

## HVJによるラット胚割球の融合と融合キメラ胚の発育性について

内海 恭三・守永太賀彦・湯原 正高

(家畜繁殖学研究室)

Received June 30, 1979

### Aggregation and Fusion in HVJ-infected Blastomere of Rat Embryos and the Subsequent Developmental Ability of the Aggregates

Kyozo UTSUMI, Takahiko MORINAGA and Masataka YUHARA

(Laboratory of Animal Reproduction)

TARKOWSKI (1964) referred to mosaic animals composed of cells derived from the separate parents as chimaeras. But, the term allophenic was also applied to individuals of multi-embryo origin by MINTZ (1967). Allophenic individuals have been demonstrated in the injection chimaera mouse by GARDNER (1968) as well as the aggregation chimaera mouse by TARKOWSKI, MINTZ and others. Thus, there have been many published attempts on the mouse, but the decisive cases of aggregation of rat preimplantation embryos was carried out only by MAYER and FRITZ (1974). The present study describes complete rat embryo fusion *in vitro* using the HVJ-cell fusion technique, and the successful transfer and development of completely aggregated embryos and the subsequent birth of allophenic rats.

Dam being of Wistar strain of rat, male rats were either of the same strain or the DA strain. These two strains differ in the ability of their melanocytes to produce pigment. All dam were ovulating spontaneously and the embryos were recovered by flushing the oviduct and uterus with serum-saline (1 : 4) medium. To remove the zona pellucida, the embryos were rinsed in serum saline (1 : 2) medium which contained 0.5% pronase. The dissolved zona pellucida was removed by pipetting.

All attempts at embryo aggregation and fusion were between one-cell oocytes, one-cell embryos, two-cell embryos, four-cell embryos, eight-cell embryos, morula and blastocyst through the agency of inactivated HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan, Sendai virus). "Albino" embryos were paired with "Colored" embryos for aggregation. Previously virus-infected embryos were aggregated with fresh embryos by mixing at 0°C for 10 min., and the aggregates were fused at 37°C for 20 to 40 min. Regardless of developing stages, all embryo pairs were aggregated and fused. Most of eight-cell embryos and morula were successively fused, while only 20 to 40% of one-cell embryos and blastocyst were joined together. Most of the aggregates of eight-cell pairs and morula pairs aggregated and fused into single multi-embryo blastocysts when cultured *in vitro* as follows.

In the control experiment, contacts between pairs embryos were induced by gentle pressure from a fine glass rod. Only eight-cell embryos and morula had enough aggregating ability to developed to blastocysts, because there were almost no aggregates of other embryonic stages.

Only completely developed aggregates of expanded blastocyst were transferred to pseudopregnant recipient albino rat. A total of thirty four fused blastocysts were transferred to six recipients. Four of the recipients gave one full term embryo. The sex ratio of the four young obtained was 1 : 1 (♂ : ♀). However, the chimaeralism of the four young could not be fully verified due to problems with foster parentage, additional studies are needed to verify the random nature of rat blastomere aggregation using HVJ.

## 緒 言

2個以上の配偶子から生ずる1個体の動物を Chimaera (キメラ) と称しているが、キメラ胚の作出は MORGAN (1927)<sup>9)</sup> の両生類での研究から始められた。一方哺乳動物でのキメラ動物の作出は TARKOWSKI (1961)<sup>14)</sup> や MINTZ (1962)<sup>9)</sup> によってマウス胚で試みられた。2個の配偶子を物理的に押しつけて得られたこれらのキメラ胚は “*aggregation chimaera*” と称されるが、更にマウス胚盤腔内に他胚の割球を注入することによって得られる “*injection chimaera*” の作出が GARDNER (1968)<sup>3)</sup> によって達成された。近年になってマウス以外の羊<sup>15)</sup> やラット<sup>6)</sup> でも凝集キメラ胚の得られることが示された。更にこれらのキメラ動物が遺伝現象、発生の機序、および免疫機構等の研究に応用され成果が挙げられつつある。又、キメラ動物の技術が家畜胚に応用されれば上述の諸問題もさることながら、経済的価値のある優良遺伝質を賦与された家畜の作出も夢ではない。

エールリッヒガン細胞で観察された仙台ビールス(HVJ)による細胞融合現象<sup>10)</sup>は、現在では細胞遺伝学や生理学分野へ応用され、新しい知見が生まれるようになった。しかし実験発生学の分野においては胚の割球融合法の1つとして、GRAHAM (1971)<sup>9)</sup> によってマウス胚に応用されて、4倍体胚の作出が試みられ、倍数性と胚の発育性について論じられているに過ぎない。

本研究はHVJの細胞融合能を初期胚の割球融合法の手段として利用することによってラット胚の倍数体胚の作出の可能性を探ると共にHVJによる胚割球の融合機構を明らかにすることを目的とし、更に、ラットキメラ胚の産仔への発育の可能性を検索した。

## 材 料 と 方 法

供試雌動物は自家繁殖 Wistar 系ラットを用い、交配雄は同系か、有色の DA 系を用いて自然排卵卵を得た。1細胞卵、2細胞卵、4細胞卵、8細胞卵、桑実胚及び胚盤腔が各々交配1日目、2日目、3日目、4日目、および5日目の卵管、卵管・子宮、および子宮の灌流によって生食・血清媒液(4:1)と共に回収された。割球凝集の妨げとなる透明帯は1.0%プロナーゼ媒液中で膨化させた後、新鮮な媒液中でピペッティングにより除去された。

HVJは阪大微研岡田研究室から割愛を受け、当教室で10日目孵化鶏卵の漿尿液中で継代培養された。HVJ浮遊漿尿液は生食血清(2:1)媒液と等量に稀釈され(HVJ, 1,000~2,000 HAU;  $3 \times 10^7$  個/cc/HAU)、紫外線30分照射による不活化後、胚融合液として実験に供された。標化された各発育ステージの胚のHVJによる凝集・融合法の諸条件が検討された。即ち第一段階として、不活化HVJ含融合液中での胚細胞どうしの凝集のための適温度と濃度が検討された。凝集法はHVJ液中で、胚をピペッティングにより一対ずつ胚の一部を接触させ、そのまま静置することによって行なわれた。続いて適当な条件で凝集された胚の融合条件が同様にして検討された。対照実験として、2個の胚細胞を細いガラス棒で押しつけるMINTZ (1962)<sup>9)</sup>の方法によって、各発育ステージ胚の凝集能が調べられた。

次にHVJによる胚細胞割球の融合機構に関する若干の検討が加えられた。この融合実験においては、HVJを含む漿尿液と、グルコースを含むか、或いは含まない修正KRB媒液の等量混合液が融合用媒液として使われ、受精1細胞卵と桑実胚が実験に供された。HVJ感染割球どうしの凝集・融合能と糖との関係が調べられ、続いてHVJ感染卵と非感染新鮮卵との凝集・融合能が同様にして調べられた。更に細胞融合能の観点から、胚割球の融合能率とHVJの量的効果が検討された。胚割球へのウイルス感染時の卵子当りのウイルスの数(0~500個)と、融合率が1細胞受精卵と桑実胚で比較された。

最後に融合胚の発育性が検討された。1細胞受精胚と桑実胚の各々の融合胚が20% 血清を含む修正・KRB 中に浮遊させられ、5% CO<sub>2</sub> in air, 37°C 条件下で体外培養された。胚盤胞に発育した融合胚は精管結紮雄と交配させて、偽妊娠を誘起させた同期雌の子宮角に移植された。妊娠22日目の帝王切開によって満期胎児への発育を観察した。

### 結果と考察

HVJ融合液中での卵子の融合条件が検討された (Table 1 : 参照)。胚の凝集能は37°Cで

Table 1 Aggregation and fusion of rat eggs by HVJ (Sendai virus)

| Cell satage<br>of<br>pairing | Aggregation (No. of agg/No. of pair) |           | Fusion (No. of fusion/No of pair) |           |           |           |           |           |
|------------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                              | at 0°C                               |           | at 37°C                           |           | at 20°C   |           | at 37°C   |           |
|                              | for 2 m.                             | for 10 m. | for 2 m.                          | for 10 m. | for 20 m. | for 40 m. | for 20 m. | for 40 m. |
| Oo. - Oo.                    | 0/12                                 | 6/12      | -                                 | -         | -         | -         | 2/6       | 4/6       |
| 1 - 1                        | 14/44                                | 36/40     | 0/16                              | 2/12      | 0/8       | 0/8       | 0/12      | 6/12      |
| Mor - Morula                 | 21/45                                | 42/48     | 0/10                              | 2/11      | 6/13      | 4/11      | 8/12      | 10/12     |
| Bla - Blast.                 | 4/16                                 | 7/15      | -                                 | -         | -         | -         | 3/5       | 4/10      |

note) Aggregation at 0°C for 10 min. was followed by fusion at 20°C or 37°C.

は10分後においても僅か10数%に過ぎないが、0°Cでは2分後に30~40%の凝集能を示し、10分後には50~80%の凝集能を示した。しかもこの凝集能は胚の発育ステージによって大きな変異を示し、受精1細胞卵や桑実胚は未受精1細胞卵や胚盤胞よりも高い凝集能を示した。続いて0°C 10分間の凝集胚のその後の融合条件が検討された。受精1細胞卵は20°C条件下では40分経過後も凝集したままか、割球が分離して、細胞質の融合は起らなかった。しかし、37°Cでは40分経過後に細胞質の融合が完了し、2倍の大きさの完全な1細胞卵になった (Fig. 2 : 参照)。一方桑実胚は20°Cでは20分で既に接触面の細胞融合は完了した。桑実胚の融合は強いピペッティングによっても胚が元に分離しないことから判定して接触面の凝集した割球のみが細胞融合を起しているものと考えられた。37°Cに加温した場合には桑実胚の細胞融合能は著しく向上した。未受精1細胞卵や胚盤胞でも37°Cでは、20分後には、低率ではあるが、細胞融合が完了することが認められた。これらの結果から、胚の凝集融合能は胚の発育ステージによって異なるが、HVJを含む融合液中では、0°C 10分間静置による細胞凝集と、それに続く37°C 20~40分静置で細胞融合が成立することが示された。しかも、その凝集融合能は桑実胚のそれが最も高いことも明らかとなった。OKADA 他 (1975)<sup>11)</sup>は腹水ガン細胞の細胞融合は、細胞に100~数100個のウイルスが吸着した状態を低温で作った後、37°Cに移して行なった。この融合現象を細胞融合に伴う細胞膜活性の変化としてとらえ、しかも、吸着ウイルスと細胞膜の反応を、2個の細胞を橋渡ししているウイルスはその細胞膜に包みこまれるに従って細胞膜が相互に非常に接近した部位を生じ、しかも、その部分の細胞膜のイオンバリアーが部分的に崩れる状態が細胞膜融合の好条件を作っていると説明している。胚の融合においても、同じような融合条件が観察されたことから、腹水ガン細胞と同様な機構で細胞融合が行なわれているものと思われる。

対照実験として、MINTZの法<sup>9)</sup>による胚の凝集能が検討された (Table 2)。4細胞卵よりも若い胚どうしの押しつけでは、15分経ても凝集能は著しく低く、8細胞卵や桑実胚では5分で既に80%の凝集率を示したが、胚盤胞どうしでは15分後も凝集しなかった。このように透明帯を除去された初期胚は凝集能を持つことはよく知られたことであるが<sup>14), 8)</sup>、桑実胚

Table 2 Aggregation of wistar rat eggs at any stages of cleavage

| Cell stage | No. of<br>total pairs | Aggregated pairs/Pushing together |             |             | %  |
|------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|----|
|            |                       | for 5 min.                        | for 10 min. | for 15 min. |    |
| 1 ↔ 1      | 7                     | 0/2                               | 0/2         | 1/3         | 14 |
| 2 ↔ 2      | 10                    | 0/4                               | 1/3         | 1/3         | 20 |
| 4 ↔ 4      | 6                     | 0/2                               | 0/2         | 0/2         | 0  |
| 8 ↔ 8      | 11                    | 9/11                              | —           | —           | 82 |
| M ↔ M      | 20                    | 15/20                             | —           | —           | 75 |
| M ↔ B      | 6                     | —                                 | —           | 0/6         | 0  |
| B ↔ B      | 7                     | —                                 | —           | 0/7         | 0  |

note) incubated in serum : saline (1 : 2) at 20°C.

note) embryo aggregation by gently pushing together with fine glass rod.

と胚盤胞を押しつけても胚凝集が生じなかったことから、8細胞卵や桑実胚の高い凝集能に比べ、胚盤胞は凝集能を保持していないことが示された。

裸化卵子の自然凝集能は8細胞～桑実胚で最高に達し、胚盤胞ではその能力を全く失うことは、分化した胚盤胞の栄養膜細胞は互いに凝集能を持たないことを示唆する。胚盤胞でも栄養膜細胞を取り除いた、内部細胞塊どうしは凝集能のあることがGARDNER他(1975)<sup>4)</sup>によって示されている。しかし、HVJ感染胚細胞の場合、桑実胚は対照とほぼ同程度の凝集・融合能を示し、1細胞卵でも胚盤胞でも、かなり高率の凝集・融合能を持つことは、物理的圧迫による細胞凝集とは異なる機構によって凝集・融合が生じていることが想像される。又、得られた結果は、GRAHAM(1971)<sup>5)</sup>がHVJ感染マウス胚で得た20～70%の融合能ともほぼ一致した。

HVJによる細胞融合機構は、抗体あるいはレクチンを細胞膜に結合させて生ずるキャップ現象と同様に、膜流動性という視点からとらえられるようになった(FRAY & EDIDIN, 1970)<sup>2)</sup>。本実験でも感染胚細胞の融合能から、胚融合機構に対する若干の考察を加えた(Table 3)。HVJ感染受精1細胞卵どうしを0°C 10分で凝集させることはできても、融合

Table 3 Fusing ability of HVJ-infected rat eggs

| Procedure of egg fusion<br>subsequent to HVJ aggregation | Glucose in<br>medium | Egg activity |        |
|--|----------------------|--------------|--------|
|  |                      | Aggregation  | Fusion |
| HVJ-inf. 1-cell x HVJ-inf. 1-cell                        | presence             | —            | —      |
| HVJ-inf. 1-cell x HVJ-inf. 1-cell                        | absence              | +            | +      |
| HVJ-inf. 1-cell x fresh 1-cell                           | presence             | +            | +      |
| HVJ-inf. 1-cell x fresh 1-cell                           | absence              | ++           | ++     |
| HVJ-inf. Morula x MVJ-inf. Morula                        | presence             | +            | +      |
| HVJ-inf. Morula x HVJ-inf. Morula                        | absence              | ++           | +      |
| HVJ-inf. Morula x fresh Morula                           | presence             | +++          | +++    |
| HVJ-inf. Morula x fresh Morula                           | absence              | +++          | +++    |

させるために37°Cに加温すると、殆どどの凝集対が元に分離した。しかもグルコースが存在する時は凝集能さえ失って分離した。そこで前もってHVJと反応させたHVJ感染1細胞卵と、非感染新鮮1細胞卵とを同様の方法で凝集させ、37°Cに加温すれば融合能が生じ、とくにグルコースが媒液にない場合にその能力は増強された。桑実胚のHVJ感染胚どうしの融合能はグルコースに関係なく保持されているが、HVJ感染桑実胚と新鮮桑実胚との融

合はグルコースの存在において著しく亢進された。又、これらの胚融合能率に対する HVJ の量的効果は1細胞卵においても、桑実胚においても1胚当たり、100個までのビールスで直線的に増加し、200個でほぼそのプラトーに達した (Fig. 1)。岡田 (1978)<sup>12)</sup> は腹水ガン細胞の HVJ による細胞融合モデル実験において、グルコース添加によって細胞膜融合の能率が低下するが、ウイルス外膜と細胞膜の融合は存在し、ここに新鮮細胞を添加するとウイルス感染細胞と新鮮細胞との間に細胞凝集が起こり、次に相互に融合することを観察し膜流動性の観点から、細胞膜粒子の動きと、生体膜融合のモデルとの関係を提起した。本実験における胚融合においても、HVJ 感染胚どうしの融合能は劣るが、HVJ 感染胚と新鮮胚との融合能はグルコース存在下においても高く保持され、“ウイルス外膜と細胞膜融合”と“細胞相互の融合”が同一反応でないことが示唆され、腹水ガン細胞や赤血球細胞と同様に、ウイルス感染胚はあたかもウイルスの如く振舞い新鮮胚と融合することが示された。更に、ウイルスの量的効果が存在することからも、胚細胞表面に一定数のウイルス受容器が存在し、感染によって膜構造が変化し、細胞融合を引き起こすことも想像された。

HVJ 融合胚の *in vitro* および *in vivo* 発育能が検討された。HVJ 融合1細胞卵 (Fig. 2-C) は培養12時間で2核が接し始め、24時間までに核融合は完了したが、その後の培養によっても、それ以上の *in vitro* 発育を示さなかった。しかし、この核融合によって4倍体胚作出の可能性が示唆されることから、現在 *in vivo* での発育性を検索中である。山田他 (1978)<sup>16)</sup> はラットの誘起単為発生胚において、半数体活性卵は *in vivo* でも2細胞期までしか発育能を持たず、2倍体放出抑制によって得た2倍体活性卵が始めて胚盤胞に発育する能力を持つことを認めたが、ウイルス感染融合

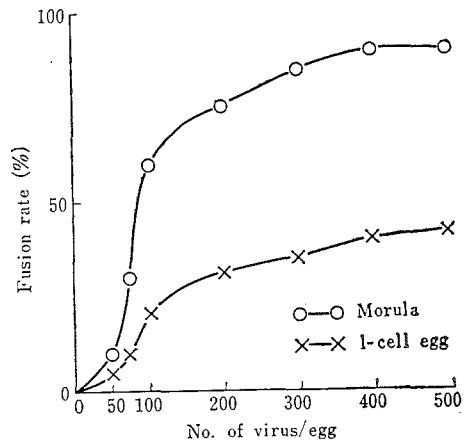
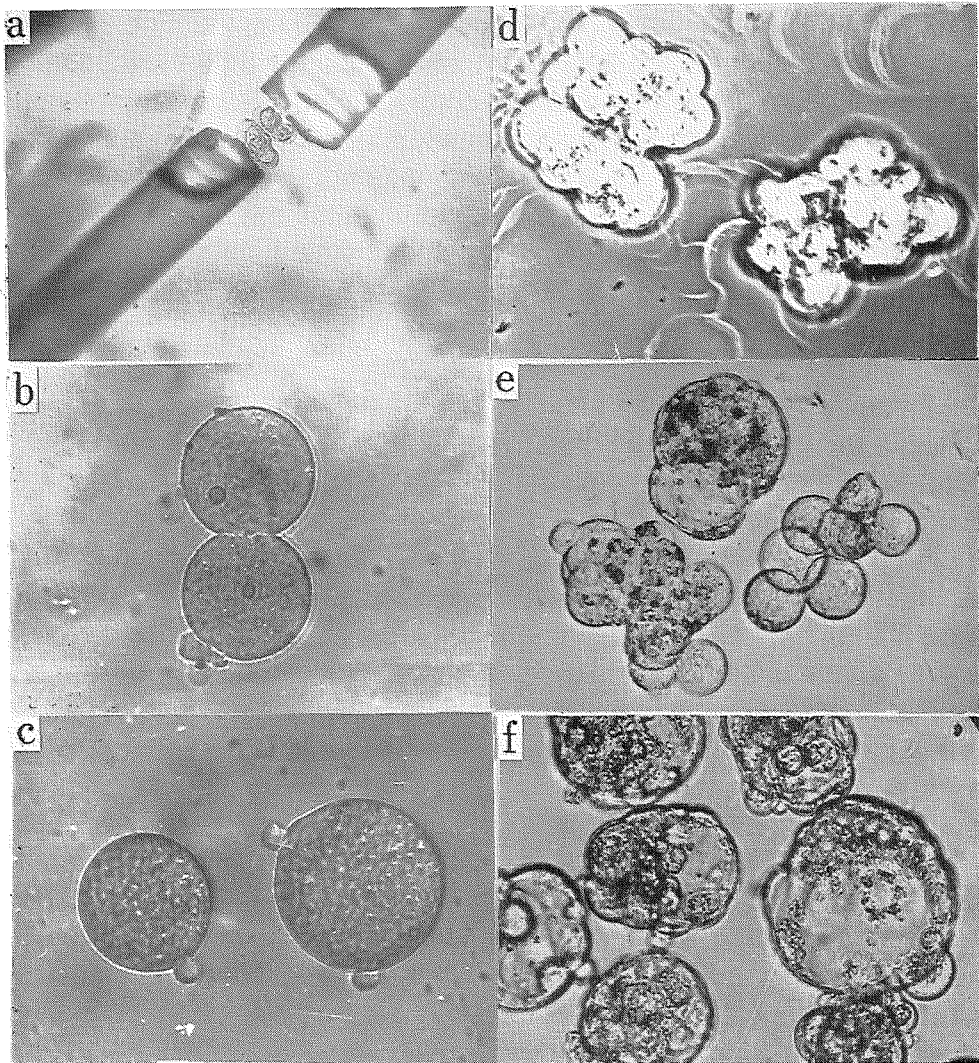


Fig. 1 Dose response of HVJ on rat embryo fusion.

法によって得られる種々の倍数体胚から、倍数性と胚発育との関係が明らかにされることが期待される。一方桑実胚の融合胚 (Fig. 2-d, e, f.) は6時間の培養で完全な2倍の大きさの桑実胚を形成し、12時間後には初期胚盤胞に発育し、24時間~36時間後には80%以上が、単一由来胚と比べるとほぼ2倍の大きさ (Fig. 2-f) の拡大胚盤胞に発育した。一般細胞において HVJ によってもたらされた融合細胞膜の修復時間が6時間ぐらいとされているが、この単一桑実胚形成に要する時間はそれらによく一致した。しかも GRAHAM (1971)<sup>5)</sup> の物理的凝集によるラット胚の胚盤胞への発育率 (50%) に比べると著しく良好な結果を示すものと思われる。更に HVJ では胚盤胞の細胞融合も可能であったが、その融合胚は栄養細胞膜どうしが融合するだけで、別々の対の胚盤胞を形成した。TARKOWSKY (1961)<sup>14)</sup> はマウス胚の融合において、12細胞胚どうしの凝集では胚は互いに固着するが常に2つの胚盤胞を形成しようとして分離することを観察したが、HVJ によるラット融合胚では12細胞を越えても胚腔を形成する前の胚であれば凝集融合後、完全な1つの胚になり単一の胚腔を形成した。これは、既述の如く HVJ による細胞凝集・融合機構の特異性によるのか、ラットとマウスの種差によるのかは明らかでない。

発育した融合胚盤胞を宿主子宮へ移植して着床後の胚の発育性を検討した (Table 4 : 参照)。凝集・融合後、20~24時間の初期胚盤胞を移植した場合、6例の宿主 (5~6個胚/子宮) の

うち、いずれも満期胎児が得られず、15~16日目に臍出血がみられ、その剖検では胎児は認められなかった。しかし、30~32時間培養した後期胚盤胞を移植した場合、6例の宿主のうち、4例において各々1~2匹の満期胎児を得た。体重は4.6~5.2gの範囲にあり、外観上の



**Fig. 2** Aggregation and fusion of HVJ-infected blastomeres of rat zona-free embryos ; a) spontaneous aggregation by gently pushing together with glass rod, b) a pair of aggregating mono-cell after HVJ-infection, c) double-sized mono-cell (right side) formed by fusion of normal one-cell embryos (left side), d) pairs of aggregating and fusing zona-free morula, e) double-sized developing blastocyst of fused morula (upper part), degenerating (right side) or delayed developing (left side) morula, f) double-sized developing blastocyst (right side) of fused morula, compared with normal-sized blastocyst of non-fused morula.

形態では普通胎児との相違は認められなかった。BUEHR and MACLAREN (1974)<sup>1)</sup> は8細胞マウス凝集胚の移植後の組織学的観察から、卵円筒期の大きさは単一胚由来のものと同一の大きさであることから、何らかの機構で着床前後に胚の大きさの調節の行なわれることを示唆し、融合胚の大きさとその胎児の大きさに説明を与えた。又、本研究では融合胚の発

Table 4 In vivo development of HVJ-fused aggregates in rat morula

| Time of in vitro culture of the aggregate | Developmental stage after in vitro culture | No. of eggs transferred | No. of recipient transferred | No. of pregnant recipient | No. of aggregate developed to full term |
|---|--|-------------------------|------------------------------|---------------------------|---|
| 20-24 hr                                  | early blastocyst                           | 31                      | 6                            | 0                         | 0                                       |
| 30-32 hr                                  | expanded blastocyst                        | 34                      | 6                            | 4                         | 5                                       |

育性が胚の移植時間によって著しく異なることが分った。単為発生胚や融合胚は栄養細胞層と内部細胞塊の分化の不十分な比較的早期に着床に入るためか (ROSSANT, J., 1975)<sup>13)</sup>, 両胚細胞の融合後の胚分化の同期化に失敗し, 着床後に発育異常が生じる (MCLAREN 1976)<sup>7)</sup> ため等が考えられる。又, これらの満期胎児を里親に哺乳させたが, いずれも授乳できず, 生存し得なかった。その胎児のキメラ性は充分検討されなかったが, 少なくとも虹彩の色相は DA 系由来の“黒”ではなく, “白”か“その他”であった。しかし, 帝王切開によって得られた満期胎児のその後の死因は明らかにされなかった。

### 摘 要

透明帯除去ラット胚は, いずれの発育ステージにおいても HVJ を媒介にすることによって, 簡単な接触から凝集・融合胚が形成されることが認められた。前もって HVJ で感染させた胚割球を非感染新鮮胚割球と, 5°C, 10分間で凝集させ, 続いて37°C, 20—40分間で融合が完了した。1細胞胚割球を種々融合させることによって望まれる倍数体胚を得る可能性が示唆され, 桑実胚の融合胚は宿主で満期胎児に発育することが認められた。

### 文 献

- 1) BUEHR, M., and MCLAREN, A. : J. Embryol. Exp. Morphol., **31**, 229-234 (1974)
- 2) FRYE, L. E., and EDIDIN, M. : J. Cell. Sci., **7**, 319-335 (1970)
- 3) GARDNER, R. L. : Nature (Lond), **220**, 596-597 (1968)
- 4) GARDNER, R. L., and PADAIANNOV, V. E. : The early development of mammals (ed. BALLS and WILD) p. 107, Cambrige Univ. Press, London and New York (1975)
- 5) GRAHAM, C. F. : In vitro Methods in reproductive cell biology. End Karolinska Symp. (ed. DICZFAVLSY). Stockholm p. 154 (1971)
- 6) MAYER, JR., and FRITZ, H. I. : J. Reprod. Fertil, **39**, 1-9 (1974)
- 7) MCLAREN, A. : Mammalian Chimeras. Cambrige Univ. Press, London and New York. (1976)
- 8) MINTZ, B. : Amer. Zoologist., **2**, 432 abstr. (1962)
- 9) MORGAN, T. H. : Experimental Embryology ; chap. 20, New York, Columbia Univ. Press. (1927)
- 10) OKADA, Y. : Biochem J., **1**, 103-110 (1958)
- 11) OKADA, Y., KOSEKI, I., MAEDA, Y., HASHIMOTO, T., KANNO, Y., and MATSUI, Y. : Exptl. Cell Res., **93**, 368-378 (1975)
- 12) 岡田善雄 : 代謝, **15**, 1577-1585 (1978)
- 13) ROSSANT, J. : J. Embryol. Exp. Morphol. **33**, 979-990 (1975)
- 14) TARKOWSKI, A. K. : Nature, Lond., **190**, 857-860 (1961)
- 15) TUCKER, E. M., MOOR, R. M., and ROWSON, L. E. A. : Immunology, **26**, 613-621 (1974)
- 16) 山田雅保 : 内海恭三, 湯原正高 : 岡山大農学報, **50**, 39-47 (1978)