The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	口唇口蓋裂発生原因としての風疹ウィルスに関する血清疫学的および実験奇形学的研究
Author(s)	菅原, 利夫
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/30722
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

主論文

原著

主論文題目

口唇口蓋裂発生原因としての風疹ウイルスに関する血清疫学的および実験奇形学的研究

大阪大学大学院歯学研究科
歯学臨床系口腔外科学専攻
指導教官：川勝賢作教授

増原利夫

コクヨ 20×20

緒言

口唇口蓋裂の発生要因として，遺伝因子[1~4]及び環境因子[5~8]について現在まで多くの調査研究がなされてきたが，未だ一定の見解に至っていない。この研究においては当該奇形の発生要因を解明する目的で，一般に奇形の原因となると考えられている風疹ウイルス（RV）[9~12]，ムンプスウイルス（MV）[13~16]，ヘルペスシンプレックスウイルス（HV）[17~19]，トキソプラズマ感染[20~22]をとりあげ，これらの感染が口唇口蓋裂発生要因となりうる可能性について血清疫学的調査を行い，それに基づいて動物実験を行ったものである。

RVについては1941年Gregg[9]が妊娠中に風疹に感染した母親より，先天性風疹症候群が多数発生した事を報告して以来，妊娠中の風疹感染は奇形を発生させる事が明らかとなった。MVに関しては，動物実験では奇形仔を発生する[13]が，人体の催奇形作用についてはまだ充分に解っていない。人体では本症妊

婦は流産，早産をきたす事があり[16]，本症感染妊婦が奇形児を出産したとの報告[14-16]もみられるが，一方では，本症は奇形の原因とならないとの報告[24]も認められる。HVは妊娠中に母体が感染すると，胎盤も感染を起こす事があり，流産，死産になる事[19]がある。しかしHV感染による奇形発現の報告はあまり認められない[23]。Tpは妊娠初期の感染では流産が起こる[25]，中期および後期の感染では先天異常の発生をみる事が多い[20~22,25]。なお同感染によって起こる先天異常は神経型として，脈絡網膜炎，脳内石灰沈着，水頭症，小頭症が，全身型として肝脾腫，黄疸，発熱，貧血等が報告[22]されている。以上の催奇性またはその疑いのもたれているRV，MV，HV，Tpに対する患者の抗体調査を行なった結果，特に口唇口蓋裂患者におけるRVのHI抗体保有率が正常小児に比べ著しく高い値を示す事，また現在までに報告された先天性風疹症候群を有する患者に口唇口蓋裂の発生が認められる事[9,26,27]より，風疹感染

が口唇口蓋裂発生要因として関与している可能性が示唆された。そこでマウスを用いた動物実験により，妊娠マウスに実験的にRVを感染させ，RVがマウス胎児に口唇口蓋裂を発生させる催奇性があることを明らかにすると共にマウスにおけるRVの垂直感染の成立をウイルス学的，血清学的に検討して得た結果をここに報告する。

材料及び方法

1) 被検血清：1969年3月より1972年6月までに大阪大学歯学部附属病院口腔外科を訪れた生後3週より2才までの口唇口蓋裂患者204名とその母親（年令18才より40才）より，臨床検査のため採血されて得られた血清の一部を使用した。口唇口蓋裂患者の症型別分類，男女の性比は表－1に示した如く，口唇裂は男性25人，女性15人，口蓋裂は男性17人，女性16人，口唇口蓋裂は男性74人，女性57人の合計204人であった。

口唇口蓋裂患者の対照として1969年7月より1972年9月までに，大阪大学医学部附属病院，新千里病院小児科，大阪大学歯学部附属病院口腔外科を訪れた生後2週より2才までの，先天奇形を持たない小児40名より臨床検査のため採血して得られた血清の一部を使用した。また一般妊婦の血清として，1970年4月より1972年6月までに，大阪府富田林保健所管内の妊婦3ヶ月から6ヶ

月までの妊婦100名（年令18才より40才）より，一般妊婦検診のため採血して得た血清の一部を使用した。口唇口蓋裂患者及びその母親そして対照としての正常小児，妊婦の年令別分布は表－2の如くである。即ち口唇口蓋裂患者と正常小児においては0才より1才までがそれぞれ約40%，1才より2才までがそれぞれ約60%でほぼ同様の年令分布を示していた。口唇口蓋裂の患者の母親と一般妊婦においては，21才より40才までに大部分が分布していた。なおこれらの血清は血液より分離した後，可及的速やかに－20℃に凍結保存した。

2)組織培養法：培養細胞は，大阪大学微生物病研究所峰川博士より分与されたSyrian humster 由来の株化細胞であるBHK21/WI-2細胞，および大阪大学歯学部佐藤博士より分与されたBHKi/MA28細胞を用いた。培養液にはEagle's minimum essential medium (MEM29)を使用し，増殖培養液としてはEagleのMEM

に Tryptose phosphate broth (Difco) 並びに仔牛血清(阪大微研)を各に最終濃度10%，及び5%の割合に加えたものを使用した。継代培養は単層培養を0.25% Trypsin (Difco)を含む Tris 緩衝生理食塩水 (PH7.8) と0.2% Etylene-diamine tetraacetic acid (Prmour Pharmaceticals Co. U.S.A.)液を1：4の割合で含む混合液で，室温にて3分間処理して得られた細胞をMEMにて2回洗浄した後，2×10^5個/mlに調製した細胞浮遊液を，100mm径 Petri 皿に13ml入れ，5% CO_2を含む湿潤な空気中にて培養した。なお細胞の継代は3～4日間隔にて行なった。

3) ウイルス；RVはM-33株，MVはEnders 108株，HVはHF株を使用した。これらのウイルスは全て大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課より分与されたものである。RVの増殖には，BHK21/WI-2細胞を使用した。継代培養24時間後に形成された単層培養にRVを接種し，1時間吸着した後，前記のEagle

の増殖培養液を加え，5～6日間培養し，その培養液上清を保存ウイルスとして使用した。

MVは8日ふ化鶏卵（日本動物、大阪）の尿膜腔に0.1ml接種し，7日間37℃でふ化した後，3～4時間4℃の低温に保ち，その後尿膜液を採取して未処理のまま赤血球凝集抑制反応（HI）抗原として使用した。HVは12日ふ化鶏卵の漿尿膜（CAM）に接種し，さらに3日間37℃でふ化させた後，CAMを採取し，緩衝生理食塩水を加え，石英砂とともに磨砕して20％homogenateを作り，このhomogenateを400×Gで遠心して得た上清を補体結合反応抗原として使用した。なおこれらのウイルスの保存には－70℃に調整したRevico deep freezer（Revico, Co. U.S.A.）を使用した。

4）風疹ウイルス感染価測定法：RVの感染価測定はPlague算定法[30]によった。即ち培養24時間後に，50mm径のPetri皿に形成されたBHK 1/HA細胞の単層培養に，感染価を測定する

ウイルス液0.1mlを接種し，1時間吸着させた。その後，上記のEagleの増殖培養液に寒天（Difco, Special noble）を最終濃度1%の割合に含むように調製したものを，5ml加え硬化させ，5日間培養した。培養後出現したplaqueの染色にはDulbecco's Phosphate Buffered Saline（D-PBS）[31] pH 7.1にて調製した300倍のNeutral red 0.3mlを加え，37℃ 5% CO_2培養器で3時間Incubateした後，plaque数を算定した。RVのウイルス感染価はplaque forming unit (pfu)/mlと表現した。

5）風疹ウイルス赤血球凝集抑制反応（HI）抗体価測定法

a）抗原：抗原処理としてはウイルス液に，1.25%容量のTween 80を加えたD-PBS pH 5.6を1/10量加え，0℃で3分間振とうし，この混合液に1/2量のエーテルを加え，さらに15分間0℃にて振とうした。その後400×Gで10

分間遠心し2層に分別し，その下層の水層を採取し，減圧にてエーテル除去したものをHI抗原[32]とした。

b)赤血球凝集反応（HA）術式：抗原処理を行なったウイルス液を0.2% Bovine albumin を含むD-PBS PH6.6にて2倍段階稀釈し，その稀釈ウイルス液0.4mlに，生後24時間以内に採血して得られたニワトリ血球を，D-PBSにて0.33%血球浮遊液に調製し0.4ml加え，4℃で1時間静置後判定した。血球の凝集の起こるウイルス液の最高稀釈倍数でもってHA価とした。以下抗原，被検血清の稀釈及びニワトリ血球浮遊液の調製には全て，0.2% Bovine albumine を含むD-PBS pH6.6を使用した。[32・33]

c)血清処理：非特異的な血凝集阻止物質（インヒビター）の除去には，Dolt[33・34]らの方法，即ち被検血清0.2mlにD-PBSにて調製した1Mの$MnCl_2$並びにHeparin 500単位/ml（和光）溶液を各々0.1ml混和し，0℃で15分間振とうした

。その後D－PBSにて50%に調製したニワトリ血球浮遊液を0.05mlカロえ，30分間0℃で振とうした。処理後室温にて400×G 5分間遠心した後，その上清を0.3ml採取し，56℃の水槽にて30分間非働化後D－PBSを0.9ml加え全量を1.2mlとした。

d)赤血球凝集抑制反応（HI）術式：処理血清を2倍段階稀釈し，その稀釈血清0.2mlにHI抗原（4単位/0.4ml）0.2mlを加え，25℃で1時間反応させ，その後0.33%ヒヨコ血球浮遊液を0.4ml加えて，4℃で1時間静置後判定した。赤血球凝集を抑制する被検血清の最高稀釈倍数をもってHI抗体価とした。またHI抗体の陰陽性率の基準の決定に当っては，正常小児および成人の血清を任意に35検体抽出し，その抗体価度数分布より，HI抗体価8倍の所に抗体分布の境界が認められる事から，HI抗体価8倍以上を陽性とした。

e)蔗糖濃度勾配遠心法[35-36]：D－PBS pH6.6にて12.5～37 w/v %の蔗糖濃度勾配を作り，遠

心管に4.5ml入れその上に，インヒビターを除去した被検血清（ヒトの場合は2倍稀釈血清，マウスの場合は4倍稀釈血清）を0.3ml重層し，Spinco Model L，SW-39ロータ（Spinco, Palo Alto, Calif）を使用し，4℃で100,000×Gにて16時間遠心した。遠心後，24管に分画し，それぞれの分画についてHI反応を行なった。

f) 2-メルカプトエタノール（2-ME）処理法[37,38]：D-PBS pH6.6にて調製した0.2Mの2-MEを，蔗糖濃度勾配遠心法にて分画した血清に等量加え，37℃の水槽にて1時間反応させた後，ただちに各分画のHI反応を行なった。

6) ムンプスウィルス赤血球凝集抑制反応（HI）抗体価測定法[39]

a) 血清処理；インヒビターの除去には，被検血清0.1mlにReceptor Destroying Enzyme（武田）を0.3ml加え，37℃で一夜反応させた後，56℃で30分間加温し，さらにD-PBS

PH7.1を0.6ml加え，全体を1mlとした。

b)赤血球凝集抑制反応（HI）術式：D-PBSで処理血清を2倍段階稀釈して，その稀釈血清0.25mlにウイルス抗原（8単位/0.25ml）を0.25ml加え，4℃で一夜反応させ，15分間室温に放置後，D-PBSにて調製した0.5%ヒヨコ血球浮遊液を0.5ml加え，室温にて1時間静置し判定した。HI抗体価10倍以上を陽性と判定した。

7)ヘルペスの補体結合反応（CF）抗体価測定法[39]

a)被検血清は56℃30分間非動化した後，実験に使用した。CFにはmicrotiter法を使用した。抗原は4単位を使用し，CF抗体価4倍以上を陽性と判定した。

8)トキソプラズマ間接血球凝集反応（IHA）抗体価測定法[40]：トキソプラズマ感作血球としては，化学および血清療法研究所（福岡）製のものを使用した。間接血球凝集反応は，信藤一花木法を使用した。被検血清0.1mlを

56℃で30分間非働化した後，D－PBS pH7.1を0.1mlカロえ，D－PBSで3回洗浄した後，400×Gにて10分間遠心して得られたヒツジ血球ペレットを0.2mlカロえ，4℃にて一応放置した。上記の如く血球処理後，400×Gで10分間遠心して，その上清を0.1ml採取し，これにD－PBSを0.7mlカロえて16倍に稀釈し実験に使用した。IHA抗体価64倍以上を陽性と判定した。

9)マウスにおける風疹ウイルス感染実験

RVはM－33株を使用した。実験動物は，アワズ実験動物（大阪）より供給された7～8週令，体重26～29gの未経産のddy系雌マウスを用いた。同系の成熟雄マウスと終夜（約12時間）交配させ，その翌朝，腟栓形成の認められた雌を分離し，その日を妊娠0日とした。飼料は固形飼料（日本クレア製繁殖用CA－I）を用い，水とともに自由に摂取させ，温度22±3℃に調整した動物舎にて飼育を行なった。RVの接種実験は3群に分け，A群

は，妊娠6日目より9日目まで毎日感染価5×10^9 pfu/mlのRV浮遊液を0.3mlずつ，B群は妊娠6日目より9日目まで毎日感染価5×10^6 pfu/mlのRV浮遊液を0.3mlずつ，C群は妊娠6日目より9日目まで毎日感染価5×10^3 pfu/mlのRV浮遊液を0.3ずつ尾静脈より静注した後，さらに妊娠11日目より24時間の絶食を施した。対照としてD群はRVの非感染のBHK21/WI-2細胞の1週間培養液を妊娠6日目より9日目まで毎日0.3mlずつ，E群はRV非感染のBHK21/WI-2細胞の1週間培養液を妊娠6日目より9日目まで毎日0.3mlずつ実験群と同様に尾静脈より静注した後，さらに妊娠11日目より24時間の絶食を施し，F群は妊娠11日目より24時間の絶食のみを施した。G群は無処置の群である。そして，妊娠18日目に各群の胎児を取り出し，生存胎児の口唇口蓋裂の有無の観察，死亡，吸収胎児数の算定，生存胎児の体重測定を行なった。実験に用いたマウスのRVに対する自然感染の可能性を検討するために，実験前に任意に抽出した30匹のマウス，及び実験後

に，D群，E群，F群，G群よりそれぞれ10匹ずつ抽出し，それぞれのマウスより採血して得た血清のRVに対するHI反応を行い，HI抗体陰性である事を確認した。またA群の一部の母マウスは，仔マウスを出産させ飼育を行い，経時的に母マウス，仔マウスの10匹ずつより採血して得た血清をプールし，その血清におけるHI抗体価の測定，および蔗糖濃度勾配遠心法，2－ME処理法による抗体の分析を行なった。

10）螢光抗体法（直接法）：RV（M－33株）で免疫した家兎の抗RV血清より硫安法によりγ－globulinを分画しそのγ－globulin溶液に1/100重量のFluorescein isothiocyanate（Baltimore Biological Laboratory. U. S. A.）並びに1/10溶量のcarbonate－buffer（PH9.0，0.5M）を加え，4℃で4時間スターラーで攪拌しつつ反応させた。反応溶液をSephadex G－50Mにて，Phosphate Buffer（PH8.4，0.005M）で溶出し，未結合の色素をゲル沪過によって除去したのち，DEAE－cellulose columnを用いてpH

8.4, 0.005 M の Phosphate Buffer でまず未結合の蛋白を除き，ついで PH 6.4, 0.005 M および PH 6.4, 0.1 M の Phosphate Buffer で溶出する螢光標識抗体分画を得た。標識抗体液の色素／タン白結合モル比を調べ，この値が 1 ～ 2 のものを実験に使用した。観察材料は，RV 接種により口蓋裂の発生した胎生期 18 日目の口蓋部を −60 ℃に冷却した N − Hexane 中にて凍結後，3 μ の連続凍結切片を作り，上記の螢光標識抗体液を，37 ℃の湿潤恒温槽の中で 1 時間反応させた後，4 ～ 5 回洗浄液を取り変えながら 1 時間洗浄を行った。なお，洗浄液として D − PBS を使用した。

11) 風疹ウイルスの分離同定法

a) RV を接種した A 群，C 群および無処置の G 群の母マウスより，エーテル麻酔下にて，胎生期 18 日目の胎児，胎盤を無菌的に取り出し，10 % の仔牛血清を含む Eagle の増殖培養液にて，50 % homogenete を作り 50 mm 径 petri 皿にて形成された BHK 21/WI-2 細胞の単層培養に 1 ml

接種し，1時間吸着させた後，MEMにて1回単層培養液を洗い，5%の仔牛血清を含むEagleの増殖培養液5mlを加えた。約7日間隔で継代培養を行い，BHK21/WI-2細胞の細胞変性効果（CPE）とその培養液のHA反応を検索した。なおCPE，HAが確認できない標品については，Petri皿より機械的に細胞をはがし，1回の凍結融解を行なった後，その遠心上清を，さらにBHK21/WI-2細胞の単層培養に接種し，6週間まで培養を行った。さらに上記の如くして得られた培養液をTween 80とエーテルで処理した後，抗RV血清にて，その培養液のHA反応が抑制されるものをRVの同定とした。

調査および実験結果

I 血清疫学的調査

1) 患者のRV，MV，HV，Tpに対する抗体保有率：

患者のRV，MV，HV，Tpに対する抗体保有率は図－1に示してある。RVについては67.7％，MVは33.3％，HVは36.8％，Tpは64％の抗体保有率を示した。

2才以下の患者の年令別におけるRV，MV，HV，Tpに対する抗体価分布を検討すれば，RV，MV，HVでは生後1ヵ月から6ヶ月までと1才6ヵ月から2才までに，抗体保有陽性群が集中し，7ヵ月から1才6ヵ月までの群では抗体保有陽性の者のわずかに散見されるにすぎなかった。なおTpに関しては生後5ヶ月，6ヵ月ならびに2才の患者にのみ抗体保有陽性のものが少数存在した。

2) 患者とその母親のRVに対する抗体保有率：

表－3に示す如く，患者の抗体保有率は204

例中138例67.7%と正常小児の40例中15例37.5%に比べ著しく高い値を示した。なおT検定の結果両群間で有意の差を認めた。

また患者の母親では204例中198例97.1%，姙婦において100例中92例92.0%とほぼ同様の値を示し，両群間に有意の差は認めなかった。

3) 口唇口蓋裂の症型別および年令別のRVに対する抗体保有率：

表－4に示す如く，口唇裂，口蓋裂，口唇口蓋裂の症型別による抗体保有率は63.3%より71.7%の間に分布しており，同年令群での症型別による有意の差は認められなかった。

また患者の年令別によるHI抗体保有率は0～1才群が58/82 70.7%，1～2才群が8/12 65.6%であった。さらに0～1才群を，0～6ヵ月群，7ヵ月～12ヵ月群に分けると0～6ヵ月群で68例中51例75.0%，7ヵ月～12ヵ月群で14例中7例50.0%の値を示した。

4) 患者とその母親のRVに対する抗体価度

数分布：

RVに対するそれぞれの抗体価度数分布を調べると図－2の如く，患者においてはHI抗体保有陽性のものは，HI抗体価16倍にピークを持つ一峰性のパターンを示した。なお同抗体保有陰性のものは32.3%であった。正常小児においては，HI抗体価16倍にピークのあるなだらかなパターンを示した。またHI抗体保有陰性のものは62.5%であった。一方，患者の母親および妊婦においては，ほぼ同様な抗体価度数分布を示した。

患者とその母親の抗体価度数分布を比べると，患者のHI抗体陽性におけるピークが16倍にあるのに比べ，母親の場合は64倍にピークがあり，患者の抗体価がその母親に比べ相対的に低い値を示している。

5) 口唇口蓋裂患者およびその母親のRVに対するHI抗体の相関：

患者と母親のHI抗体保有の相関は表－5に示す如く，母親の抗体保有陽性者198例中

138例69.7%が患者でも抗体陽性を示し，62例30.3%は陰性であった。母親の抗体保有陰性6例では，4例が患者も陰性を示したが，2例33.3%が母親陰性にもかかわらず，抗体陽性を示した。

また図－3に患者と母親のHI抗体価の相関を示した。

即ち，HI抗体価において，母親と患者が全く等価を示す例が31例15.2%であり，44例21.6%は両者のHI抗体価の差が2倍以内であり，うち37例は母親が，また7例は患者がそれぞれ高い値を示した。また124例60.8%は母親が患者より4倍以上高い値を示しており，5例2.5%は患者が母親より高い値を示した。

以上の調査結果より口唇口蓋裂患者のRVに対するHI抗体保有率が正常小児より著しく高い事より，口唇口蓋裂の発生にRVの感染が関与している可能性が示唆された。この事を実験的に証明するために次の実験を行なった。

Ⅱ マウスにおける風疹ウイルス感染実験

1) RV感染による口蓋裂の発生：

表－6に示した如く，感染価 5×10^{9} pfu/ml の RV浮遊液を静注した群で98匹の母マウス中3匹（3.1%）の母マウスが口蓋裂胎児を有している。これは胎児数にして、878匹中7匹（0.8%）が口蓋裂胎児であった。感染価 5×10^{9} pfu/ml の RV浮遊液を静注し，さらに絶食を施した群では，母マウス87匹中7匹（8.0%）が口蓋裂胎児を有していた。これは胎児数にして774匹中14匹（1.8%）が口蓋裂胎児であり，RV浮遊液静注群よりも，口蓋裂の発生率は高く，有意の差を認める事が出来た。

感染価 5×10^{6} pfu/ml の RV浮遊液静注群では，口蓋裂の発生は認める事が出来なかった。

また各対照群においても口蓋裂の発生は認められなかった。無処置の群においては，胎児数1197匹に口蓋裂の発生は認められず，ddy系マウスにおける口蓋裂の自然発生率は低い

と思われる。なお口唇裂の発生は，実験群，対照群のいずれにも認められなかった。

なおRVの感染により発生したマウスの口蓋裂は図－4に示した。またRV感染のマウス胎児に与える影響を，胎児の死亡吸収率，および胎児の体重より検索した。

胎児の死亡，吸収率に関しては，感染価5×10^9 pfu/ml のRV浮遊液を静注した群（A群），感染価5×10^6 pfu/ml のRV浮遊液を静注した群（B群）とBHK21/WI-2細胞の培養液を静注した群（D群）において有意の差を認める事ができた。また感染価5×10^9 pfu/ml のRV浮遊液を静注後に絶食を施した群（C群）とBHK21/WI-2細胞の培養液を静注後に絶食を施した群（E群）においても有意の差が認められた。しかしA群とB群では有意の差は認める事が出来なかった。C群のRV浮遊液の静注と絶食を施した群においては，それぞれ単独のときよりも相加的な効果を表わす事が認められた。

胎児の体重に関しては，C群，A群，B群，E群，F群，G群，D群の順に体重が軽い傾向がみられたが，各群間に有意の差は認められなかった。

胎盤の組織学的検討も同時に行なったが，病理的変化は認められなかった。

次に螢光抗体法を用い，RV接種により発生した胎生期18日目の口蓋裂部のRV抗原の有無を検索したが，RV抗原は認める事が出来なかった。以上のような事実が明らかにされたので母マウスに接種されたRVが，胎児へ垂直感染をひき起こすかどうかを明らかにするため，次の実験を行った。

2）胎盤，胎児よりのRVの分離：

胎盤，胎児よりのRVの分離を試みた。その結果は表－7に示す如くであった。即ち，RV浮遊液静注群（A群），RV浮遊液静注後，さらに絶食を施した群（C群）とも，胎盤，胎児よりのRV分離ができ，胎児への母体内感染が証明された。またこのうち各群と

も2例ずつの口蓋裂胎児およびその胎盤を含んでいるが，それらからは全てRVの分離ができた。またC群のRVの分離率は，胎児のほうが胎盤より高い値を示した。
対照としての無処置の群においてはRVの分離はできず，またHI抗体も検出できない事から，本実験系に使用したマウスにおいては，恐らくRVの自然感染はないものと思われる。

3) RVのHI抗体の動態：

母マウス，仔マウスのHI抗体価の変動および，蔗糖濃度勾配遠心法および2-ME処理法によりHI抗体の分析を行った。RVを接種した母マウスおよびその母マウスより生れた仔マウスの経時的なHI抗体価の変化を図-5に示した。

母マウスにおいては，RV接種後8日目よりHI抗体価は上昇，仔マウス出産時にはHI抗体価は192～384倍の間にあった。その後も抗体価は上昇し，5週目で768倍のPlate

-auに達した。この母マウスのHI抗体を蔗糖濃度勾配遠心法および2-ME処理により分析を行なった。

即ち図-6に示した如く接種8日目では，分画8と分画17にHI抗体価のピークを認めた。さらに24分画全部にわたり2-ME処理した後，HI反応を施行するとBottom側の分画8のみ2-ME感受性であることから，分画8はIgM抗体であり，分画17を中心として存在する抗体はIgG抗体であると思われる。

また接種後8日目ではHI術式で抗体分析を施行した所においてIgG抗体がIgM抗体を上まわっていた。18日目においても同様にIgM，IgGの両抗体が検出されたが，41日目にはIgM抗体は検出されず，IgG抗体のみが検出された。

仔マウスにおいては，出生時すでにHI抗体価は12倍であり，生後1週間目で24倍に上昇したが，生後4週，5週目に抗体価は減少

し，HI抗体価は12倍以下となった。6週目に再びHI抗体の上昇を認め抗体価は12倍の値を示した。HI抗体の分析を行うと，生後1日目の抗体ではIgG抗体のみを認めた。その後6週目，8週目になってIgM抗体が検出された。

考察

本研究は口唇口蓋裂発生要因として環境因子のみを取りあげ，そのうちで現在までに催奇性が報告されているウイルス，原虫である RV[9~12]，MV[13~16]，HV[17~19]，Tp[20~22~25]，の感染症について血清疫学的な観点に立って，前記の催奇性ウイルスおよび原虫の当該奇形発生要因としての関与の可能性を検討した。即ち口唇口蓋裂患者が，それぞれのウイルス，原虫に対する抗体を保有している事は，胎生期あるいは生後ともなく，同ウイルス，ならびに原虫に感染したことを示唆している事になり，さらにもし同ウイルス，原虫が胎生期感染である事が証明されるならば，当奇形発生要因としての可能性を強く暗示している事になる。故に著者は口唇口蓋裂患者およびその両親について血清疫学的な検索を加えた結果，特に患者のRVに対するHI抗体保有率は，67.7％という高値を示し，これは対照である同年令の正常小児の37.5％に比較すると著しく高い値

であり，統計学的に有意の差を認めた。なおMV[42]，HV[43-44]，Tp[45-46]に関してはそれぞれの抗体保有率は，現在まで血清学的に調査研究され，報告された値とは，それ程大差がなかったので口唇口蓋裂発生要因になりうる可能性はきわめて少ないと思われた。故に本研究では胎生期における風疹感染が当該奇形発生要因となりうる可能性を検索したものである。

風疹については，1941年Gregg[9]が妊娠中に風疹に感染した母親より，白内障，心奇形，難聴等の先天異常をもつ子供が多数生まれた事を報告して以来，世界各国で妊娠中の風疹感染による先天異常児の出産が数多く報告された[47-48]。特に1964年の北アメリカ[10-11]，1965年の沖縄[27-29]での風疹の大流行後に多数の先天性風疹症候群が発生した。またGregg[9]（1941），Schiff[26]（1965），平山[27]（1969）らが先天性風疹症候群の中に口唇口蓋裂が認められることを報告している。

一般に風疹感染症を疫学的な観点から考察

すれば，同ウイルスによる感染症は世界一円に慢延しており，また日本においても常に散発的に発生している事が報告[50~53]されている。しかし先天性風疹症候群の発生に関しては，北米等でその大流行時に同症候群の大発生が報告されているにもかかわらず，日本ではわずかに数例の報告[54,55]があるにすぎない。故に日本での同症候群が非常に稀である原因が何に起因するか定かでないが，甲野ら[56]により，日本に慢延しているRVは催奇性が非常に弱い事が報告している。しかし今回著者が報告した血清疫学的研究の中で，2才以下口唇口蓋裂患者の風疹ウイルスに対するHI抗体保有率が対照に比較してきわめて高いという事実は，当該奇形発生と深いつながりがあると思われた。即ち本研究における血清疫学的研究に用いた対象は1969年3月より1972年6月まで本病院口腔外科を訪れた2才以下の口唇口蓋裂患者ならびに，その両親の血清であった。また同患者の出生地をみれば，大部

分が近畿地方および四国，中国地方に分布していた。なお同時期に日本で発表されたRVのHI抗体保有率は，同年令小児において大阪では木本[57]らの26.3%，今回の調査の37.5%であり，当奇形患者のRVのHI抗体保有率67.7%という値は非常に特異なものと思われる。ただ千葉県における市村[58]らの報告によれば53.8%という高い値を報告しているが，同報告における検体数は少なく，また一般に日本におけるRVのHI抗体保有率は南から北に向うにしたがい高くなる傾向[53]があるため，口唇口蓋裂患者のRVのHI抗体保有率と等しく比較は出来ないものと考えられる。

しかし口唇口蓋裂患者の母親に関しては，同時期に報告された一般成人のHI抗体保有率と比較して差異は認められなかった。[58~60]

次に本研究に使用した血清の由来である。2才以下の患者の年令分別について検討すれば，大部分生後6ヶ月以下のものと，1才6ヶ月より2才までの間に分布しており，6カ

月から1才6ヵ月の間に属するものはきわめて少なかった。その理由は本病院における口唇裂の手術時期は生後4ヵ月から6ヵ月の間であり，また口蓋裂の手術時期は1才5ヵ月から2才の間に施行されているためである。

なお図－1に示されている患者の抗体価分布をみればHI抗体保有陽性のものは生後6ヵ月までが5例25.0%，7ヵ月から1才までが7例34%，1才から1才6ヵ月までが10例49%，1才6ヵ月から2才までが10例34.3%であり，HI抗体陰性は全体で61例32.3%であった。

HI抗体保有陽性群は生後6ヵ月までの群と生後1才6ヵ月から2才までの群に大別された。次に同抗体保有陽性例につき2－ME処理法を使用して，抗体分析をした結果，全症例にわたってRVのHI抗体は2－ME感受性である事からこすべてIgG抗体であると考えられた。

しかし風疹感染においてはIgGおよびIgM抗

体の解析には，従来の全血清の2－ME処理法では感染のごく限られた時期しかHI抗体の有意の低下は認められないため，解析はきわめて困難であり[36,61]，蔗糖濃度勾配遠心法による解析法がより優れている。著者は1才以下の者で心奇形を合併している者4例ならびに口唇口蓋裂単独症例4例の合計8例について，蔗糖濃度勾配遠心法を施行した。その結果8例ともにIgM抗体は検出できなかった。次に前群の抗体は，患者の母親のRVに対するHI抗体保有率が92.0％，また同時期の妊婦のRVに対するHI抗体保有率についての報告は大阪の97.8％[59]，千葉の94.1％[58]という高い値を示しており，妊婦の大部分がRVに対するHI抗体を保有している事からも，大部分は胎生期の母体に由来する移行抗体と考えられる。後群の抗体は出生後の風疹感染によるものか，胎生時期の風疹感染による患者自身のIgG抗体産生によるものと考察される。ともあれ，一般に感染症においてその病原体に

臨路されたという証明にはIgM抗体の検出が不可欠である故に，本研究におけるRVの胎生期感染の証明には，少なくとも，生後1才前後のRV抗体保有陽性例についてIgM抗体の検出が必要である。今後RVのHI抗体保有陽性者の全症例にわたり蔗糖濃度勾配遠心法を施行すると共に，口唇口蓋裂患者で，生後1才前後の症例について深く検索してみたいと思う。

次に口唇口蓋裂患者ならびにその母親についてRVのHI抗体価度数分布およびそれぞれのHI抗体価の相関関係を考察すると，患者ではHI抗体価16倍の所にピークのある一峰性のパターンを，患者の母親においては，64倍の所にピークのある一峰性のパターンを示し，その分布より口唇口蓋裂患者の抗体価がその母親に比べ，相対的に低い値を示す事が明らかとなった。

また口唇口蓋裂患者と母親のHI抗体価の相関について検討すれば，204例中124例

コクヨ 20×20

60.8%は母親が患者より4倍以上抗体価が高い値を示した。また母親と患者のHI抗体価が等しいか，2倍以内のものは，75例36.8%，残り5例2.5%のみが患者の抗体価が母親より4倍以上高い値を示した。

Dudgeon[62]は，先天性風疹症候群の小児の血清では，その抗体価が母親より高くなる場合が多いと報告している。そのため患者の抗体価が母親より4倍以上高い値のものおよび母親と患者のHI抗体価が等しいか，2倍以内のもの80例について2-ME処理法を，さらに8例につき蔗糖濃度勾配遠心法を施行したが，IgM抗体は検出できなかった。今後残りの症例ならびにこれら患者の母親につき抗体解析を行いIgM抗体の存在の有無を確認し，口唇口蓋裂発生要因としての風疹感染症の可能性を追求してゆくことが急務であると考える。ともあれこれら当該奇形児およびその母親における血清疫学的調査より風疹感染症が当奇形発生に何らかの関係を有している

とは充分示唆できるものと考える。

これまで述べてきた血清疫学的研究の基盤に立って口唇口蓋裂が風疹感染症によって発現することを実験的に実証することを試みたのである。

胎生期風疹ウイルス感染により奇形が発生する事は文献的に考察すれば，Colter[63]（1968）が妊娠ラットを用い妊娠5～6日目にRVを接種し，15日目に胎児を取り出し，ウイルス学的，病理学的，レントゲン的な所見を調べると，骨発育不全，心室中隔の形成不全またはレンズに核の残存が認められたと報告している。また甲野[56]（1969）は妊娠家兎に対し，受精8～9日目に種々の株のRVを感染させ，胎児への影響，胎児組織よりのRVの分離および HI 抗体の動態，解析について検討した実験の中で風疹感染家兎新生児に白内障を中心とした種々の眼奇形が発生することを報告している。

今回著者は口唇口蓋裂の風疹感染による実

験的発生を試みるに先立ち，実験動物としてdd系マウスを使用した。その理由としては，同マウスはRV感染に対し感受性があること，口蓋裂の発生実験においてはマウスによる動物実験系が確立されているためである。[64,65]

まずRV感染による口蓋裂発生実験に先立ち，予備実験を行い，RVの接種時期を決定した。RV接種時期を，交尾前日より交尾後2日目（妊娠1日目）まで，妊娠2日より5日目まで，妊娠6日目より9日目まで，妊娠10日より13日目までの各群4日間のRV接種を行い，妊娠18日目に口蓋裂の発生頻度を検討すると，妊娠6日目より9日目までRVを接種した群が一番高かった。またRVの感染価決定に関する予備実験では，5×10^{6} pfu/ml感染価以上の群にのみ当該奇形の発生を認めた。

これら予備実験からRV感染による口蓋裂発生の臨界期はCortisone[65]，放射線[66,67]の物理化学的因子による口蓋裂の発生の臨界期が，妊娠10

日目以降にあるのに比べ，RV感染の場合は比較的前期にある。これは奇形発生器官の形成期による感受性の差およびマウスの口蓋裂発生において，ある一定量以上のウイルス量が必要なため，接種後RVの生体内における増殖が不可欠であるものと推察される。故にRV感染においても臨界期が10日以降に存在する可能性も考慮しなければならない。

これらの予備実験にて得た結果をもととして，マウスの感染実験を行なったが，感染価5×10^{8} Pfu/ml のRV浮遊液を静注した群では，胎児数の0.8%（7/898）に口蓋裂の発生が認められた。このRV感染実験に用いたddy系マウスに妊娠11日から14日目までCortisone acetateを1日2.5mg投与すると，22.6%（68/301）に口蓋裂の発生が認められた。

またFraser[68]（1957）はC57BLとA/Jaxマウスを用い同様に1日2.5mgのCortisoneを妊娠11日から14日目まで投与すると，C57BLでは17%，A/Jaxでは100%に口蓋裂の発生を認め，

マウスの系統の違いにより，口蓋裂の発生率が異なる事を報告している。この事から考えてみると，今回のRV感染による口蓋裂の発生率が，コーチゾンによる口蓋裂の発生率と比べ，低い値を示しているが，さらにマウスの系統を変え，RV感染実験を行う必要がある。

次にRV接種後に絶食を施すと，口蓋裂の発生率は，RV接種単独の場合の0.8%（7/898）に比べ1.8%（14/774）と高まる事が認められた。

また著者らは未発表であるが，感染価5×10^6 pfu/mlのRV浮遊液を妊娠5日目のマウスに0.3ml静注し，妊娠6日目よりPolychrorinated Biphenyl（PCB）を10mg投与する事により，PCB単独投与の時よりも口蓋裂の発生頻度が高まる事実を明らかにしている。一般に奇形発生実験においては，2種以上の発生要因を作用させた場合，奇形発生率は，単独の発生要因が作用したときより上昇する事が報[69,70]

告されている。例えばMillen[71]（1957）らはVitamin A過剰とCortisone，Vitamin AとMethy-thiouracilの併用投与により，口蓋裂の発生は相乗的な効果を表わす事を報告しており，竹越[72]（1961）らはVitamin AとCortisoneの併用投与でマウスに100%の口蓋裂が発生することを報告している。

そのため，本研究においてもRV感染の他に，奇形発生要因となりうることが証明されている絶食という条件を加えて実験を施行した。絶食によるマウス胎児への影響について，RunnerとMiller[73]（1956）は129系マウスを用い，妊娠7・8・9・10日目に24時間の絶食を施し，胎児への影響を調べている。それによると絶食が妊娠8日目のものでは28%，9日目のものでは14%，7日および10日目のものでは少数に頭蓋の異常および肋骨の癒合欠損を認めたと報告している。西川[74]（1963）は44系マウスを用い，妊娠9・10・11日目に24時間の絶食を施し，妊娠9日目に11

%，10日目に6%，11日目に2%の後肛の方向異常，内反足，肋骨癒合を認めたと報告している。

著者は本研究においてマウスに於ける二次口蓋形成途上である妊娠11日目に24時間の絶食を施したが，絶食のみでは，口蓋裂の発生は認めなかった。しかしRV接種と絶食の両因子を妊娠マウスに作用させると，口蓋裂の発生は2.25倍に上昇した。この事からも明らかなように妊娠中のRV感染の他に，他の当該奇形発生要因が複合的に作用したときまりその発生率が高まる可能性が考えられた。

次にこれらの口蓋裂発生要因の作用機構について考察すれば，まずRVについてはRVの感染胎児に対する直接作用によるものかどうかが問題となる。本実験の結果は，胎児，胎盤よりRVの分離ができ，明らかにRVはPlacenter barrierを通過し，胎児に感染をおこす事が証明された。この事はまたヒトにおいても認められており Alford[75] (1964) が妊

娠8週以内にRV感染した妊婦の胎盤胎児よりのRVの分離を試み，胎盤から67%，胎児から28%の率にRV分離に成功した。また般は（1964）妊娠9～16週にRVに感染した妊婦の胎盤より100%胎児より14%のRV分離を行い，妊娠月数が多いほど胎児へのRV感染が少い事を報告し，胎盤よりの胎児への感染は胎盤，胎児の成熟度が重要な因子になると報告している。

また Tondry[26]（1966）は風疹感染後10～45日，胎令51～85日の人工流産例12例の胎盤のうち8例に，絨毛上皮の限局性壊死の他，ウイルス感染によると思われる病変を観察しており，また毛細管やより大きな血管もおかされて内腔に剥離しているところも認められている。また1例においては，絨毛上皮の壊死のほか，臍帯静脈や脳内小動脈のなかに，壊死に陥り剥離した絨毛上皮に似た細胞の塊を見いだしており，RVはまず絨毛上皮

において増殖し，おかされた細胞が剥離して胎児側の循環系に入る事が，胎内感染の経路であろうと述べている。著者の実験における胎児，胎盤からのRV分離率を比べてみると，RV静注群，およびRV静注後に絶食を施した群の両群とも胎児よりの分離率が胎盤よりの分離率を上まわっており，ヒトにおける場合と逆の現象が認められた。またマウスの胎盤においてはウィルス感染を示す特異な病理変化が認められない事も考えあわせ，マウスにおいては，RVは胎盤に病巣をつくり，そこから浸潤的に胎児に感染をひきおこすというよりむしろ，母体の血液より胎盤を通過し，直接胎児組織へ浸入することも考えられる。次にRVを接種された母マウス，およびその母マウスより生れた仔マウスのRVのHI抗体価の動態およびその蔗糖濃度勾配遠心法による解析をおこなったが，口蓋裂の発生したマウスについては口蓋裂の発生したマウス数が少い事，奇形マウスの飼育が困難な

事から，その測定はできなかった。

その結果によると、仔マウスのIgG抗体は母マウスより相対的に低い抗体価を示した。これは馬屋原[77]（1966）も報告しているように，マウスにおいては免疫グロブリンの胎盤通過性が低い事によるものと考えられる。また生後4週，5週目にHI抗体価の減少をみたが，この時期とマウスの離乳期（約生後3週）とちょうど時期が符号する事から，母乳よりの移行抗体が断たれるためと思われる。

マウスにおいては，胎児への移行抗体は，胎盤を通過するものと，母乳より移行するものとがあると報告[78]されている。また母乳および胎盤を通過する抗体はヒトの場合と同様にIgG抗体のみであると報告[77]されており，生後1日目の仔マウスにおいて，すでに抗体が検出されたが，これはIgG抗体であるため，胎盤通過または母乳よりの移行抗体であると考えられる。仔マウスのIgM抗体は生後6週目

以降より検出された。

一方同時に飼育している対照群の母マウスより出産した仔マウスでは生後6週目になっても全くRVのHI抗体が認められない事から生後の感染は考えにくく，またRV接種群の胎児よりRVが分離された事から，恐らく生後6週目より仔マウスの血清中に認められたIgM抗体はRVの母体内感染を証明するものと思われる。

以上RV感染妊娠マウスおよびそれから生れてきた仔マウスにおける抗体解析ならびにウイルス分離に関する実験より本実験系のRVの垂直感染が証明されたものと考える。

本実験においては，RV感染により，口蓋裂以外に前肢の短肢症および指趾の癒合を少数例認めたが，白内障等の先天性風疹特有の奇形がみられなかった事，胎児の体重がRV接種群と対照群が有意の差をみとめなかった事より，RV接種による口蓋裂の発生が，RVの真の催奇性によるものか，母体の風疹感

染による母体環境の悪化などの二次的な結果によるものかは判然としなかった。なおRV感染による母体環境の悪化は，RV感染実験群での胎児の死亡，吸収率が，対照群と比較して約2倍上昇したことより明らかである。

このRV感染による口蓋裂発生の因果関係を解明するためには，RV感染による奇形発生の機構ならびに感染後のRVの体内分布について明らかにしなければならない。

一方Plotkin[79]（1965）は，ヒトの胎児肺細胞にRVを感染させ，増殖させると細胞は2〜3回分裂を行った後に，分裂増殖を停止してしまい，この時分裂細胞の50%の染色体の断裂がおこって有糸分裂が妨げられると報告している。また彼[80]（1967）らはin vitroで人胎児培養細胞にRVを感染させたとき，細胞培養液中に細胞分裂を抑制するようなある種のタンパク質を感染細胞が放出するという事実を報告している。これらの研究からRVの奇形発生機構は，RVが感染した特異的

な細胞群に染色体の異常を生じ，有糸分裂が妨げられ奇形の原因をなしていると考えられている。

次に胎盤通過後のR・V抗原の分布についてみてみると，Wiedermann[81]（1964）は妊娠2カ月でRVにかかった母親から生れた6ヶの子供の末梢白血球に染色体の断裂を報告している。なおRVの感染生体の体内分布についてみれば，甲野[56]（1967）らはラットで白内障を生じた水晶体に，螢光抗体法によりRV抗原の証明を，Menser[82]（1968）らは，先天性風疹症候群の患者の白内障の生じた水晶体よりのRVの分離を報告している。またChang[83]（1966）らは妊娠初期三半期にRVの感染が確認されたため，治療の目的で中絶された胎児より摘出された皮膚，筋肉，腎臓などの組織より染色体の異常を報告している。

本研究におけるマウスによる当該奇形発生実験において，著者も螢光抗体法によって胎

生期18日目の口蓋裂発生マウスの口蓋部にRV抗原の検出を試みたが，その存在を認める事ができなかった。今後RV感染による奇形発生において，RVの存在が不可欠なものであるかどうか明確にされるべきであると考える。

最後にヒトにおける口唇口蓋裂の発生要因としてのRV感染について考察する。まず妊婦のRV抗体保有率であるが，Sever[84,85]（1964・1965）の報告によると，アメリカにおいては，妊婦の約15%が中和抗体を保有しておらず，また日本においても全国各地でRVが散発的に発生しているとの報告[50~53]があるにもかかわらず，約2～35%の妊婦が抗体を保有していない事が報告[50,56,57,86]されており，これら抗体を保有していない婦人が，妊娠中にRVに感染し，先天異常児を出産する危険性は，現実的な問題である。またGregg[9]（1941），Schiff[26]（1965），平山[27]（1969）らが報告している先天性風疹症候群の中に随伴

症候として口蓋裂の発生が認められる。Greggは1人の口蓋裂を報告しており，またSchiffの報告によると妊娠中にRV感染が認められ，先天奇形を有する41人の子供に1人の口蓋裂を認めている。

・中山の報告では，妊娠中に風疹感染があったもの，またはその疑いのあるもの384名中348名が先天性の心疾患、白内障等の奇形を有しており，うち1人が口唇裂を有していた。

このように先天性風疹症候群の中に口唇口蓋裂の発生認められているが，これらの口唇口蓋裂の発生はRV感染とは何らの因果関係なしに発生したものが，先天性風疹症候群の中に偶発的に混り込んだ事を考えなければならない。しかしながらRV感染に対する感受性が人種間で異なる事，RVの株間に催奇性の違いが考えられる事，また今回のマウスのRV感染実験の如くRV感染に絶食等の複合作用が加わる事により，口蓋裂の発生率が高

まる事実から妊娠中のRV感染が口蓋裂発生のBack glaundを作る事が考えられる。

本研究のRV感染に関する血清疫学的調査およびマウスのRV感染実験は，口唇口蓋裂の発生原因として，妊娠中のRV感染を強く示唆するものと考えられる。

また現在まで，RV感染により催奇性を認めた実験系が，Colter[63]のラットの実験系，甲野[46]らのウサギでの実験系しかない事から，本実験系が今後のワクチン開発のためのRVの選択，生ワクチンの安全性の検定，およびその催奇性の実験的研究のための有効な手段となると考える。

結語

口唇口蓋裂発生要因を解明するために、催奇性またはその疑いのもたれているRV，MV，HV，Tpに対する血清疫学的調査およびそれに基づいた動物実験を行い、次の結果が得られた。

血清疫学的調査は口唇口蓋裂患者204名とその母親および正常小児40名と一般妊婦100名を対象とした。

①口唇口蓋裂患者のRVに対するHI抗体保有率67.7％（138/204）は正常小児の37.5％（15/40）に比べ著しく高い事が明らかとなった。

②口唇口蓋裂患者のMVのHI抗体保有率は33.3％（68/204），HVのCF抗体保有率は36.8％（75/204），TpのIHA抗体保有率は6.4％（13/204）で他の報告と著しい差異は認められなかった。

動物実験として妊娠マウスにRVを接種し，マウス胎児に口唇口蓋裂を発生させる催奇

性の有無および垂直感染の成立をウイルス学的，血清学的に検索した。

③感染価 5×10^{9} PFU/ml のRV浮遊液を妊娠6日から9日まで静注した群において胎児の0.8%（7/870）に口蓋裂の発生を認めた。また同様にRVを接種した後，さらに妊娠11日目に24時間の絶食を施した群では口蓋裂の発生は胎児の1.8%（14/774）であり，RV接種単独群より高くなった。なお対照群では口蓋裂の発生は認められなかった。

④RV接種群の胎盤より16.7%（3/18），胎児より18.2%（4/22），RV接種後絶食を施した群では胎盤より11.8%（2/17），胎児より20.0%（3/15）のRV分離ができた。

⑤仔マウスのRVに対するHI抗体価は，RV接種後8日目より上昇し，5週目に768倍のプラトーに達した。またIgM抗体はRV接種後8日目より18日目まで検出できた。

仔マウスは出生時すでに移行抗体としてHI抗体を保有していた。その後HI抗体価は

上昇するが，生後4，5週目に低下を認めるが，6週目に再び上昇を認めた。また生後6週目よりIgM抗体が検出された。

以上の事より血清疫学的に妊娠中のRV感染が口唇口蓋裂発生要因となる事，動物実験より，妊娠マウスがRVに感染すると，RVは胎児に垂直感染を起し，胎児に口蓋裂を発生させる事，およびヒトの先天性風疹症候群の中に口唇口蓋裂の発生が認められる事より，口唇口蓋裂の発生原因としてRVの感染が強く示唆された。

引用文献

1) Fraser. G. R and Calnan. J. S (1961) : Cleft lip and palate : Seasonal incidence, birth weight. birth rank, sex, site, associated malformations, and parental age. Arch of Disease and Childhood. 36, 420~423.

2) Wolf. F. C, Walker, B. E and Transler, P. G. (1957): Experimental production of congenital cleft palate. genetics and environmental factors. Pediatrics, 19, 782~787, 1957

3) Green, J. C. Vermillion, J. R. Hay. S Gibbens. S. F. and Kerschbaum. S (1964): Epidemical study of cleft lip and palate in four states. J. Am. Dent. Assoc. 68. 387~404.

4) Ingalls. T. H. Taube, I. E and Klingberg. M. A. (1964) Cleft lip and cleft palate : Epidemiologic considerations. Plast and Reconst. Surg 34. 1~10.

5) Fogh-Anderson, P (1942): Inheritance of harelip and cleft palate. Opera ex domo biologiae hereditariae universities hafnienis 4. 1~266.

6) 讃井善治 (1962): 口唇裂、口蓋裂の臨床統計的ならびに遺伝学的研究. 人遺雑 7. 194-233 昭和37.

7) 小林八州男 (1958): 兎唇口蓋裂の遺伝的研究 人遺雑 3. 73-107 昭和33

8) 菅原利夫, 山口邦夫, 広谷勝, 前田憲昭, 佐藤光信, 辻忠良, 松村智広, 松矢篤三, 川勝賢作, 柴田忠良, 国田信治, 渡辺正男 (1970): 口唇口蓋裂発生要因に関する研究(予報). 口科雑 19. 828-840, 昭和45.

9) Gregg, N.M. (1941): Congenital cataract following german measles in the mother. Tr. Ophth. Soc. Australia, 3. 35~46.

10) Sever, J.L., Nelson, K.B and Gilkson, M.R (1965): Rubella epidemic, 1964: Effect on 6,000 pregnancies. Amer. J. Dis Child, 110. 395~407

11) Cooper, L. Z and Krugman. S (1966): Diagnosis and managiment: Congenital rubella, Pediatrics. 37. 335~338,

12) Swan, C (1948): Rubella pregnancy as a aethiological factorin stillbirth, Lancet 1. 744~746

13) Hamburger, V and Habel, K (1947): Teratogenic and lethal effect of Influenza-A and Mumps Viruses on chick embryos. Pro. Soc. Exp. Biol and Med. 66, 608~617

14) Holowach, J. Thurston, D. L and Becker, B (1957) Congenital defects infants following mumps during pregnancy. (A review of the literature and a report of chorioretinitis due to fetal infection) J. Pediat. 50, 687~694,

15) Williamson, A. P. Blattner, R. J. and Simonsen, L (1957) Cataracts following mumps virus in early chick embryos. Pro. Soc. Exp. Med. 96, 224~228

16) Ylinen, O and Jarvinan. P.A (1953): Parotitis during pregnancy. Acta, Obst. et gynec. Scandinav. 32, 121~124.

17) Ferm, L.H. and Low, R.L (1965): Herpes simplex virus infection in the pregnant hamster. J. Path. Bact 89. 295~300.

18) Witzleben, C. L and Driscoll, S.G (1965): Possible transplacental transmission of herpes simplex infection. Pediatrics. 36, 192-199.

19) Quilligan. J.J. Jr and Wilson, J.L. (1951): Herpes simplex infection in a new born infant. J. Lab & Clin Med. 38, 742-746.

20). Feldman, H.A. (1956): Congenital human Toxoplasmosis. Ann. New York Acad. Sci 64. 180~182

21) Feldman, H.A (1958): Toxoplasmosis. Pediatrics. 22, 559~574.

22) Eichenwald, H.F. (1957): Congenital toxoplasmosis. a study of 150 cases. Amer. J. Dis. Child 94. 411-412

23) Blattner, R. J and Hey, F. M. (1961): Role of viruses in the etiology of congenital malformation. Prog. Med. Virol. 3, 311~314.

24) Fox, M. J. (1948): Maternal measle, mumps and chickenpox as a caused of congenital anomalies, Lancet, 1, 746.

25) Sabin, A. B. (1941): Toxoplasmic encephalitis in Children. J. A. M. A. 803.

26) Schiff, G. M. Suther, J. M., Light, I. J. and Bloom, J. E. (1965): Studies on Congenital rubella. Am. J. Dis Child, 110, 441~443

27) 平山宗宏, 北村二郎, 近藤徹, 仁科義数, 大島健司, 戸田陽, 高橋彰, 武末正義, 十時晃, 角田忠信, 植田浩司, 上山頑 (1969) 沖縄における先天性風疹症候群, 医学のあゆみ 69, 331~336, 昭和44.

28) 佐藤光信, 河畑憲明, 吉田秀夫, 宮崎正, 渡辺正男 (1972): 動物の株化細胞の Cell population の変動について, 口科雑, 21, 486~495, 昭和47.

29) Eagle, H (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures, Sience, 130, 432~437.

30) Veheri, A, Sedwick, W. D and Plotkin, S. A (1967): Growth of rubella virus in BHK21 cells. I Production, Assay, and Adaptation of virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 1086~1092.

31) Dulbecco, R and Vogt, M (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med. 99, 167~182.

32) 須藤恒久, 森田盛大, 蔦谷登美子, 日沼頼夫, 石田名香雄 (1968): 風疹のHAI抗体. 医学のあゆみ 64, 225~230, 昭和43.

33) Dolt, H. J and Northrop, R. L (1968): The nonspecific inhibitors of rubella virus hemagglutination. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 577~581

34) 吉川ひろみ, 大橋高明, 泰昭子, 坪田哲夫, 竹下稔, 野中実男 (1970): Rubella virusの赤血球凝集反応および赤血球凝集抑制反応に関する研究, 感染症学雑誌 44, 165~175, 昭和45

35) Britten, R. J and Roberts, R. B (1960): High-Resolution Density Gradient Sedimentation Analysis. Science, 131, 32~33.

36) Vesikari, T and Vaheri A (1968): Rubella: a method for rapid diagnosis of a recent infection by demonstration of the IgM antibodies. Brit. Med. J. 1. 221~223.

37) Schluederberg, A (1965): Immune Globulins in Human Viral Infections. Nature, 205, 1232-1233.

38) 関口哲史, 佐藤直彦, 矢野南己男, 沼崎義夫 (1968): 風疹における免疫グロブリン早期診断法としてのIgM抗体の証明. 医学のあゆみ, 66, 135~139.

39) 国立予防衛生研究所学友会編 (1967): ウイルス実験法, 昭和42.

40) 佐藤謙蔵, 花木琢磨 (1965): トキソプラズマ症とその診断. 日本新薬協会. 東京. 昭和40.

41) Svehag, S and Mandel, B (1964): The Formation and properties of Poliovirus Neutralizing Antibody. I. 19S and 7S Antibody formation. J. Exp. Me 119. 1~19.

42) Meyer, A (1962): An epidemiologic study of mumps, its spread in School and families. Am. J Hyg. 75, 259~262.

43) 山口晋吾 (1959): 単純性ヘルペスの血清疫学的研究, 第1報, 諸種年令集団における補体・結合抗体の分布. 日本衛生学雑誌. 13, 842-847.

44) Yoshino, K Taniguchi, S, Furuse, R. Nojima, T. Fujii, R. Minamitani, M. Tada, R. Kubotaki (1962): Jap. J. M. Sc & Biol 15, 235-247

45) 須田栄二 (1967): 新生児のToxoplasma赤血球凝集反応成績: 青森県立中央病院医雑誌, 12, 466,~470, 昭和42.

46) 今井浩 (1968): 帯広地方住民のトキソプラズマ抗体保有状況及びその意義. 小児科診療 31, 614~618, 昭和43

47) Sheridan, M (1964): Final report of a prospective study of children whose mother had rubella in early pregnancy. Brit. M. J. 2. 536~539.

48) Lundström, R (1952): Rubella during pregnancy its effects upon perinatal mortality the incidence of congenital abnormalities and immaturity a preliminary report. Acta Pædiat. 41, 583~

49) 植田治司 (1967): 1965年~1966年沖縄地方に多発した先天性風疹について、小児科 8, 834~841. 昭和42.

50) 植田治司, 西田之昭, 兼光寿臣, 永山徳郎, 久永幸生, 野中実男, 吉川ひろみ, 大橋高明, John L. Sever (1970): 福岡地方における妊婦の風疹感受性. 感染症学雑誌 44, 439~442. 昭和45.

51) 高原蘇治郎, 三原薫治, 佐々木秀郎, 山本正弘, 徳地幹夫, 宍戸亮, 太田原美作雄 (1969) 陸上自衛隊大郷駐とん地に発生した風疹の流行について、第1報 流行像について. 日伝系会誌 42, 337~342. 昭和44.

52) 花谷俶行 (1969)：1966年より1967年にわたる高槻市の風疹流行について. I. 患者及び健康住民のウイルス学的, 血清学的調査成績 II 幼稚園, 小学校及び中学校における風疹流行と, その母親の罹患調査成績, 日本小児科学会雑誌 73. 551～563 昭和44.

53) 佐藤浩, 太田原美作雄, 宍戸亮 板垣朝夫 鹿田忠一, 長見秀男, 伊藤義広 斉藤孝一 (1970)：わが国における風疹の血清疫学的調査研究 感染症学雑誌 43. 360～364, 昭和45.

54) Kimoto, T. Fukunaga, T. Isshiki, G, Takeuchi, T Sato, Y. Kazaki, K, Yoneda, S and Nagaie, S. (1970): Case report of congenital rubella in Osaka Prefecture, Biken. J. 13. 377～381.

55) 甲野礼作 (1966)：風疹の臨床ウイルス学 日本医師会雑誌 55. 1443-1459, 昭和41

56) Kono, R. Hibi, M. Hayakawa, Y and Ishii, K (1969): Experimental vertical transmission of Rubella Virus in rabbits, Lancet 1. 343-347

57) 木本達雄 福永利彦 (1970): 大阪府における風疹の血清疫学. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告. 公衆衛生編 8. 102~108, 昭和45.

58) 市村博. 時枝正吉. 芦原義守 (1972) 千葉県における風疹の血清疫学的調査. 日本公衛誌 19. 418~420 昭和47

59) 渡辺正男 柴田忠良. 国田信治 山口邦夫 菅原利夫 前田憲昭. 広谷勝. 佐藤光信. 宮崎正. 川勝賢作 (1969): 奇形発生の要因に関する研究 (第1報) 大阪府下妊婦の催奇形ウイルス及びトキソプラズマの抗体調査. 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告 公衆衛生編 7. 29~37, 昭和44.

60) 木本達雄、福永利彦 (1969) 大阪地区における風疹の血清疫学. 大阪府立公衆衛生研究所、研究報告 公衆衛生編 7. 130~135 昭和44.

61) Best, J.M. Banatvala, J.E. and Watson, D. (1969) Serum IgM and IgG Responses in Postnatally Acquired Rubella Lancet. 2. 65~68.

62) Dudgeon, J.A. Butler, N.R and Plotkin, S.A (1964) Father serological studies on the rubella syndrome. Brit. Med. J. 2. 155~160

63) Colter, E. Fox, J. Bohigian, G. Beaty, C. and Du Pree, A. (1968): Pathogenic effects of rubella virus on embryo and newborn rats. Nature 217. 34-40

64) 亀井民雄 (1962): マウスにおける実験的口蓋裂の胎生学的ならびに組織化学的研究. 解剖学雑誌 37. 140~158.

65) Fraser, F.C and Fainstat (1959): The production of congenital deffects in the offspring of pregnant mice treated with cortisone. A progress report. Pediatrics 8. 527~533.

66) Russel, L.B. and Russel, W.L (1954): An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. J. cell & Comp. Physiol 43. Suppl 1. 102~149.

67) Murakami, U. Kameyama, Y and Nagami, H. (1963): Malformation of the extremity in the mouse foetus caused by X-radiation of the mother during pregnancy. J. Embryol. exp. Morph 11. 549~569.

68) Fraser, F. C, Walker, B.E. and Transler, S.G. (1957): Experimental production of congenital cleft palate: genetic and environmental factors. Pediatrics 19. 782-787.

69) Willson, J.G. (1964): Teratogenic interaction of chemical Agents in the rat. J. Pharmacol and Exp Therap 144. 429-436.

70) Wellman, D.H.M. and Millen, J.W. (1958): Influence of 4-Methyl-2-thiouracil on the Teratogenic Activity of Hypervitaminosis-A. Nature 181. 992-993.

71) Millen, J.W and Wellman, D.H.M (1957): Effect of cortisone on the incidence of cleft palate. Brit Med. J. 5038. 197~199.

72) 竹越省一 (1961): ビタミンA過剰投与と他の催奇形因子(コーチゾン, トリパンブルー, 騒音, ウレタン, コンドロイチン硫酸)との併用による奇形発生について. 日耳鼻 64. 1489~1497. 昭和36.

73) Runner, M.N. and Miller, J.R (1956): Congenital deformity in the mouse as a consequence of fasting. Anat Rec 124. 437~438.

74) 西川正一 (1963) dd系マウスに施した短期間の絶食の胚発生への影響 解剖学雑誌 38. 181～184. 昭和38.

75) Alford. C.A., Neva, F.A. and Weller, T.H. (1964): Virologic and serologic studies on human products of concept after maternal rubella. New Engl. J. Med. 271. 1275～1281.

76) Töndury, G. and Smith, D.W (1966): Fetal rubella pathology. J. Pediat 68. 867～879

77) 馬屋原宏 (1966): マウスにおける抗体産生細胞の個体発生. 実験形態学誌 20. 18-33 昭和41

78) Branbell, R.W.R. (1961): Problems concerning the transmission of immunity from mother to young. Proc. Roy. Soc. Med. 54. 992～993

79) Plotkin, S.A. Boué, A and Boué, J.G. (1965): The in vitro growth of rubella virus in human embryo cells. Am. J. Expidem 81. 71～85

80) Plotkin, S.A. and Vaheri, A (1967): Human Fibroblasts infected with Rubella virus produced a growth Inhibitor. Science. 156. 659～661.

コクヨ 20×20

81) Widermann, H.R (1964): Chromosome in Gregg's Syndrome. Lancet 1. 721.

82.) Menser, M.A, Harley, J.D. Hertzberg, R, Dorman, D.C and Murphy, A.M. (1967): Persistence of virus in lens for three years after prenatal rubella virus. Lancet. 2. 387~388.

83) Chang, T.H. Moorhead, P.S. Bové J.G. Plotkin, S.A and Hoskins, J.M. (1966): Chromosome studies of human cells infected in utero and in vitro with rubella virus. Proc. Soc. Exper. Biol. Med 122. 236~243

84.) Sever, J.L. Schiff, G.M. Bell, J.A. Kapikian, A.Z Huebner, R.J and Tranb, R.G. (1965): Rubella: Frequency of antibody among children and adults. Pediatrics. 35, 996~998

85) Sever, J.L. Schiff, G.M. and Huebner, R.J (1964) Frequency of rubella antibody among pregnant women and other Human and animal populations. Obst. Gynec. 23. 153~159.

86) 加藤一博 (1968) 風疹に関する研究：高槻市住民，妊婦，新生児臍帯血清及び先天奇形児血清における風疹抗体調査成績．小児科 72，632～641．

( ) : %

表-1

Type of Deformity

	Cleft Lip	Cleft Palate	Cleft Lip and Palate	Total
Male	25 (21.6)	17 (14.7)	74 (63.8)	116
Female	15 (17.0)	16 (18.2)	57 (64.8)	88
Total	40 (19.6)	33 (16.2)	131 (64.2)	204

( ) : %

表-2

Distribution in Age of Patients and Mothers

Age	0-1 Y	1-2 Y	Total
Children with cleft lip and palate	82 (40.2)	122 (59.8)	204
Healthy children (Control)	15 (37.5)	25 (62.5)	40
Total	97	147	244

Age	-20 Y	21-25Y	26-30 Y	31-35 Y	36-40 Y	Total
Mothers of the children with cleft lip and palate	6 (2.9)	72 (35.3)	94 (46.1)	26 (12.7)	6 (2.9)	204
Pregnant women (Control)	0	25 (25.0)	60 (60.0)	13 (13.0)	2 (2.0)	100
Total	6	97	154	39	8	304

(　　) : %

表-3

Rate of Positive HI Antibody to Rubella Virus

Children with cleft palate and lip	138/204	(67.7%)
Healthy children (Control)	15/40	(37.5%)
Mother of the children with cleft palate and lip	198/204	(97.1%)
Pregnant women (Control)	92/100	(92.0%)

表4

Rubella HI Antibody Possessing Rate Among 204 Patients

	Cleft Lip and Palate	Cleft Lip	Cleft Palate	Total
0 ~ 1 Y	33/46 (71.7)	23/33 (69.7)	2/3 (66.7)	58/82 (70.7)
1 ~ 2 Y	56/85 (65.9)	5/7 (71.4)	19/30 (63.3)	80/122 (65.6)
Total	89/131 (67.9)	28/40 (70.0)	21/33 (63.6)	138/204 (67.7)

(　　) : %

表-5

Patient' Mother \ Patient			204	
			(+) 138 (67.7%)	(-) 66 (32.4%)
204	(+)	198 (97.1%)	136	62
	(-)	6 (2.9%)	2	4

Correlation between the children' with cleft lip and palate and their mother's possitive HI antibody level to rubella virus

表-6

Cleft Palate Induced by Rubella Virus in Mice

	Experimental Group	No. of dam with fetal cleft palate	No. of fetal cleft palate	No. of the resorbed and dead fetuses	Fetus body weight (Mean	S.D.) g
A	RV ($5x10^9$pfu/ml)	3/98 (3.1)	7/898(0.8)	58/956 (6.4)	1.00	0.22
B	RV ($5x10^6$pfu/ml)	0/45	0/423	31/454 (6.8)	1.02	0.21
C	RV ($5x10^9$pfu/ml) with Fast	7/87 (8.0)	14/774(1.8)	81/855 (9.5)	0.98	0.28
D	Cont-Fluid	0/105	0/1113	40/1153(3.5)	1.07	0.20
E	Cont-Fluid with Fast	0/112	0/1097	44/1141(3.9)	1.02	0.25
F	Fast	0/116	0/1094	53/1147(4.3)	1.03	0.22
G	No Treatment	0/119	0/1143	63/1197(3.5)	1.06	0.18

( ) : %

表-7

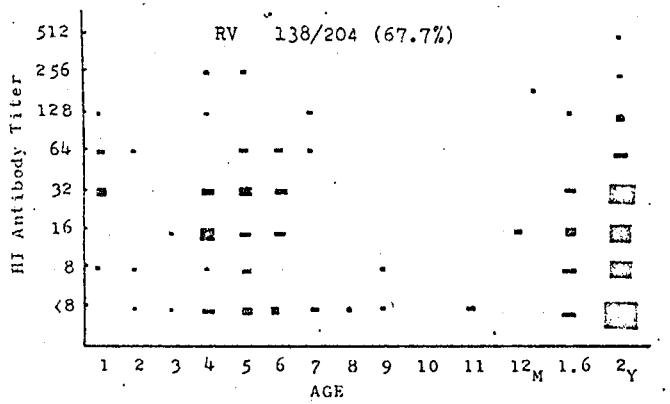
Rubella Virus Recovery from Fetus and Placenta

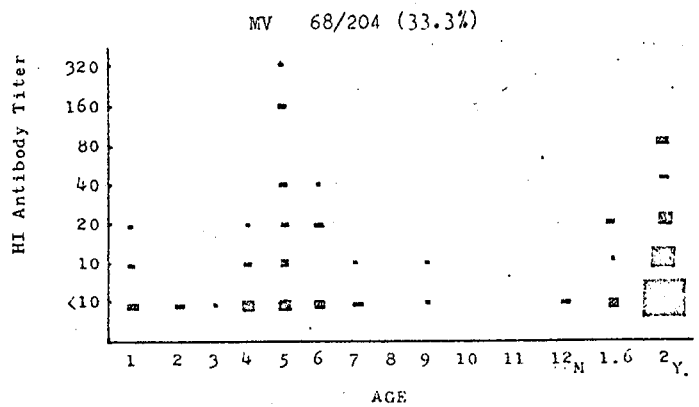
	Experimental Group	Fetus	Placenta
A	RV ($5x10^9$pfu/ml)	4/22(18.2)	3/18(16.7)
C	RV ($5x10^6$pfu/ml) with Fast	3/15(20.0)	2/17(11.8)
G	No Treatment	0/9	0/9

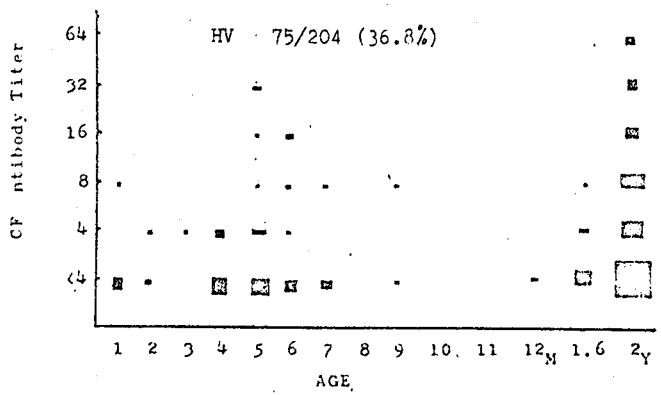
( ):%

図-1

Distribution of Antibody Titer in Age







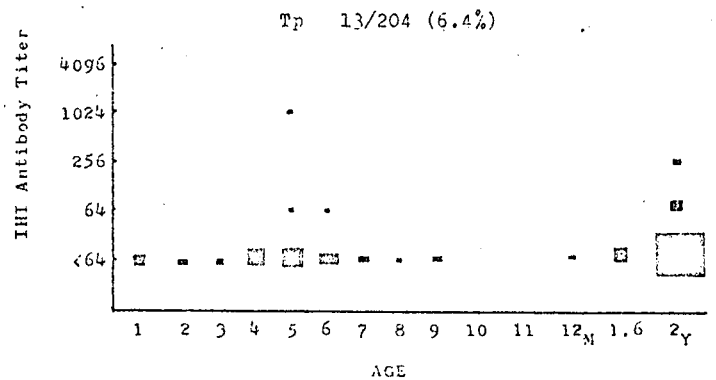
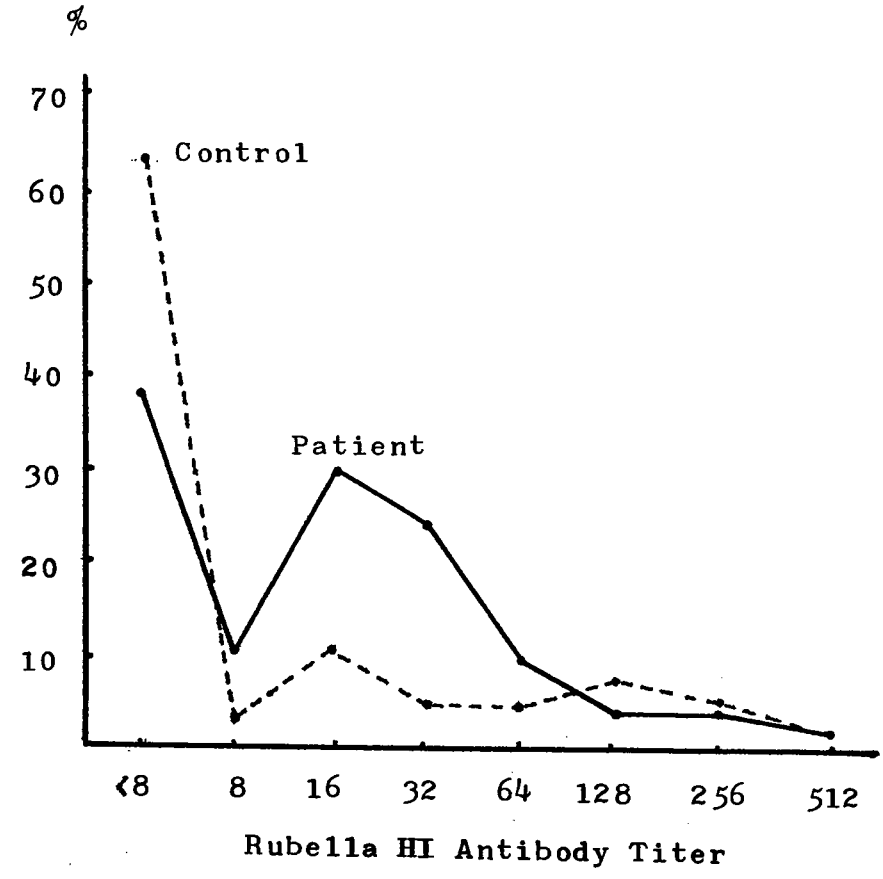
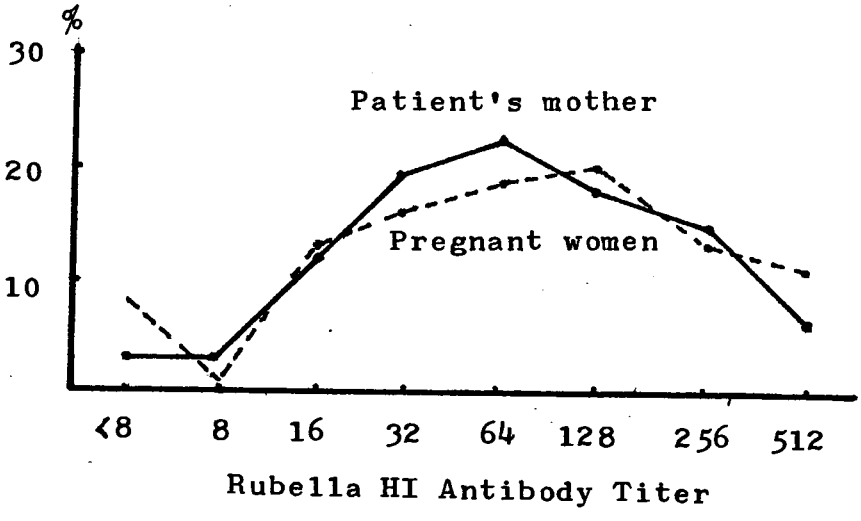


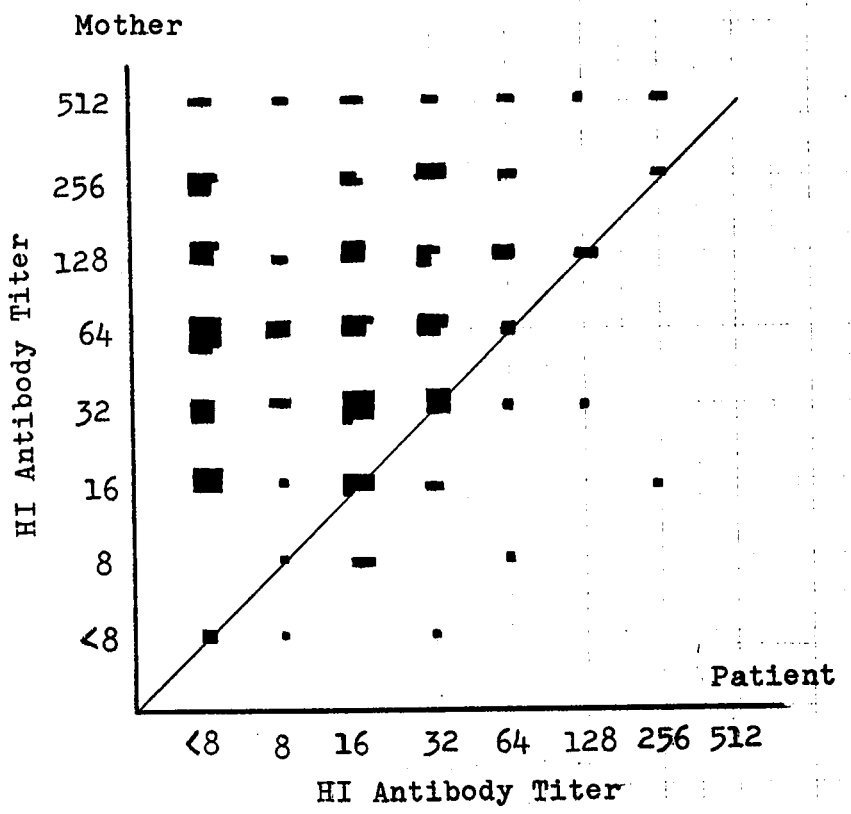
図-2





Distribution of Positive HI Antibody to Rubella Virus

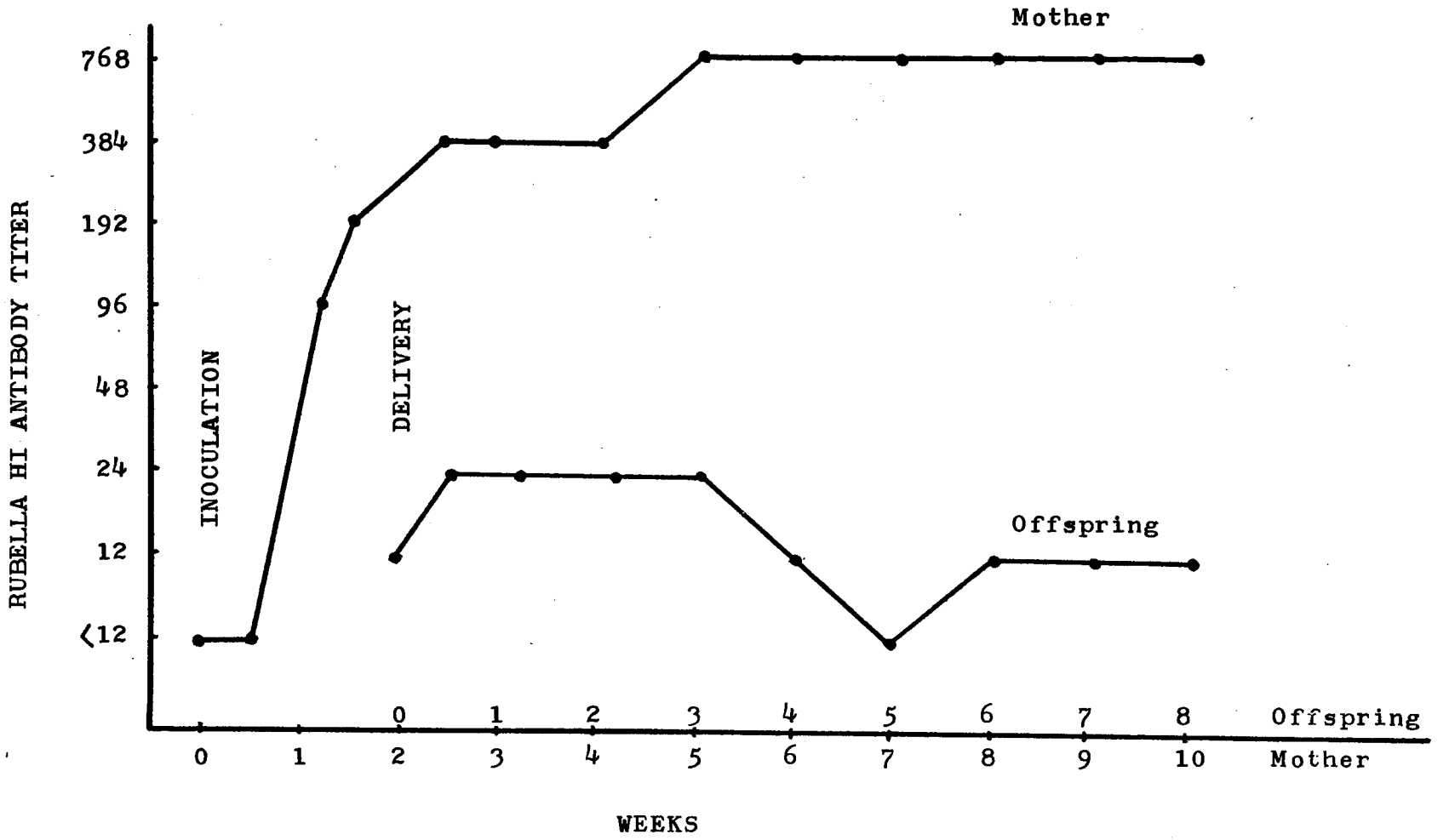
図-3



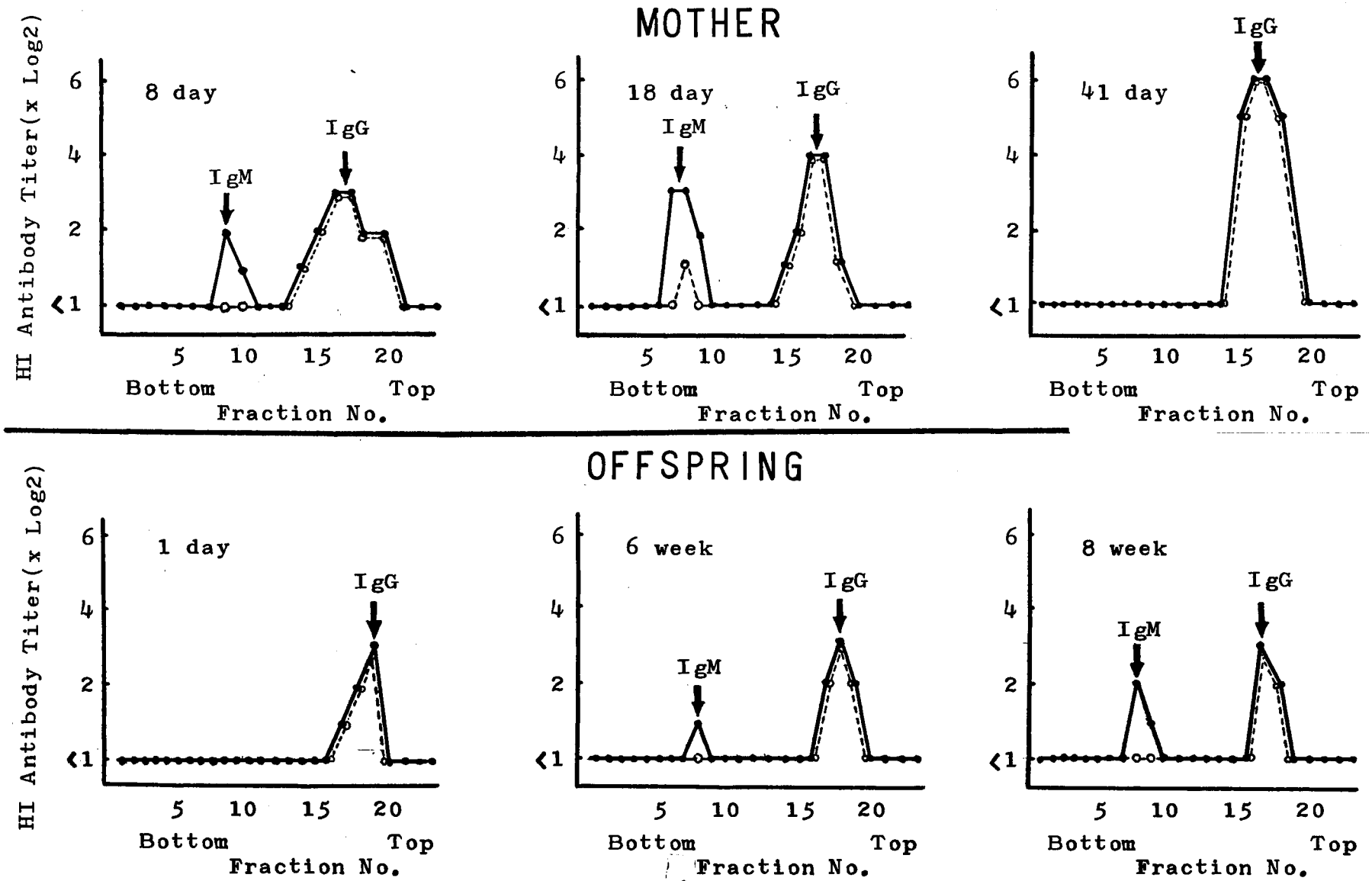
Correlation between the patient's and their mother's HI antibody titer to rubella virus

図－4
右は感染価 5×10^{9} pfu/ml RV浮遊液
静注により発生したマウスの口蓋裂
左はその対照である.

図-5



Rubella HI antibody in virus inoculated mice and their offspring sera.



- Sedimentation analysis of antibodies in mother and offsprin sera.