

# Susceptibility of Mouse Preimplantation Embryos to Sendai Virus Infection

(マウス胚のセンダイウイルスに対する感受性)

## 学位論文内容の要旨

マウス着床前初期胚のセンダイウイルスに対する感受性を調べるため、異なる発育段階の着床前初期胚でセンダイウイルスが感染し、増殖するか否か、また、その際に透明帯の有無が影響するか否かについて *in vitro* および *in vivo* で検討した。さらに、胚の透明帯に付着したウイルスをトリプシン処理によって除去できるか否かを検討した。また凍結-融解胚のセンダイウイルスに対する感受性についても検討した。

センダイウイルスに暴露されたマウス胚のうち、透明帯を除去した桑実胚および透明帯を有する胚盤胞の胚細胞にウイルス抗原が蛍光抗体法によって検出された。しかし、ウイルスに暴露された透明帯を有する2-, 4-, 8-細胞期胚および桑実胚にはウイルス抗原が検出されなかった。センダイウイルスに感染した胚でも拡張胚盤胞まで形態学的に正常に発育した。

透明帯を有する胚はセンダイウイルスに感染せず、偽妊娠マウスの子宮内に移植したところ正常な胎子に発育した。一方、透明帯除去胚はセンダイウイルスに感染し、子宮内に移植された64個の胚のうち1個が産子に発育したのみであった。センダイウイルスに暴露された透明帯除去胚を *in vitro* で培養したところ、培養液中のウイルス感染価が経時的に増大したことから、胚でウイルス増殖が起こることが判明した。ウイルスに暴露した透明帯除去胚およびこれらの胚を移植した後に発育した胎子の組織中に、蛍光抗体法によってウイルス抗原が検出された。

センダイウイルスに暴露された胚盤胞から、トリプシン処理によるウイルス除去を試みたが、透明帯に付着したウイルスを完全に除くことはできなかった。ウイルスに暴露した後にトリプシンで処理した胚は24時間の体外培養後、拡張胚盤胞に発育した。ウイルスに暴露された胚をトリプシン処理した後も洗浄液からセンダイウイルスが分離された。

凍結-融解された胚盤胞はセンダイウイルスに感染した。一方、凍結-融解された桑実胚は感染に抵抗性であった。センダイウイルス感染は、凍結-融解胚の *in vitro* での発育を阻害しな

かった。

以上の結果から、マウスの胚細胞はセンダイウイルスに対して高い感受性を有することが判明した。さらに、センダイウイルス感染は、胚の初期発生および胎子の発育に影響をおよぼした。透明帯はセンダイウイルス感染に対して防御壁の役割を果たしていた。胚に付着したウイルスを除去するために推奨されている洗浄およびトリプシン処理法によって透明帯に付着したセンダイウイルスを完全に除去することはできなかった。

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	金川	弘司
副査	教授	橋本	信夫
副査	教授	小沼	操
副査	助教授	喜田	宏

本研究は、マウス胚とセンダイウイルスを用いて、胚とウイルスの相互作用について検討し、ウイルス感染胚の *in vitro* および *in vivo* での発育能・ウイルス付着胚からのウイルス除去法の検討・胚の凍結－融解がウイルス感染に与える影響など家畜胚流通時の胚の微生物汚染に関する諸問題の解明を試みたものであり、英文86頁からなる論文に5編の参考論文を付している。

マウス着床前初期胚のセンダイウイルスに対する感受性を調べるため、異なる発育段階の着床前初期胚にセンダイウイルスが感染し、増殖するか否か、また、その際に透明帯の有無が影響するか否かについて *in vitro* および *in vivo* で検討した。さらに、胚の透明帯に付着したウイルスをトリプシン処理によって除去できるか否かを検討した。また、凍結－融解胚のセンダイウイルスに対する感受性についても検討した。

センダイウイルスに暴露されたマウス胚のうち、透明帯を除去した桑実胚および透明帯を有する胚盤胞の胚細胞にウイルス抗原が蛍光抗体法によって検出された。しかし、ウイルスに暴露された透明帯を有する2－、4－、8－細胞期胚および桑実胚にはウイルス抗原が検出されなかった。センダイウイルスに感染した胚でも拡張胚盤胞まで形態学的に正常に発育した。

透明帯を有する胚はセンダイウイルスに感染せず、偽妊娠マウスの子宮内に移植したところ正常な胎子に発育した。一方、透明帯除去胚はセンダイウイルスに感染し、子宮内に移植された64

個の胚のうち1個が産子に発育したのみであった。センダイウイルスに暴露された透明帯除去胚を *in vitro* で培養したところ、培養液中のウイルス感染価が経時的に増大したことから、胚でウイルス増殖が起こることが判明した。ウイルスに暴露した透明帯除去胚およびこれらの胚を移植した後に発育した胎子の組織中に、蛍光抗体法によってウイルス抗原が検出された。

センダイウイルスに暴露された胚盤胞から、トリプシン処理によるウイルス除去を試みたが、透明帯に付着したウイルスを完全に除くことはできなかった。ウイルスに暴露した後にトリプシンで処理した胚は24時間の体外培養後、拡張胚盤胞に発育した。ウイルスに暴露された胚をトリプシン処理した後も洗浄液からセンダイウイルスが分離された。

凍結-融解された胚盤胞はセンダイウイルスに感染した。一方、凍結-融解された桑実胚は感染に抵抗性であった。センダイウイルス感染は、凍結-融解胚の *in vitro* での発育を阻害しなかった。

以上の結果から、マウスの胚細胞はセンダイウイルスに対して高い感受性を有することが判明した。さらに、センダイウイルス感染は、胚の初期発生および胎子の発育に影響をおよぼした。透明帯はセンダイウイルス感染に対して防御壁の役割を果たしていた。胚に付着したウイルスを除去するために推奨されている、洗浄およびトリプシン処理法によって透明帯に付着したセンダイウイルスを完全に除去することはできなかった。

以上のように申請者は、マウス胚のセンダイウイルスに対する感受性を調べ、感染胚の *in vitro* および *in vivo* での発育能を検討することにより、ウイルス感染胚が *in vitro* で一見正常に発育すること、さらに一見正常に見える感染胚の移植後の胎子への発育は極めて悪いことを示した。また、家畜胚の流通時に主に用いられている胚の洗浄法では胚に付着したセンダイウイルスを除去できないことを示した。さらに、家畜胚の流通時には胚は凍結されるが、胚盤胞ステージの胚は凍結-融解によってセンダイウイルスに感染することを示した。これらの成果は、この分野の発展に貢献するところが大きいので審査員一同は申請者アペロ カルメンシタ ラヴィリア氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格があるものと認める。