

3. 体細胞核移植 PGCs の作製

3-1. 目的

一般的に用いられている核移植の方法は、顕微注入法と細胞融合法の2つに大きく分けることが出来る。

まず、前者の顕微注入法は、マイクロマニピュレーターを用いて、取り出した核をレシピエント細胞質内に注入する方法で、主に、哺乳動物の卵子や胚への核移植に用いられている (Tsunoda *et al.*, 1987; Wakayama *et al.*, 1998)。この方法は、細胞の種類を問わず、また一つ一つの細胞への核の注入を確認しながら確実に行うことが出来る反面、核移植用に設定された顕微鏡やマイクロマニピュレーター、精密なガラスピペットなど、高価な設備を必要とし、また一つずつ細胞を操作するために、操作できる細胞数に限界がある。

一方、後者は細胞と細胞あるいは細胞膜を持った核体との間の膜融合を誘発する方法で、センダイウイルス (Poste, 1970)の他、多糖類 (Lucy, 1980)や、DMSO (Wilairat *et al.*, 1978)、グリセリン (Holt and Dott, 1980)、カルシウムイオン (Toister and Loyter, 1971)、ポリエチレングリコール (Lents and Lee, 1999)などの水溶性物質、蛋白質分解酵素 (Lucy, 1980)、リソレシチン (Koprowski and Croce, 1973)などの脂溶性物質、浸透圧 (Ahkong and Lucy, 1986)や酸 (Gancevici *et al.*, 1972)、電気 (Neil and Zimmermann, 1993)などの物理的刺激などによって誘発される。このなかでも、センダイウイルス、ポリエチレングリコール、および電氣的刺激が最も広く用いられている。これら3つの方法は、いずれも細胞への毒性が小さく、簡単な操作で膜融合を達成することができる。しかし、センダイウイルスおよびポリエ

チレングリコールによる細胞融合では、多数の細胞が融合した巨大細胞ができやすい。一方、電気融合では電氣的に細胞を整列させることができるため、融合する細胞数を調整することが比較的容易であり、また融合効率も最も高いとされている。

そこで、本研究では、電気融合法による PGCs と体細胞の細胞融合によって、核移植を行うこととした。

電気融合では、まず細胞懸濁液に交流電流を流すことで (AC フィールド)、細胞に電氣的な極性を持たせ、電流の向きに平行に、また細胞が密着した状態で整列させる (パールチェーンの形成)。その後、極めて短時間の強い直流電流 (DC パルス) を数回負荷することによって、細胞膜に一時的な崩壊を引き起こすが、ただちに細胞膜が修復される際に、一部の接触した細胞間に膜融合が起き、細胞融合が達成される。この際、細胞を懸濁する融合液には、通電による温度上昇を防ぐため、主に糖類などの非電解質の水溶液が用いられるが、この融合液の浸透圧が細胞融合の効率に影響する要因の一つであるとされている (Neil and Zimmermann, 1993)。また、電気融合の際の細胞密度も融合効率との関連が考えられる。したがって、これらの条件について比較することによって、PGCs への効率的な核移植法を確立することが出来る。

一方、体細胞として、今回は 2 日胚から採取した胚性血球細胞 (EBCs) を用いることとした。EBCs は、2 日胚の血液から PGCs を分離した後の副産物として回収できる、有核の比較的未分化な細胞であると考えられる。また、細胞の直径が小さいことから、除核による核体の作製が不要であり、多数の細胞を容易に採取できることから、培養を行わずとも比較的均質なサンプルを作成することが出来る。したがって、融合条件のみを検討するためには適した材料で

あると考えられる。

そこで、本章では、PGCs への効率的な体細胞核移植法を確立することを目的として、PGCs と EBCs との電気融合における、AC フィールドの電圧および負荷時間、DC パルスの電圧および回数、融合液の濃度、および融合液中の細胞密度について検討した。

3-2. 材料および方法

(1) 受精卵の採取および採血

供試動物として RIR 種を用いた。受精卵の採取、孵卵および 2 日胚からの採血は、前章に準じて行った。

(2) PGCs および EBCs の採取

2~3 個体の 2 日胚より採取した約 10 μ l の血液を約 25 倍量の培養液で希釈し、その 50 μ l を HTCS (15mm、2 穴) 上に滴下し、倒立顕微鏡下でガラス針を用いて PGCs を回収し、HTCS 上の PKH-26 溶液 50 μ l に移した。37.8 $^{\circ}$ C で 5 分間保温し染色した後、再度ガラス針で拾った PGCs を、HTCS 上の FBS を含んだ融合液 50 μ l 中に移し、電気融合直前まで、プラスチックシャーレ内で室温に放置した。

一方、EBCs サンプルは、2~3 個体の 2 日胚より採取した約 10 μ l の血液から作製した。血液を培養液 100 μ l に希釈し、1.5ml 遠心チューブ内で 500 μ l の 16% (w/v) Ficoll 溶液に重層し、30 分間遠心分離 (800g) した (Ficoll 濃度勾配遠心分離法)。PGCs を含む上清を捨て、沈殿を 50 μ l の融合液に希釈した。つづいて、孔径 0.8 μ m のメンブレンフィルター (ATTP01300, Millipore, USA) を用いて、EBCs を融合

液で3回洗浄した（フィルター法）。フィルター上に残ったEBCsを融合液100 μ lに回収し、Thomaの血球計算盤（E0365, 蘆垣医理科工業, 東京）を用いて細胞密度を測定し、目的の濃度に希釈した。

（3）電気融合

電気融合は、電源としてLF101（BEX, 東京）を用い、融合チャンパー（FTC-12, 島津製作所, 京都）内で行った。また、融合液には、10% FBSを添加したサッカロース溶液を用いた。

目的の濃度の融合液に希釈したEBCsサンプル10 μ lを小滴状に融合チャンパー内に滴下し、約500 μ lの流動パラフィン（164-00476, 和光）を重層した。続いて、HTCS上の融合液中のPGCsを14~27個、ガラス針を用いて拾い、チャンパー内の融合液中に注入した。

チャンパーを5分間静置後、ACフィールド、およびDCパルスにて細胞融合を誘発、さらにACフィールドと同条件の交流電流を流して融合を促進させた。融合チャンパーは、37.8 $^{\circ}$ Cで30分間静置した後、Hoechst 33342（2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole, B-2261, Sigma, USA）を1 μ g/mlの濃度に加え、37.8 $^{\circ}$ Cで5分間保温して、細胞の核を染色した。最後に、チャンパー内の融合液をガラスピペットを用いて回収し、HTCS上に滴下した。

（4）観察

ACフィールドによるパールチェーンの形成は、倒立顕微鏡下で通電中の融合チャンパー内の細胞を観察した（Figure 3-1）。その形態によって同定されたPGCsのうち、パールチェーンを形成しているPGCsの割合を計測した。

細胞融合操作後、HTCS上に回収したサンプルを、波長546 nmお

よび 334nm の励起フィルターを用いて観察した。まず、PKH 陽性細胞数を計測し、PGCs の回収率を算出した。つづいて、PGCs と EBCs の核はその大きさが極めて異なるため、PKH 陽性で、かつ極めて大ききの異なる核を複数持つ細胞を EBCs と融合した PGCs とみなし (Figure 3-2)、使用した PGCs 数に対する融合率を計測した。

(5) 検討項目

まず、AC フィールドでは、周波数 0.5 MHz の交流電流を、300、350、および 400 V/cm の電圧で、30、60、90 秒間負荷したときの、PGCs のパールチェーン形成効率を調べた。その際、融合液の濃度は 0.25 M、EBCs の細胞密度は 2×10^4 とした。それぞれの条件下での形成効率を、式 (2) を用いた二元配置の分散分析にて検定した。このとき α は電圧、 β は負荷時間とした。さらに、電圧と負荷時間の間に交互作用が認められた場合には、一元配置に組みなおした Duncan の多重検定法にて比較した。

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ij} \quad \dots \text{式 (2)}$$

DC パルスは、マニュアルに従いパルス幅を 60 μ 秒、パルス間隔を 1 秒とし、電圧 3、4、5 kV/cm、およびパルス回数 1、2、3 回のときの PGCs の回収率および融合効率を計測した。このとき、AC フィールドは 350 V/cm、60 秒間、融合液は 0.25 M、EBCs の細胞密度は 2×10^4 とした。それぞれの条件下での回収率および融合効率を、式 (2) を用いて α を電圧、 β をパルス回数とした二元配置の分散分析により検定した。また、電圧とパルス回数との間に交互作用が認められた場合には、一元配置に組みなおした Duncan の多重検定法にて

比較した。

融合液の濃度について、0.2、0.25、0.3、および 0.35 M のときの回収率および融合効率を比較した。この際、電気融合は 350 V/cm、60 秒の AC フィールドにつづく 4 kV/cm、3 回の DC パルスで行い、EBCs の細胞密度は 2×10^4 とした。

最後に、EBCs の細胞密度を、 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 と調整して、0.25 M の融合液中で AC フィールド (350 V/cm、60 秒)、および DC パルス (4 kV/cm、3 回) による PGCs の回収率および融合効率を比較した。

融合液の濃度および EBCs の密度による融合効率および回収率は、 α を融合液濃度あるいは EBCs 密度式とした式 (1) を用いた一元配置の分散分析および Duncan の多重検定法にて比較した。

3-3. 結果

AC フィールドの電圧を 300、350、および 400 V/cm、負荷時間を 30、60、および 90 秒としたときの、PGCs のパールチェーン形成効率を Table 3-1 に示した。電圧が 350 および 400 V/cm のとき、300 V/cm に比べ有意に高い値を示し ($P < 0.05$)、また負荷時間が 60 および 90 秒のとき、30 秒に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。電圧と負荷時間の間に交互作用は認められなかった。また、電圧 400 V/cm、負荷時間 90 秒のとき、最も高い値を示したが、通電中に崩壊する PGCs が多数見られた。

融合 PGCs の観察では、PKH の染色性および核の大きさの比較により、融合 PGCs と分裂中の PGCs を容易に区別することが出来た

(Figure 3-2)。

DC パルスの電圧を 3、4、および 5 kV/cm、パルス回数を 1、2、および 3 回として PGCs の回収率および融合効率を比較した (Table 3-2)。電圧が 5 kV/cm のとき、ほとんどの PGCs は破裂するように崩壊し、計測が不可能であった。PGCs の回収率には、DC パルスの電圧および回数による差は認められなかった。融合効率は電圧が 4 kV/cm のとき 10 % を越える高い値となり、3 kV/cm に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。また、パルス回数を 3 回としたときの融合効率は約 11 % と高い値を示し、1 回に比べ有意に高く ($P < 0.05$)、2 回に比べ高い傾向を示した。

融合液のサッカロース濃度を 0.2、0.25、0.3、および 0.35 M としたとき、PGCs の回収率および融合効率を Table 3-3 に示した。回収率に差は認められなかったが、融合率は 0.2 および 0.25 M のときに 10 % 以上の高い値を示したのに対し、0.3 および 0.35 M と濃度が高くなると融合効率は有意に減少した ($P < 0.05$)。

EBCs の濃度を 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 / μ l と調整して電気融合を行った際の PGCs の融合率に差は認められなかったが、EBCs 濃度の上昇とともに、PGCs の融合効率が高くなる傾向が見られた。しかし、回収効率は逆に減少する傾向が見られ、 2×10^5 / μ l のとき、 2×10^3 、および 2×10^4 / μ l に比べて有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。

3-4. 考察

近年、多くの哺乳動物において卵子あるいは 1 細胞期胚をレシピエントとした体細胞核移植が行われているが、その手法として電気

融合が広く用いられている (Wilmot *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 1998; Baguisi *et al.*, 1999; Polejaeva *et al.*, 2000)。しかし、これらの場合では、透明帯と細胞の間隙 (囲卵腔) に体細胞を挿入することによって、細胞同士を密着させることが出来る。

一方、PGCs やその他ほとんどの浮遊性細胞を融合する場合、それらの細胞を効率的に接触させる必要がある。AC フィールドでは、チャンバー内の電場に影響され、細胞が電氣的に極性を持つ。これによって、細胞同士が引き付け合い、電磁線に対して平行に細胞が整列し、パールチェーンを形成する。

本実験の結果、AC フィールドでは、350 から 400 V/cm の交流電流を 60 秒から 90 秒間負荷することによって、PGCs のパールチェーン形成効率 は 50 % 前後の高い値を示すことが明らかとなった (Table 3-1)。しかし、400 V/cm で 90 秒間付加した際に、崩壊した PGCs が多数観察されたことから、AC フィールドによる細胞への物理的負荷が極めて大きいことが想像される。したがって、パールチェーン形成効率が高い条件の中でも、最も負荷の小さいと思われる 350 V/cm、60 秒という条件が、PGCs と EBCs を融合する際の AC フィールドの条件として適当であると思われる、以降の実験では、この条件を用いた。

極めて強い電氣的刺激を細胞に与えた場合、一時的な細胞膜の崩壊が局所的に引き起こされる。この細胞膜の損傷は直ちに修復されるが、この際、修復部位において他の細胞と接触している場合、膜融合が誘発される (Neil and Zimmermann, 1993)。

本実験では、3、4 および 5 kV/cm の DC パルスを用いたが、5 kV/cm の DC パルスは、ほとんどの PGCs を破裂するように崩壊させ、融合を引起す電氣刺激としては強すぎる事が明らかとなった。3 および

4 kV/cm の DC パルスでは、3 回負荷した場合でもそのような PGCs はほとんど観察されなかったが、回収率が 60 から 70% 程度であることを考えると、顕微鏡下では検出できない PGCs の損傷もあることが予想される (Table 3-2)。

また 4 kV/cm で 3 回負荷した際には約 16% という高い融合効率を得ることが出来、今回検討した条件の中では、この条件が最も効率的に PGCs と EBCs との細胞融合を誘導することが明らかとなった (Table 3-2)。しかし、さらに負荷回数を増やした場合、融合効率が改善されることも予想される。

これまで、融合液の浸透圧が、細胞融合における重要な要因であることを示す研究がいくつか報告されている。Ahkong and Lucy (1986) は、ポリエチレングリコールおよび電気刺激による細胞融合を、低浸透圧条件下で行うことによって、融合効率が改善されることを報告した。Neil and Zimmermann (1993) は、総説において、電気融合直前に低浸透圧処理を行うことで、融合液が等張液である場合でも融合効率が飛躍的に改善されることを指摘している。

本実験でも同様に、低張液 (0.2 および 0.25 M) を融合液として用いた場合に、等張液 (0.3 M) および高張液 (0.35 M) にくらべ高い融合率が得られた (Table 3-3)。

細胞の密度も細胞同士が接触する機会に影響すると思われ、 2×10^3 から 2×10^5 の密度に EBCs を調整し電気融合を行ったところ、密度が高くなるのに伴って融合効率も上昇する傾向が見られたが、逆に、PGCs の回収率は大きく減少し、最終的に得られる融合 PGCs 数には大きな違いはないことが推定される。しかし、細胞密度が高くなると、30 分間の培養後、細胞同士が塊を形成し、回収を難しくする傾向が見られたため、 10^3 から $10^4/\mu\text{l}$ 程度の密度が適当なのではな

いかと考えられる。

以上の結果より、10%血清を含んだサッカロース溶液を融合液として用いた場合、サッカロース濃度を 0.2 から 0.25 M、細胞密度を 10^3 から $10^4/\mu\text{l}$ に調整し、0.5 MHz の交流電流を 350 V/cm で 60 秒間流してパールチェーンを形成させた後に、4 kV/cm の DC パルス を 3 回負荷したときに、高い効率で融合 PGCs が得られることが、明らかとなった。

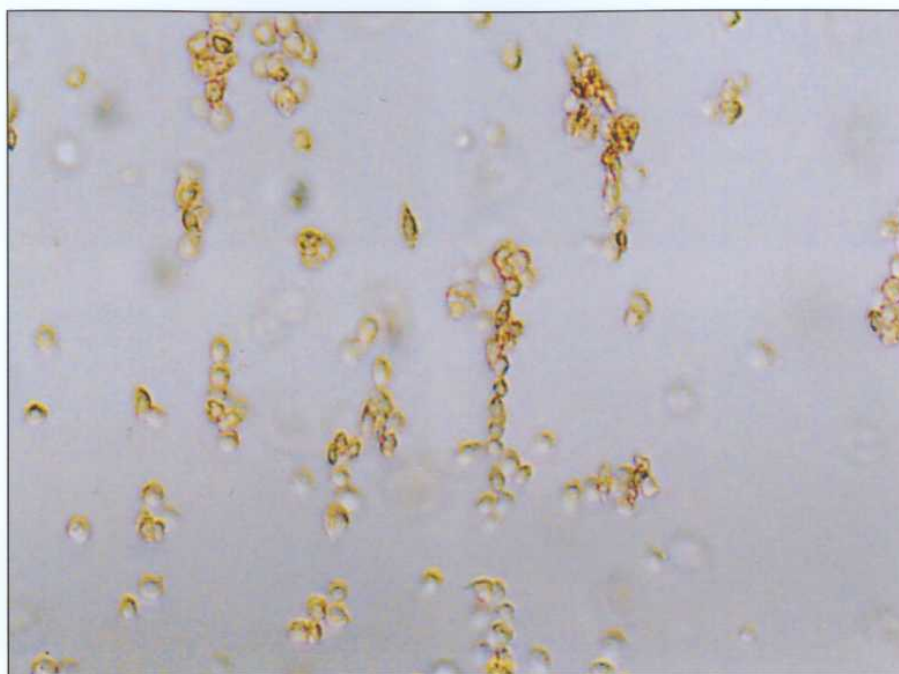


Figure 3-1 Cell alignment (Pearl Chaining) in AC field.

Twenty PGCs and 2×10^3 EBCs were dispersed to 0.25 M saccharose solution supplemented with 10 % serum and exposed to 0.5 MHz AC field at 300 - 400 V/cm for 30 - 90 sec.

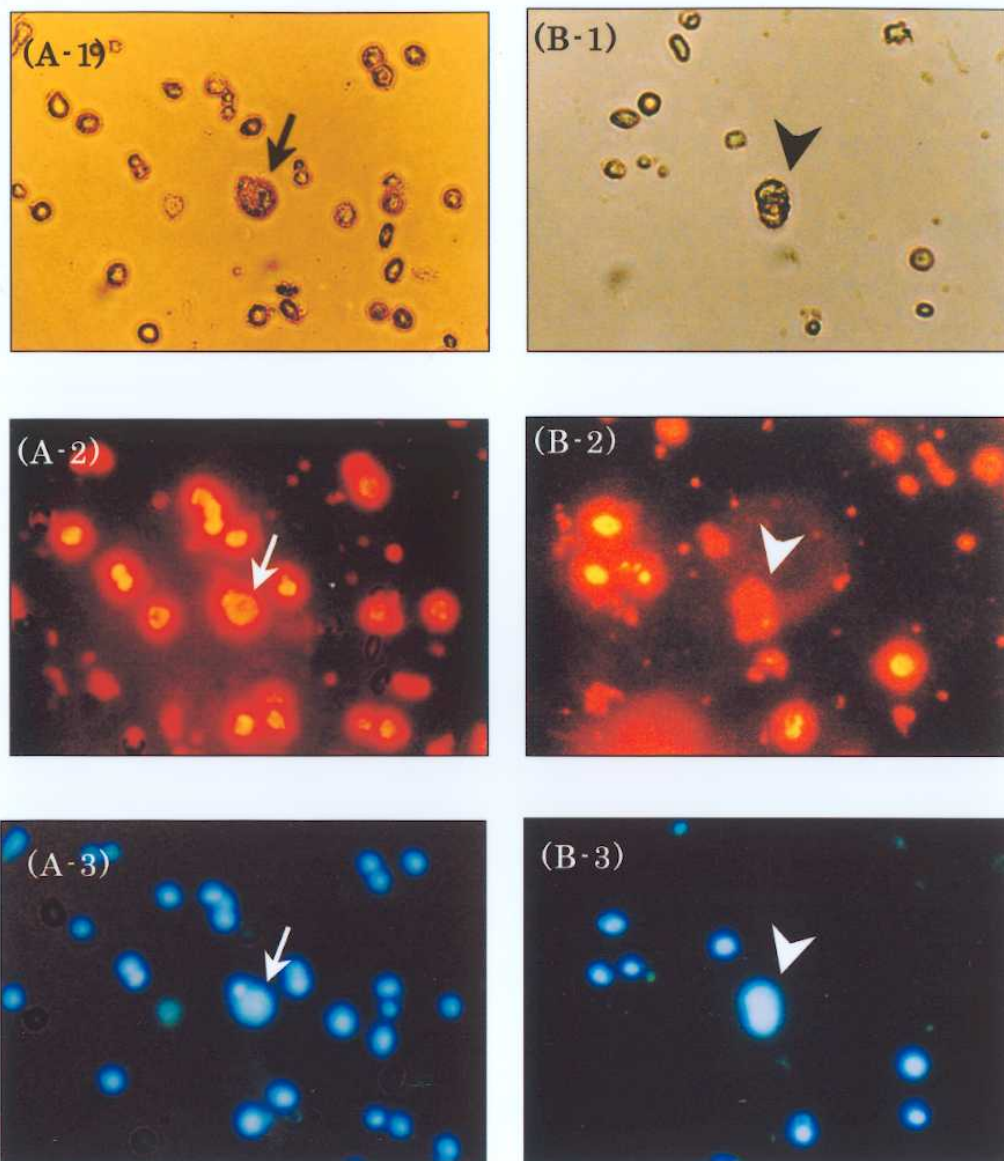


Figure 3-2 Fused PGC produced by electrofusion.

PKH-labeled PGCs were fused with EBCs. The fused PGCs were observed under a light microscope (A-1 and B-1), and fluorescent microscope using 546 nm (A-2 and B-2) and 334nm (A-3 and B-3) excitation filter after staining with Hoechst 33342. The fused PGC (arrow) is PKH-positive (A-2) and have large and small two nuclei (A-3). A mitotic PGC (arrow head) have two large nuclei (B-3), although it is PKH-positive (B-2).

Table 3-1 Pearl chaining efficiency (Mean \pm SE, %) between PGCs and EBCs by various AC field conditions¹.

AC field (V/cm)	Duration (sec.)			Average
	30	60	90	
300	14.0 \pm 2.45	23.0 \pm 3.74	27.0 \pm 3.74	21.33 \pm 2.31 ^B
350	45.0 \pm 1.58	52.0 \pm 5.15	54.0 \pm 3.32	50.33 \pm 2.21 ^A
400	45.0 \pm 1.58	51.0 \pm 3.32	57.0 \pm 2.55	51.00 \pm 1.90 ^A
Average	34.67 \pm 4.04 ^B	42.00 \pm 4.22 ^A	46.00 \pm 4.00 ^A	

¹: Twenty PGCs and 2×10^4 EBCs were dispersed in 0.25 M saccharose solution supplemented with 10 % serum, and exposed to 0.5 MHz AC field.

^A and ^B: Values with different letters in the same column or row are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3-2 Fusion rate and recovery rate of PGCs by electrofusion¹ with EBCs using various DC pulses condition (Mean \pm SE, %).

DC pulses (kV/cm)	Fusion rate (Recovery rate)			
	Pulse number			Average
	1	2	3	
3	3.05 \pm 1.27 (62.30 \pm 8.44)	2.63 \pm 1.09 (62.53 \pm 9.86)	6.41 \pm 1.80 (67.41 \pm 7.65)	4.03 \pm 0.88 ^B (64.08 \pm 4.69)
4	2.54 \pm 1.06 (54.30 \pm 11.57)	11.73 \pm 3.11 (68.32 \pm 7.17)	16.25 \pm 1.37 (70.33 \pm 10.13)	10.17 \pm 1.88 ^A (64.32 \pm 5.57)
5	destroyed	destroyed	destroyed	destroyed
Average	2.79 \pm 0.05 ^B (58.30 \pm 6.88)	7.18 \pm 2.17 ^{AB} (65.43 \pm 5.83)	11.33 \pm 1.96 ^A (68.87 \pm 6.00)	

¹: Twenty PGCs and 2×10^4 EBCs dispersed in 0.25 M saccharose solution supplemented with 10% serum were exposed to DC pulses after AC field (0.5 MHz, 350 V/cm, 60 sec). The width of pulses were 60 μ sec, and the interval between pulses was 1 sec. Cells were collected using glass needle after incubation (38 °C, 30 min).

^A and ^B: Values with different letters in the same column or row are significantly different (P<0.05).

**Table 3-3 Fusion rate of PGCs and EBCs by electro- fusion¹
under different saccharose (Mean \pm SE, %).**

Saccharose concentration (M)	Recovery Rate	Fusion Rate
0.20	84.89 \pm 7.73	12.87 \pm 1.16 ^A
0.25	94.70 \pm 2.17	14.45 \pm 2.01 ^A
0.30	88.06 \pm 6.76	6.12 \pm 2.50 ^B
0.35	80.63 \pm 8.88	0.91 \pm 0.91 ^C

¹: Twenty thousands EBCs were dispersed to 0.2 – 0.35 M of saccharose solution with 20 PGCs. Electrofusion was performed by AC field (0.5 MHz, 350 V/cm, 60 sec) and 3 DC pulses (4 kV/cm, 60 μ sec of pulse width, and 1 sec of pulse interval). Cells were collected using fine glass pipette after incubation (38 °C, 30 min).

^{A-C}: Values with different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Table 3-4 Recovery rate and fusion rate of PGCs after electrofusion¹ under different EBC density.

EBC Density (cells/ μ l)	Recovery Rate (Mean \pm SE, %)	Fusion Rate (Mean \pm SE, %)
2×10^3	91.00 \pm 5.57 ^A	5.02 \pm 2.61
2×10^4	74.00 \pm 5.79 ^A	7.83 \pm 2.68
2×10^5	50.00 \pm 5.48 ^B	10.93 \pm 4.09

¹: Twenty PGCs were fused with EBCs dispersed to 0.25 M of saccharose solution supplemented with 10 % serum by AC field (0.5 MHz, 350 V/cm, 60 sec) and 3 DC pulses (4 kV/cm, 60 μ sec of pulse width, and 1 sec of pulse interval). Cells were collected using fine glass pipette after incubation (38 °C, 30 min).

^A and ^B: Values with different letters in the same column are significantly different (P<0.05).