— Note —

Cleaning of Sendai Virus-infected Mice by Embryo Transfer Technique

Masanori OKAMOTO, Satoru MATSUSHITA, and
Tsuneya MATSUMOTO

*National Institute of Radiological Sciences,
4-9-1 Anagawa, Chiba-shi 260, Japan*

(Received 13 April 1990/Accepted 19 June 1990)

Mouse embryos (8-16 cells) were collected from Sendai virus (SV)-infected mice at 5 or 7 weeks after inoculation. All donors having embryo(s) were positive when tested by CF test or ELISA for SV antibody at the time of embryo collection. Most of the morphologically normal embryos developed (90.6%, 259/286) to morulae or blastocysts after culture for 26-28hr. A total of 76 embryos cultured were transferred to the uteri of SV-free pseudopregnant recipients. Forty-seven young were obtained from these recipients (61.8% of development rate) and 46 young were successfully reared up to 10th week of age. All the recipients and the young were negative by testing SV antibody. These results indicate that the embryo transfer technique is useful for cleaning of SV-infected mice.

胚移植法を用いたセンダイウイルス感染マウスの清浄化

岡本正則・松下 悟・松本恒弥

放射線医学総合研究所

胚移植技術は、発生工学の分野において人為操作を加えた受精卵を個体へ発生させるための重要な技術である [11]。また本技術は病原微生物に感染した動物からの垂直感染を防衛し、病原微生物を除去する手段としても有用であることが知られている [3]。マウスについて、センダイウイルス (Sendai virus: SV) およびマウス肝炎ウイルス、パストレラによる感染マウスの清浄化を行った報告 [1, 2, 8] がある。

著者らの研究所では、これまでに数回研究上の必要性から、SV 抗体陽性のマウスを導入せざるを得ない場合があった。SV 感染症においては血中の抗体が上昇するのに伴い、体内よりウイルスが消失すると考えられている [4, 7]。しかし抗体の上昇にもかかわらず、ウイルス核酸が検出されるとする報告もあり [6]、抗体上昇後の感染性ウイルスの存在は完全に否定できない。このため、

我々は外部から種動物として導入した近交系マウスは、SV を含む各種微生物抗体検出の有無にかかわらず、一度子宮切断術による清浄化処置を施した後に、清浄飼育施設において生産に供する方式をとっている。しかし子宮切断術法による清浄化は微生物の種類により必ずしも確実とはいえず、生産効率も低いという欠点を持っている。本研究では、従来の子宮切断術法に代わる胚移植法について、SV 抗体陽性マウスの清浄化における効率性について検討した。

動物: ドナーマウスは、Jcl: MCH (ICR) (日本クレーア, SV-free の SPF) の雌マウスを使用した。交配用の雄および精管結紮雄マウスについても同系を用いた。胚移植用のレシピエントマウスには、当所生産の (C57BL/6 JNrs × C3H/HeMsNrs) F₁ (SV-free の SP F) を用いた。

SV 感染：ドナーは、7週齢時にエーテル軽麻酔下で、鼻孔に $10^{3.5}$ TCID₅₀ ($10^{3.5}$ Tissue culture 50% infectious doses) /20 μ l/ 匹の SV (M-73株、国立予研獣疫部鈴木映子博士より分与された) 浮遊液を接種した。接種後、臨床症状を観察するとともに経時的に体重測定を行った。そこで、スナッフ、立毛の症状を示し、接種前より有意に体重の減少した個体を感染の成立したものと判定し、胚採取用に供した。

胚採取：ドナーの過剰排卵誘起および胚採取法は、Yokoyama ら [10] の方法に準じた。すなわち、SV 接種後 5 または 7 週目に PMSG, hCG 各々 5 IU を 48 時間間隔で腹腔内注射し、排卵誘起を行った。hCG 注射後に同系の雄と交配し、膣栓を確認 (妊娠第 1 日目) した個体は、第 3 日目に卵管、子宮を灌流し、8~16 細胞期胚を採取した。形態的に正常な胚は、修正 Whitten 培養液 [9] 内で、26~28 時間体外培養 (37℃, 5% CO₂, 95% 空気) を行った。

胚移植：培養後、正常に発生した桑実胚および胚盤胞は偽妊娠 (精管結紮雄との不妊交尾により誘起) 第 3 日目のレシピエント (12~13 週齢) の子宮に移植した。産子は生後 10 週齢時まで育成した。

微生物学検査：SV 感染の有無を検査する目的で、接種したドナーは胚採取時に、またレシピエントおよび産子は生後 10 週齢時に、各々剖検を行うとともに補体結合 (CF) 反応、免疫酵素抗体 (ELISA) 法により、血清中の抗体価の測定を行った。

飼育管理：SV 接種前の個体は清浄動物飼育装置 (明文館製) 内、接種後は感染動物飼育装置 (トキワ製) 内で飼育した。胚移植後のレシピエントは、滅菌済の感染動物飼育装置内で維持した。なお滅菌後の本装置内は、事前の検討で SPF 状態を保持していることが確認され

ている。

SV 感染マウスより採取した正常胚の数および体外培養後の発生成績を **Table 1** に示した。SV 接種後のマウスの生存率は、実験Ⅰが 50.0%, 実験Ⅱが 93.5% であった。SV 感染マウスの過剰排卵誘起後の膣栓形成率 (81.0%, 17/21) は、同系の SPF マウスによる結果 [5] と比較しても、高い値であった。これら 17 匹のマウスより計 286 個の胚を採取した。マウス 1 匹当たりの正常胚数の平均値は 16.8 個となった。この内、培養後に正常な桑実胚または胚盤胞に発生した胚の場合は、90.6% (259/286) と高値を示した。胚採取したドナー (17 匹) は SV の抗体価の測定を行い、全ての検体が 20~80 倍の CF 抗体価を示し、感染の成立していたことが確認された。

SV 感染マウスから採取し、培養後に桑実胚または胚盤胞に発生した胚の移植成績を **Table 2** に示した。76 個の胚は 9 匹のレシピエントに移植し、8 匹が妊娠した。その結果、移植胚総数の 61.8% に当たる 47 匹の産子を得た。妊娠したレシピエントの内、7 匹は妊娠第 20 日までに自然分娩 (産子 45 匹) をしたが、残り 1 匹は妊娠第 20 日目に子宮切断術を行い、2 匹の子を得た。これらの子は同一実験群のレシピエントを里親として、哺育させた。47 匹の産子は全例が離乳した。離乳直後に 1 匹は死亡したが、46 匹は生後 10 週齢まで育成した。分娩したレシピエント (8 匹) および移植による子 (46 匹) の血清中から、CF 反応および ELISA 法のいずれにおいても SV 抗体は検出されなかった (**Table 2**)。剖検でも、SV 感染を疑わせる病変は認められなかった。なお育成中に死亡した 1 例についても、剖検で感染性の病変は認められなかった。

以上の結果から、十分に抗体価が上昇した SV 感染マウスから胚を採取し、SPF マウスに移植することによ

Table 1. Number of embryos collected from Sendai virus-infected mice and development of embryos after culture for 26-28 hr

Exp. no.	No. of animals inoculated	No. of animals survived after infection (%)	No. of animals treated with PMSG-hCG	No. of animals having embryo(s)* (%)	No. of morphologically normal embryos collected**	No. of embryos developed to morula or blastocyst*** (%)
I	10	5 ^a (50.0)	5 ^a	5 (100)	32	28 (87.5)
II	31	29 ^b (93.5)	16 ^b	12 (75.0)	254	231 (90.9)
Total	41	34 (82.9)	21	17 (81.0)	286	259 (90.6)

a : At 5 weeks after inoculation

b : At 7 weeks after inoculation

* : Animals with vaginal

plug after mating

** : 8-16 cell stages on day 3 (discovery of vaginal plug is taken as day 1)

*** : Morphologically normal embryos after culture for 26-28 hr in vitro

Table 2. Development of embryos collected from Sendai virus (SV)-infected mice after transfer to pseudoprnanant recipients

Exp. no.	No. of embryos transferred	No. of pregnant recipients/No. of recipients	No. of live young			No. of young weaned (♀:♂)	No. of SV positive/No. of young tested****
			Total (%)*	born	caesarean-derived**		
I	5	1/1	5 (100)	5	0	5 (3:2)***	0/4
II	71	7/8	42 (59.2)	40	2	42 (24:18)	0/42
Total	76	8/9	47 (61.8)	45	2	47 (27:20)	0/46

* : Based on a total number of embryos transferred into the recipients. ** : The recipients were performed caesareotomy on day 20. The young were fostered by mother of the same group. *** : One mouse died after weaning **** : Sera from young were tested for the presence of anti-SV antibody by CF test or ELISA at 10th weeks of age.

り、清浄なマウスを作出できることが示された。なお、胚移植によるSV感染マウスの清浄化に関し、Carthewら[1]は接種後1週間を経過したドナーより胚採取を行い、レシピエントに移植して清浄な産子を得ている。

病原微生物に感染したマウスを清浄化する方法として、子宮切断術法が広く用いられている。しかしこの方法は、垂直感染を起こす病原微生物では手術時に胎子への感染がすでに成立していることがあるので、確実性に乏しい。また、手術を行う時期の早い場合に胎子の発育が不十分で蘇生しないことや、里親哺育が成功しないことなどがあるので効率的とはいえない。当研究所における昨年の実績では、子宮切断術の成功率および蘇生し里親哺育を試みた子の数に対する離乳子の割合は、各々18.2% (2例/11例)、15.3% (9匹/59匹)であり低いのが実状である。これに対して本研究の胚移植法は、成功率および移植胚数に対する離乳子の割合が、各々88.9% (8/9) および60.5% (46/76) と高くなった (Table 2)。胚移植法は従来の子宮切断術法に比べて簡便で効率的であり、とくに生産コロニーにおいては実用性が高いと考えられる。今後はSV感染マウスの清浄化を行う方法として、胚移植法が実用上有効な手段の一つになると思われる。

要 約

SV感染マウス (ドナー) から、ウイルス接種後5または7週目に胚を採取し、SV抗体陰性のSPFレシピエントに移植した。ドナーは血清のSV抗体の検査により、全例が陽性を示し、感染が成立していた。ドナー17匹より計286個の正常胚を得て、培養後に桑実胚または胚盤胞に発生した胚は259個 (90.6%)であった。76個

の胚を9匹のレシピエントに移植し、8匹が妊娠・分娩した。移植した胚の61.8%に当たる47匹が産子へ発生した。レシピエントおよび産子は血清のSV抗体の検査において、全例、ともに陰性を示した。以上より、抗体陽性のSV感染マウスは、SPFのレシピエントに胚移植を行い、清浄なマウスの作出の可能なことが明らかとなった。

本研究に当たり、センダイウイルス株を分与して下さった国立予研疫部鈴木映子博士、胚培養と移植につき研修させていただいた (財) 実験動物中央研究所野村達次所長、横山峯介室長ならびに校閲の労をとられ、有益な助言をいただいた東京大学医科学研究所豊田裕教授に対し感謝いたします。

文 献

- [1] Carthew, P., Wood, M. J., and Kirby, C. (1983). *J. Reprod. Fert.*, **69**, 253-257.
- [2] Carthew, P., Wood, M. J., and Kirby, C. (1985). *J. Reprod. Fert.*, **73**, 207-213.
- [3] Eaglesome, M. D., Hare, W. C. D., and Singh, E. L. (1980). *Can. Vet. J.*, **21**, 106-112.
- [4] Iwai, H. and Itoh, T. (1982). *Exp. Anim.*, **31**, 129-133.
- [5] 小島博子・横山峯介 (1985). MCH動物データ集, pp. 13-16, MCH動物研究連絡会編, 日本クレア, 東京.
- [6] Koch, E. M., Neubert, W. J., and Hofshneider, P. H. (1984). *Virogy*, **136**, 78-88.
- [7] Parker, J. C. and Reynolds, R. K. (1968). *Am. J. Epidemiol.*, **88**, 112-125.
- [8] Reetz, I. C., Wullenweber-Schmidt, M., Kraft, V., and Hedrich, H.-J. (1988). *Lab. Anim. Sci.*, **38**, 696-701.
- [9] Whitten, W. K. (1971). *Adv. Biosci.*, **6**, 129-141.
- [10] Yokoyama, M., Wakasugi, N., and Nomura, T. (1981). *In Proceeding of the Workshop on Embryo Storage and Banking in Laboratory Animals*, pp. 113-117, G. H. Zeilmaker (ed.), Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York.
- [11] 横山峯介・勝木元也・野村達次 (1988). 実験医学, **6**, 246-251.