏卵あるいは MDCK 細胞株で増殖させ、プラーク法で定量した。

上記細胞を 6 穴プレートに( $2 \times 10^5$ /well)の細胞密度で培養し、ウイルスを MOI5 の濃度に調整したウイルス MOI5 を接種した。37 °C, 40 分吸着後培養液を交換し 8, 24, 48 時間培養した。陰性対照として 56 °C, 30 分処理したウイルス液を用いた。アポトーシス誘導の陽性対照は Actinomycin D (1  $\mu$ g/ml)を用いた。

### 蛍光抗体法によるウイルス感染細胞の観察

H8 あるいは Sw.71 細胞をガラスカバースリップ上で培養し、同様に MOI5 でウイルスを感染させた。一定時間後 4% パラホルムアルデヒドで固定し、ウサギボリクローナル抗 Udorn 血清(1:1000)で処理し、さらに Alexa 488 をラベルした抗ウサギ IgG 抗体で染色し蛍光顕微鏡で観察した。

### Hemagglutination HA 活性の測定

培養液を PBS で段階希釈し、通常の方法に従って HA 活性を測定した

### RNA の抽出と RT-PCR

培養細胞より TRIZOL<sup>®</sup> により RNA を抽出し、逆転写の後に ABI Prism<sup>™</sup> 7500 によりリアルタイム PCR でウイルス RNA を定量した。

### アポトーシスの検出

Annexin V のフローサイトメトリーによる染色性ならびに ApoStrand<sup>™</sup> による 1 本鎖 DNA の検出を行った。

### フローサイトメトリーによる HLA-G の定量

FACScalibur ( Becton Dickinson Biosciences, Mountain View, CA) により HLA-G 発現レベルを定量した。

## 統計処理

Fisher 検定  $P < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結果

インフルエンザ A (H3N2) はヒト不死化絨毛細胞株で複製する

H8, Sw.71 いずれの細胞株も、接種 8、24 時間の時点で核、細胞質にインフルエンザウイルス抗原が強く染色された。不活性化ウイルスや PBS による陰性対照では染色は見られなかった。また、24 時間の時点で培養液中にインフルエンザウイルス HA 活性が観察された。ウイルス RNA の複製はリアルタイム PCR でも確認できた。蛍光顕微鏡下でヘキスト染色された核に断片化が見られたため感染により誘発されたアポトーシスが疑われた。

## アポトーシスの証明

アポトーシスを証明するため、細胞の Annexin V 染色と 1 本鎖 DNA の検出を行ったところ、インフルエンザウイルス感染 8 時間よりアポトーシスの出現が見られた。

**HLA-G 発現は変化しない**

多くの妊婦ウイルス感染症で、胎盤の HLA-G 発現が低下するために拒絶が生じる。インフルエンザでも同様の現象が生じるや否を検討するためフローサイトメトリーを行った。その結果、いずれの細胞株でも感染による HLA-G 発現の変化は認められなかった。

## 考察

本研究において私は不死化ヒト初期浸潤絨毛細胞株 Sw.71 と H8 がインフルエンザウイルス A H3N2 に感受性があることを明らかにした。一般には呼吸器と消化管上皮のみがインフルエンザウイルス複製の場として知られており、*in vitro* での胎盤への感染、とくに extra villous trophoblast (EVT) への感染は 2009 年 10 月現在、PubMed で検索可能な医学雑誌では、初めての知見である。ヒトの胎盤は血絨毛細胞胎盤の中でも EVT が深く浸潤することが特徴である。 サイトメガロウイルスやアデノウイルスでは感染した絨毛細胞が浸潤障害をきたすことが流産や早産の原因となると考えられている。私の実験結果からインフルエンザウイルス感染でも同様の機序が働いている可能性が示唆された。妊娠後半期でも母体血管壁に絨毛細胞が浸潤し続けることで局所の血流が増大し胎児胎盤への血流が担保される。このことがヒトの脳の発達に必須と考えられている。したがって、インフルエンザウイルスが EVT の浸潤を抑制することが、中枢神経の発達に必要な時

期に胎盤への母体血流を低下させることに病態形成に重要な意義がある可能性がある。

一般に季節性のインフルエンザは気道もしくは消化管に限局した感染症であり、ウイルス血症を来すことはないと考えられている。しかしながら、近年症状を発現する前に一過性にウイルス血症を来す例が少なくないこと、とくにパンデミック時には胎盤におけるウイルス感染やさらに子宮内における経胎盤感染があることが報告されている。おそらく通常の季節性インフルエンザでは既に獲得した免疫系と交差反応によりウイルス血症が抑制されるかあるいは速やかな中和抗体誘導が生じるのに対し、パンデミック時には一定の頻度でウイルス血症と胎盤への感染が生じる可能性が示唆される。

本研究の骨子となった成果を *American Journal of Reproductive Immunology* に投稿した後、新型インフルエンザ (H1N1) のパンデミックが発生した。幸いなことに、現時点での毒性は従来 of 季節性インフルエンザと大差ないようであるが、妊婦におけるリスクはまだ未知の点が多い。私は現在、H1N1 新型ウイルスを用いた実験を継続しており、本研究における結果とほぼ同一の知見を得ている。この事実は妊婦においてもワクチン接種と抗ウイルス薬を躊躇なく使用するべきであるという日本産科婦人科学会や日本感染症学会の見解を基礎的に裏付けるものと考えている。