

原 著

ウシ胎仔線維芽細胞を核体とした除核成熟卵子との
電気融合率に関する検討¹⁾全国農業協同組合連合会 ET センター²⁾東京女子医科大学腎臓病総合医療センター外科浦川 真実¹⁾・宇留野勝好¹⁾・青柳 敬人¹⁾・澤田登起彦²⁾

(受付 平成 13 年 7 月 16 日)

Examination on the Electric Fusion Rate of the Karyoplast-Cytoplasmic
Complexes Using Bovine Fetal Fibroblast Cells for Donor CellsManami URAKAWA¹⁾, Katsuyoshi URUNO¹⁾, Yoshito AOYAGI¹⁾ and Tokihiko SAWADA²⁾¹⁾ET Center, ZEN-NOH²⁾Department of Surgery, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University

We studied electrofusion of bovine karyoplast-cytoplasmic complexes in order to define the parameters which would result in a high yield of fused embryos in nuclear transfer, using bovine fibroblast cells. Experiment 1. The effects of the number of electrical pulses (1~20 times) to the cytoplasmic membrane of matured enucleated oocytes in vitro were examined. The number of damaged oocytes increased with higher pulse frequency of 10~20 times (100 V/mm, 60 μsec). Experiment 2. The effects of the number of electrical pulses (1, 3 or 5 times) to the fusion rates of cytoplasmic (recipient enucleated oocytes) and karyoplasts (donor cells) derived from fetal fibroblast cells were examined. The difference in fusion rate was not significant among the three electrical pulse frequencies. These results demonstrate that the increase of the pulse frequency cause more damage to cytoplasmic membrane while not affecting the fusion rate.

緒 言

近年、各種臓器移植が行われてきているが、慢性的なドナー臓器不足の問題は依然として残されている。この問題を解決する一つの方法として異種移植による提供臓器の確保が挙げられる。しかし、異種移植における最大の問題点は異種臓器血管内皮細胞上に存在するαGal抗原をヒト血液中の自然抗体が認識することにより起こる超急性拒絶反応である。よって、この抗原の合成を触媒するα1,3-galactosyltransferase(α1,3-GT)を不活化させた個体の臓器を利用することで超急性拒絶反

応が抑えられると考えられている¹⁾。

しかし、すべての臓器に分化可能な胚性幹細胞(ES細胞)の樹立はマウスでしか成功しておらず、特定遺伝子を不活化(ノックアウト)して個体を得る技術は特定種に限られていた。近年、体細胞を用いた核移植技術によるクローン産仔作出²⁾が、さらに遺伝子を導入³⁾した体細胞からクローン産仔生産が報告されている。体細胞を用いる核移植技術を用いることで、特定遺伝子をノックアウトした産仔作出の可能性が現実のものとなった。現在、我々は異種移植用臓器確保のための、α1,3-

GT ノックアウトウシ作出を目標として、ウシ胎仔由来線維芽細胞の $\alpha 1,3$ -GT ノックアウトを試みている。また、同時にノックアウト細胞を用いたクローン産仔を効率的に生産する体細胞の核移植方法の確立に向けて検討を行っている。

核移植の一般的な方法では、クローン胚を得るために核体の細胞（ドナー細胞）と核体を受ける除核成熟卵子（レシピエント細胞）を電気融合させた融合胚を得る必要がある。しかし、融合胚を得るために過度の電気刺激を負荷すると細胞膜が壊れて細胞自身の機能を維持できなくなり、逆に負荷が少ないと融合胚を得ることができない。さらに既存の核移植技術は、細胞の大きさが大きい初期胚の割球（直径 25~50 μm ）を用いているため、大きさが直径約 15 μm と小さい体細胞を用いる場合では、初期胚の場合と同じ条件で電気刺激を与えても高率に融合胚を得ることは困難と考えられている⁴⁾。

そこで今回我々は体細胞を用いた核移植融合胚を高率かつ安定して得るために、電圧パルスの負荷時間を一定にして、負荷回数が融合率に及ぼす影響を調べた。実験 1 では電圧パルスの負荷回数を変化させ、レシピエント細胞の細胞膜の崩壊の閾値を検討した。実験 2 では実験 1 の結果をもとに、細胞膜の崩壊が低い電圧パルスの回数を数区設定してウシ胎仔線維芽細胞を核体とした核移植を行い、融合率がどのように変化するかを検討した。

対象および方法

1. 対象

屠場より採取したウシ卵巣（黒毛和種牛）から卵胞卵子を吸引採取し、レシピエント細胞として用いた。また、核体としてウシ胎仔線維芽細胞を実験に用いた。材料の取扱いについては東京女子医科大学の動物実験に関する指針に遵守して行った。

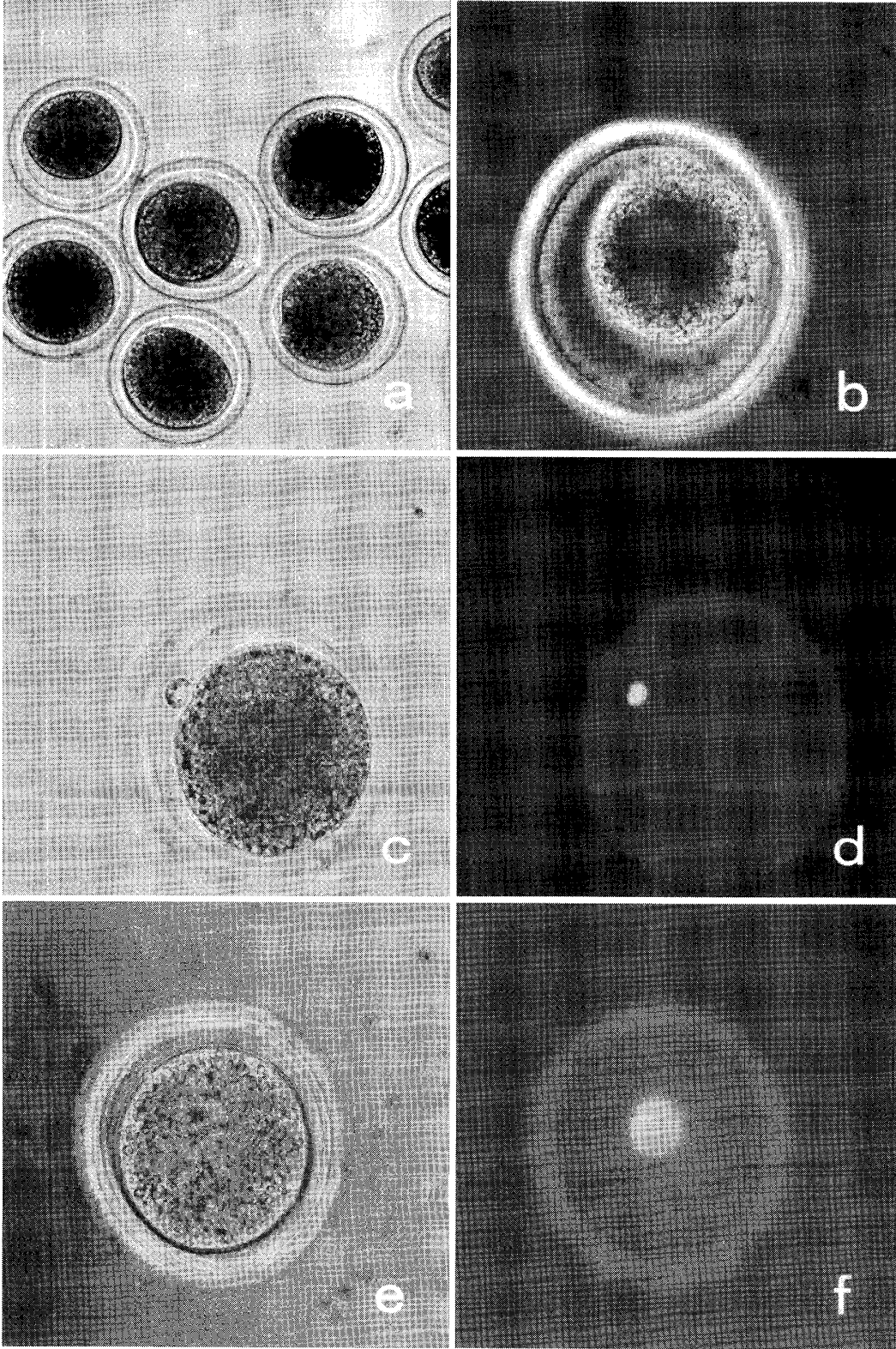
2. 方法

1) 実験 1：レシピエント細胞の膜崩壊に及ぼす電圧パルス負荷回数の検討

採取したウシ未成熟卵胞卵子は、5% ウシ胎仔血清 (FCS) 添加 TCM199 培地 (Gibco BRL, MD, USA) 中で成熟培養 (39 $^{\circ}\text{C}$) を行った。培養開始から 19 時間後、0.1% ヒアルロニダーゼを含む phosphate buffered saline (-) 溶液中でピペティングにより卵丘細胞を除去した。その後、第 1 極体を有し、かつ卵細胞質の均一な卵子のみを選抜し、マイクロマニピュレーター操作により除核操作を行いレシピエント細胞とした⁵⁾。

電気融合は、レシピエント細胞の成熟培養開始から 22~24 時間後に行った。負荷条件は電圧パルス (DC, 100V/mm, 60 μ 秒) で、電気刺激を与える回数を 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 および 20 回 (間隔 0.1 秒) と変化させた。細胞融合には 0.05mM CaCl_2 , 0.1mM MgSO_4 を含む 0.3M マンニトール溶液⁶⁾ を使用した。電気刺激を与えるチャンバーはガラスシャーレ上に白金製の電極 (2cm \times 0.8cm) を 2 本、1mm 間隔で接着したものを使用し、融合装置はエレクトロセルフュージョン (LF101; Bex 社, To-

- 図 a：電圧パルス 5 回負荷後のレシピエント細胞 ($\times 33$)
膜の崩壊が認められない。
- b：電圧パルス 20 回負荷後のレシピエント細胞 ($\times 100$)
膜の崩壊が認められる。
- c：電圧パルス負荷 20 時間後の組み合わせ (非融合胚) ($\times 100$)
囲卵腔内にドナー細胞が認められる。
- d：電圧パルス負荷 20 時間後の組み合わせ (ヘキスト染色, 非融合胚) ($\times 100$)
囲卵腔内に核が認められる。
- e：電圧パルス負荷 20 時間後の組み合わせ (融合胚) ($\times 100$)
囲卵腔内にドナー細胞が認められない。
- f：電圧パルス負荷 20 時間後の組み合わせ (ヘキスト染色, 融合胚) ($\times 100$)
細胞質中に前核期様の核が認められる。



kyo, Japan) を用いた。電気刺激負荷後のレシピエント細胞は Ca イオノホアとサイクロヘキサミド (Sigma Chemical Co, MO, USA) を用いた複合活性化処理方法⁷⁾を実施し、電気刺激負荷から 6 時間後、5%FCS を含む TCM199 培地にレシピエント細胞を移し、翌日まで培養した。電気刺激後、20~24 時間後にレシピエント細胞の膜崩壊を実体顕微鏡下で判定し、細胞膜が破れて卵細胞質が溶出しているレシピエント卵子を崩壊卵子と判定した (図 a, b)。

2) 実験 2: 電圧パルスの負荷回数がウシ胎仔線維芽細胞を用いた核移植後の融合率に及ぼす影響

ウシ体外成熟卵子はマイクロマニピュレーター操作により第 1 極体側の細胞質を約 1/3 取り除き (除核)、レシピエント細胞とした。なお、除核の確認は、除去した細胞質を Hoechst 33342 (Sigma Chemical Co, MO, USA) を含む培地で 30 分間染色後、蛍光装置付き倒立顕微鏡下で核の有無を観察することにより行い、レシピエント細胞中に核が存在しないものを実験に用いた。

ドナー細胞は、妊娠 7 週齢のウシ胎仔由来の線維芽細胞を 10% ウシ胎仔血清加イーグル MEM 培地 (Gibco BRL, MD, USA) を用いて 38°C, 5%CO₂, 95% 空気の気相下で培養し、継代 2 代目の細胞が単層のシートになった状態で実験に供した。

細胞融合は、ドナー細胞をレシピエント細胞の細胞膜に接着するように挿入し、成熟培養開始から約 24 時間目に電圧パルス (100V/mm, 60μ秒) を 0.1 秒間隔で行った。複合活性化処理後、電気刺激負荷から 6 時間目に 5%FCS を含む TCM199 培地中に卵子を移して翌日まで培養した。電気刺激負荷した 20~24 時間後に再構築胚を Hoechst 33342 で 30 分間染色し、蛍光装置付き倒立顕微鏡下で卵細胞質中に核が認められたものを融合胚として判定した (図 c~f)。

3. 統計学的方法

実験 1 の細胞膜の崩壊ならびに実験 2 の融合率に関する有意差検定は χ^2 検定で行い、危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

表 1 電圧パルスの負荷回数がレシピエント細胞の細胞膜の崩壊に及ぼす影響

電圧パルス回数*	供試細胞数	細胞膜崩壊率 (%) (平均±標準偏差)
0	45	0
1	45	0
2	44	0
3	45	1.9 ± 4.5
5	45	4.2 ± 10.2
7	45	7.7 ± 12.4
10	42	37.4 ± 22.2 ^a
20	46	50.9 ± 23.8 ^b

*: 100 V/mm, 60 μ秒, 負荷間隔 0.1 秒, a: 0~7 回と有意差あり (p < 0.01), b: 0~7 回 (p < 0.01) および 10 回 (p < 0.05) と有意差あり, 実験回数は各区 5~6 回実施。

表 2 電圧パルスの負荷回数が核移植後の融合率に及ぼす影響

電圧パルス回数*	供試数	融合率 (%)** (平均±標準偏差)
1	45	47.5 ± 18.1
3	41	58.7 ± 11.3
5	38	54.6 ± 21.7

*: 100 V/mm, 60 μ秒, 負荷間隔 0.1 秒, **: 有意差なし, 実験回数は各区 3 回実施。

結 果

1. 実験 1: レシピエント細胞の膜崩壊に及ぼす電圧パルス負荷回数の検討

電圧パルスを負荷する時間を一定にして、回数を変化させた結果 (表 1), 回数が 0 から 5 回では膜の崩壊はほとんどなく (0~4.2±10.2%, 図 a, b), 7 回からレシピエント細胞の細胞膜が壊れ始め (7.7±12.4%), 20 回では 50.9±23.8% の細胞膜が崩壊した (図 c, d)。

2. 実験 2: 電圧パルスの負荷回数がウシ胎仔線維芽細胞を用いた核移植後の融合率に及ぼす影響

実験 1 の結果から、回数をレシピエント細胞の細胞膜崩壊が低い 1, 3 および 5 回と変えて融合率を検討した (図 e, f)。その結果、融合率は 47.5 ± 18.1% (1 回), 58.7 ± 11.3% (3 回) および 54.6

±21.7% (5回)であり、回数による差は認められなかった (表2)。

考 察

除核したレシピエント細胞で膜の崩壊が起こる負荷回数を検討した結果、回数が3回からレシピエント細胞の膜が崩壊し始め、20回では約60%に達した。Clementら⁸⁾は2細胞期胚の電気融合は電圧パルス負荷の回数が増加すると変性胚の出現も増加すると報告している。今回も同様に負荷回数の増加と共に膜崩壊の増加が見られ、ドナー細胞とレシピエント細胞の融合には膜の崩壊が増加し始める5回以下で行うことが好条件であることが示唆された。

実験1の結果から、膜の崩壊が増加し始める5回以下の電気負荷条件で胎仔線維芽細胞との融合率を検討した結果、融合率は50%前後となり負荷回数を変化させても融合率に差は認められなかった。この結果は回数が増加しても融合率に変化はないという報告⁹⁾とも類似するものであった。また、初期胚割球の融合率は92.2%と高い報告⁹⁾があるが、今回は48.5~58.7%となった。これはドナー細胞とレシピエント細胞との表面積比が大きいため、初期胚と同じ条件で融合させても融合率に差が違いがあったと考えられた。

以上の結果から、体細胞(ウシ胎仔線維芽細胞)を核体とした細胞融合において電圧パルスを負荷する回数の上昇は細胞膜の崩壊を高めること、さらにレシピエント細胞の膜崩壊が低い回数(5回以下)では、その回数がドナー細胞とレシピエント細胞の融合率に影響しないことが示された。また、体細胞でも初期胚の割球を用いた電気負荷条件を応用して、低率ではあるが融合胚を得られることが示され、 $\alpha 1,3\text{-GT}$ をノックアウトしたクローンウシ作出に向けて胎仔線維芽細胞が利用可能であることが示された。

結 論

ウシ初期胚を用いた核移植技術を応用して、体細胞由来クローン産仔作出のための核移植胚を効率的に得るために、核体と除核卵細胞質の電気融合に関する検討を行った。その結果、電圧パルス負荷回数の増加が卵細胞膜の崩壊を高めること、膜の崩壊が低い回数では融合率に変化はなく、体細胞を用いた電気負荷条件は卵細胞膜の崩壊を少なくするために5回以下の負荷で行うことが示され、初期胚を用いた電気負荷条件で体細胞由来の核移植による融合胚を得られることが示唆された。

文 献

- 1) 村上 徹, 澤田登起彦, 中島一朗ほか: ウシ胎仔線維芽細胞における αGal 抗原に関する検討. 移植 34: 367-371, 1999
- 2) Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J et al: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385: 810-813, 1997
- 3) Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ et al: Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. Science 280: 1256-1258, 1998
- 4) Stice SL, Keefer CL: Multiple generational bovine embryo cloning. Biol Reprod 48: 715-719, 1993
- 5) Aoyagi Y, Konishi M, Wada T et al: Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocyst after parthenogenic activation or nuclear transfer. (Abstract) Theriogenology 41: 157, 1994
- 6) Zimmerman U, Vienken J: Electric field-induced cell-to-cell fusion. J Membr Biol 67: 165-182, 1982
- 7) 青柳敬人, 小西正人: ウシ体外成熟卵子の人為的活性化処理による胚盤胞への発育に関する研究—直流パルス, Ca イオノホアおよびサイクロヘキシマイドを用いた複合活性化処理について—. J Reprod Dev 40: 5-11, 1994
- 8) Clement-Sengewald A, Brem G: Electrofusion parameters for mouse two-cell embryos. Theriogenology 32: 159-169, 1989