

V. キメラ関連技術

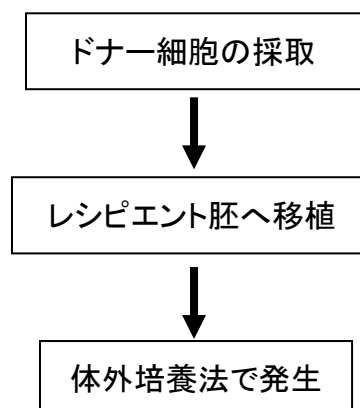
1. キメラの利用

キメラとは、一般に2種類以上の個体の細胞が1個体に混在している状態またはその個体そのものを呼ぶ。定義としては、親が3つ以上（両親の他にもう1つ以上の親が必要）であり、2つ以上の遺伝的に異なった細胞からなる生物個体を指す。

キメラを作製するには、レシピエントにそれとは異なるドナー細胞を入れることでキメラが出来る。作製したキメラの中には、ドナー細胞の一部が生殖系列へ移行するものもあるので、生殖系列をドナー細胞に置き換えることが出来れば、キメラを紹介してドナー細胞由来のヒナを発生させることが可能となり、ドナー細胞を凍結保存すれば牛等の受精卵と同様に半永久的な保存が可能となる。また、この技術の利用によって、産卵率の低い希少品種などもWLをレシピエントにすることで大量に発生させることも可能になる。これらのことから、生殖系列キメラの効率的な作出法が期待されている。

生殖系列キメラの作出には、主に胚盤葉キメラと始原生殖細胞（PGC）キメラの2つがある。胚盤葉キメラは、放卵直後のステージXの受精卵を別なステージXの受精卵に移植（注入）してキメラとなったもので、PGCキメラはふ卵2.5日目の血液からPGCを採取し、別の2.5日胚の血管内に注入してキメラとなったものである。PGCキメラは生殖系列に入る確率が非常に高いが、細胞の収集が効率的ではないこと、PGCは培養が困難であるなどの問題がある。胚盤葉キメラは生殖系列キメラになりにくいですが、ドナー細胞の収集が容易といった利点もある。将来的には、万能細胞とも言われるES細胞やEG細胞を樹立させて、ドナー細胞に用いる方法が取られると思われるが、この場合は胚盤葉キメラの方法で行える。

胚盤葉キメラの作製手順

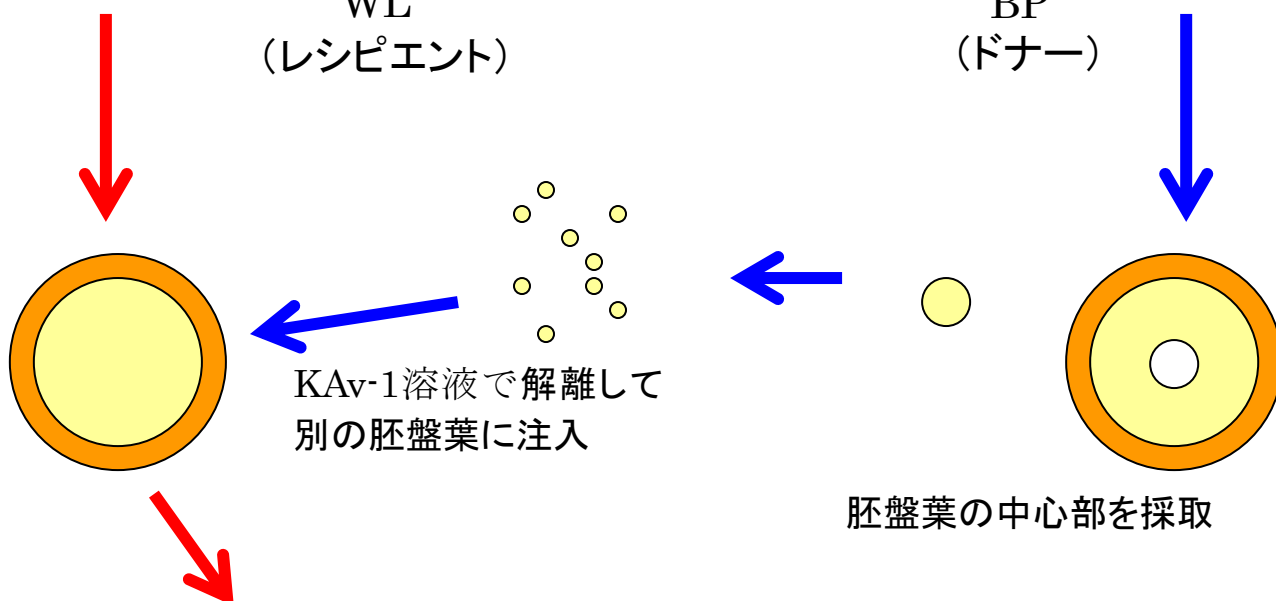




WL
(レシピエント)



BP
(ドナー)



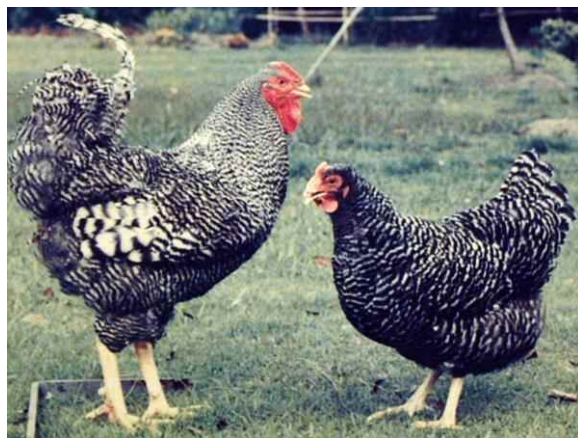
体外培養法



キメラ発生



キメラ鶏 ♂ ♀



BP ♂ ♀

(又はキメラ鶏の♂♀)



純粋のBP発生

この場合、作出したキメラとドナーに用いた BP 又はキメラ同士を交配することで純粋の BP が発生する。したがって、ドナー細胞を凍結保存することによって受精卵の保存と同じことが可能となる。

脇道コラム キメラとは

キメラはもともと、ギリシャ神話に出てくる頭がライオン、胴がヤギ、尾がヘビで口から火を吐く怪物キマイラのことで、書いてあるものによっては胴がライオンで、頭がライオンとヤギの2つを持ち尾がヘビというものもあります。胴がヒツジと書いてあるものもありますが、これは雑誌ニュートンで胴がヒツジと誤って書いたため、そこからの引用されたものと思われます。ギリシア神話のキマイラは、リュキアス山に生息していたことになっており、この山は火山でヘビとヤギとライオンが住んでいたということでリュキアス山を擬獣化したものとされています。

生物学では、1913年にウインクラー（H.Winkler）がトマトとイヌホオズキを使って実験的に作り出した接木体をキメラと呼んでから生物学上の術語になりました。雑種との違いは、雑種は2品種の交配であるのに対し、キメラは神話の怪物の様に体の一部が別品種の細胞などに置き換わっているところです。

受精卵に遺伝子導入をした場合や一個体の中である細胞が突然変異を起こすことによって、遺伝的に異なる細胞が2種類以上混ざった状態になったりしますが、この場合は、親が2つの1個体の細胞から成り立っているためキメラとは呼ばずにモザイクと呼んで区別しています。

2. 体外培養法

1細胞期からヒナが発生するまでを、3段階に分けて3つのシステムによって発生させる方法で、Perryによって開発された。このことによって、1細胞期の受精卵に操作を行うことが可能となったため、マイクロインジェクションによる遺伝子導入の試験が可能となった。

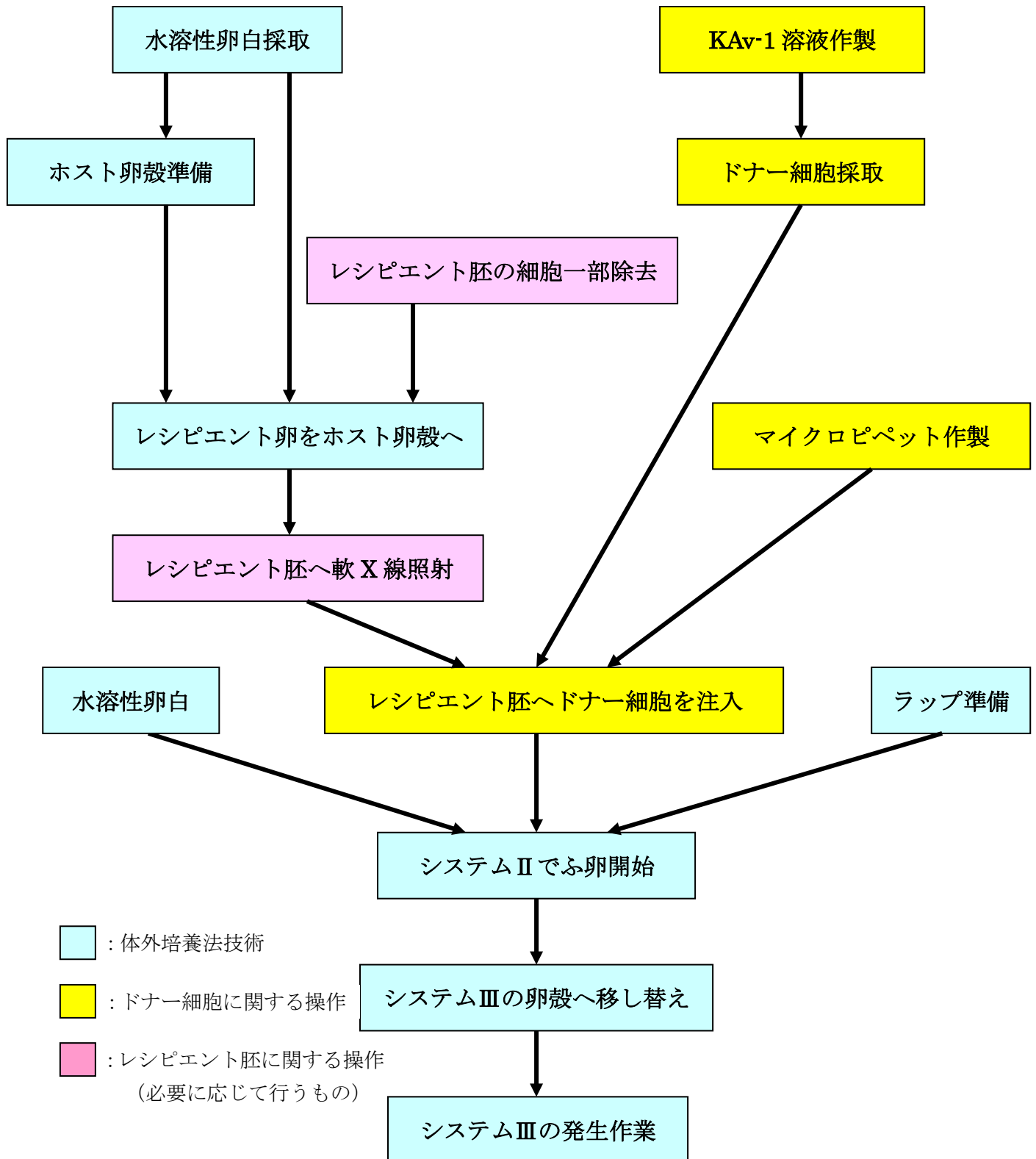
体外培養法は、3つのシステムからなっており、システムⅠは卵管内の発育を代替するもので1細胞期から胚盤葉期までの発育に用いるもの。システムⅡは胚盤葉期からふ卵3日目までの培養で、システムⅢは、ふ卵3日目から発生までを行うもの。胚盤葉キメラの発生にはシステムⅡから行う。

システムⅠ：放卵後2時間45分後（排卵後2時間30分後）のニワトリをネブタールや逆性石けんの静脈注射で薬殺し、卵管ごと切り取り、濃厚卵白がある程度ついた卵を採取する。ビーカーに胚が上になるように入れ、水溶性卵白を胚の位置程度まで入れて41.5℃で1日間培養する。完全に胚がつかると死亡し、濃厚卵白が無いと胚が乾燥して死亡する。

システムⅡ：これ以降卵殻へ移し替えての培養となる。培養に用いる宿主卵殻は鋭端部を切り取り、受精卵を入れ、水溶性卵白で満たし、泡を入れないようにしてラップをかぶせ、特別なリングで固定する。ラップ面を横にして、角度90度、5～15分間隔で転卵を行う。この培養以降、濃厚卵白は無くても良い。ふ卵温度は37.8～38.0℃。この時期に胚が空気に触れた状態が続くと胚の発生は途中（3日目以降）で中止する。

システムⅢ：二黄卵の鈍端部を切った卵殻に移し替えて培養する。ふ卵温度は18日までは37.8℃、それ以降は37.6℃。転卵は角度30度、30分間隔で鳴き声が聞こえるまで行い、鳴き声が聞こえたらラップに少し穴を開け転卵を止める。ヒナがラップに頭をぶつけるようになったらラップをはがし横置きにして自力で卵殻から出るのを待つ。ふ化率は、キメラのために細胞の注入をしなければ約50%。細胞注入を行った場合は20～40%。

3. 体外培養法を用いた胚盤葉キメラの作出方法



胚盤葉キメラ作製作業の流れ図

(1) 水溶性卵白採取



① 水溶性卵白の採取準備



② シャーレに割卵し卵黄を葉サジでシャーレの外に出す。



③ 濃厚卵白をつぶす感じで、濃厚卵白内の水溶性卵白も採取する。濃厚卵白は捨てる。1個の卵から約10ml採取出来る。



④ 採取した水溶性卵白をビーカーに移す。ある程度の量になったら、ビーカーから三角フラスコに移す。



⑤ 三角フラスコに入れて冷蔵保存する。
続けて実験するときは日付を記入する。

(2) ドナーとする胚盤葉細胞の採取方法



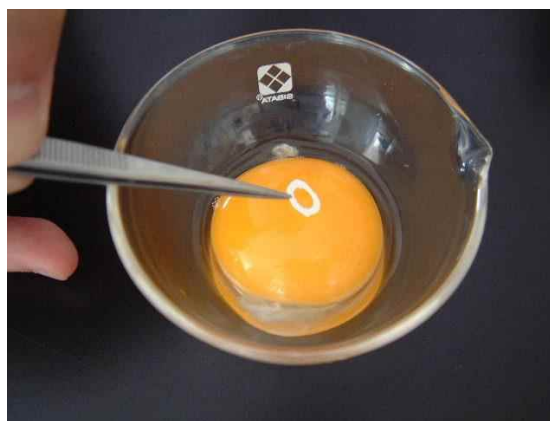
① ドナー細胞の採取準備



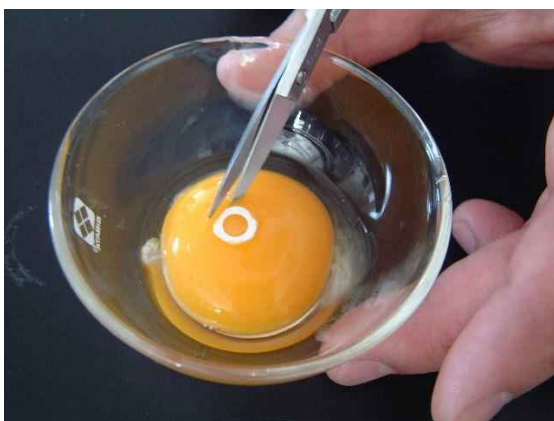
② ガラス製蒸発皿にドナーの種卵を割卵し卵白を除去する。



③ 卵白を除去したもの。胚が下に向いた場合は葉サジで胚を真上に向ける。



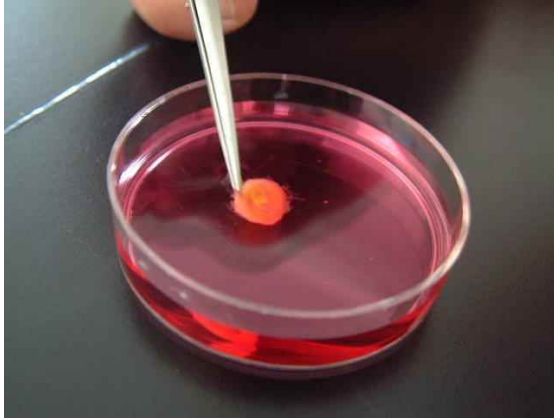
④ ろ紙にパンチで穴を開け周囲を切り取ったものを胚の周囲に被せる。



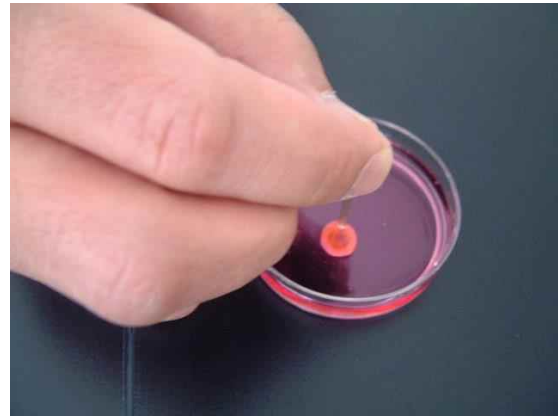
⑤ ろ紙の外側の卵殻膜をハサミで切り取る。



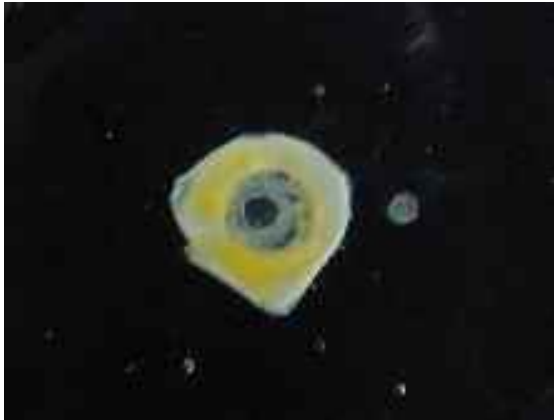
⑥ 卵殻膜をろ紙ごとピンセットでゆっくりと持ち上げる。



⑦ 卵黄面を斜め上にして培養液に沈める。培養液の代わりに PBS でもかまわない。胚の中心部が見えるように卵黄を精密ピンセットでどかす。



⑧ 3cm 程度の長さに切った 0.25ml 凍結精液用ストローを胚盤葉明域の中心部に刺して中心部をくり抜く。



⑨ 胚盤葉明域の中心部をくり抜いたところ。右側の小さな丸い細胞が明域中心部の細胞。これを、KAv-1 溶液を $50\mu\text{l}$ 程度入れたエッペンに移す。



⑩ 集めた細胞は $100\mu\text{l}$ のピペットマンを使ってピペッティングで解離し、200g 5分の遠心を行い上清を除去し、くり抜いた胚 10 個に対し $30\mu\text{l}$ の KAv-1 溶液を 1.5ml サンプルチューブに入れドナー細胞浮遊液とする。

KAv-1 溶液		1000ml 中
グルコース	D-Glucose	1 g
炭酸ナトリウム	Na_2CO_3	1.1 g
2-メルカプトエタノール	2-mercaptoethanol	$15 \times 10^{-5} \text{ M} \quad \div \quad 10\mu\text{l}$
EPPS (HEPPS) ^{注)}		10 mM $\div$ 2.52 g
牛胎児血清 (56°C 30 分で非動化済みのもの)		50 ml
ニワトリ血清		50 ml
α -MEM		1000ml にメスアップして濾過滅菌を行う。
注) EPPS : 3- [4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸		
(T.Kuwana et.al Int. J.Dev. Biol. 40 : 1061-1064 (1996))		

(3) レシピエント胚へのドナー細胞の注入



① ナリシゲ硝子管 G-1 を、プーラーを用いて、マイクロピペットを作製する。先端はピンセットで摘んで折る。



② ガラス管で作製したマイクロピペットを吸引チューブ取り付ける。赤い部分を口でくわえて培養液の吸引や注入を行う。ガラスの破片は、PBS や培養液で洗浄する。



③ 実態顕微鏡は、横からライトを当てる。



④ スタンドのプレートを外して、15ml チューブの蓋を逆さに置いて卵の台にする。



⑤ レシピエントの準備が出来たら、22G の注射針で中心部を刺して胚に穴をあける。プレートを外さないとピントが合わない。

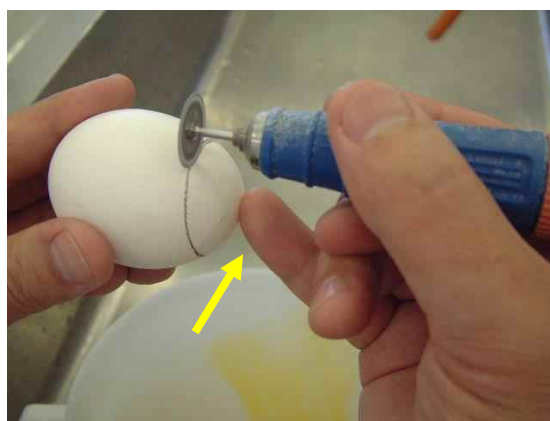


⑥ ②の吸引チューブを用いて、ドナー細胞を注入する。ドナー細胞浮遊液の注入量は胚の明域が赤くなる程度。量にして 1~2 μ l、細胞数 500~1000 個。

(4) 体外培養法システムⅡ



① 精密グラインダー。ミニター株式会社（東京）のスタンダードロータリー。ダイヤモンドディスクは、A5134。



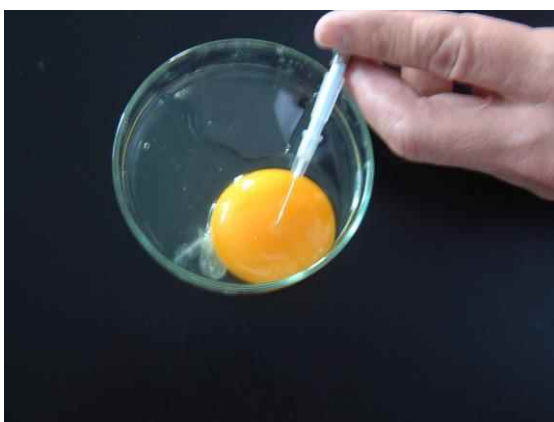
② 培養用の保定リングを用いて鉛筆で線を書き、線に沿って切る。この時、右手の小指で卵の先端を軽く抑え、左手で卵を回して切る。



③ 作製したホスト卵殻へ水溶性卵白を10ml 程度入れて 3.5ml の培養ディッシュで乾燥しないように蓋をする。



④ 培養するレシピエント卵の濃厚卵白を除去して、シャーレに移す。



⑤ レシピエント胚の細胞を除去する場合は、ここで $20\mu\text{l}$ のピペットマンに 27G の注射針を取り付けて行う。



⑥ レシピエント卵黄は、ガラス製蒸発皿に移してからホスト卵殻へ移す。



⑦ 軟X線照射装置 E-3 ソフテックス株式会社 3.5cm 程度の台に 50ml のトールビーカーを置き 20 秒間照射する。これによって胚の発生が約 1 日遅れる。



⑧ 22G の注射針を胚盤葉の中心部に突き刺し、胚に穴を開けておく。これによって、この後の細胞注入が行いやすい。



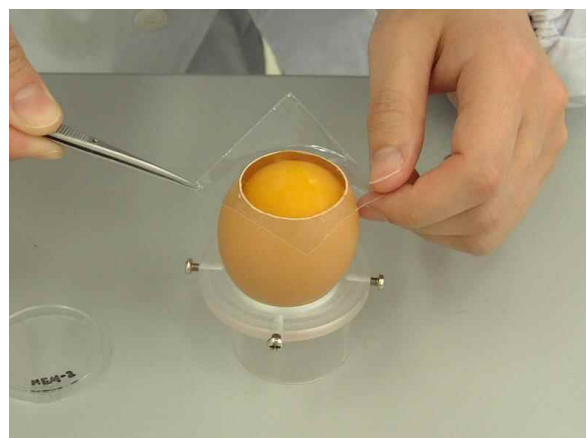
⑨ ドナー細胞浮遊液を胚の明域が赤くなる程度注入する。量にして $1\sim 2\mu\text{l}$ 、細胞数では 500~1000 個。



⑩ そっと水溶性卵白をいれて満たす。ドナー細胞の注入した後は、卵黄への衝撃を出来るだけ与えない。



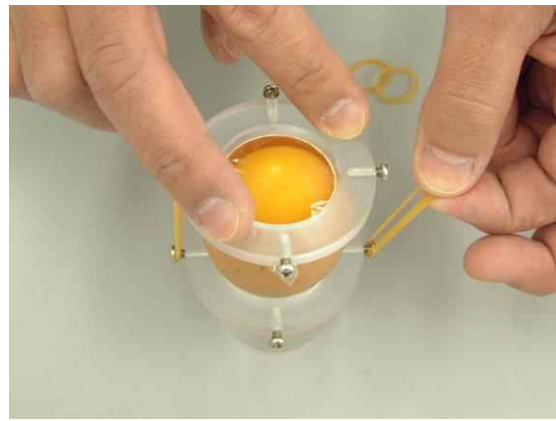
⑪ 葉サジで泡を取り除く。葉サジに付いた泡はキムワイプで拭きながら取り除く。



⑫ 空気が入らない様に、4.5cm 四方に切ったポリエチレンラップをかぶせる。



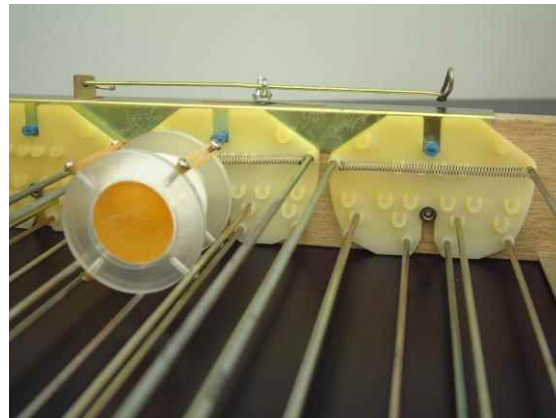
⑬ ラップの上に保定リングを被せて、輪ゴムで固定する。ラップがずれないように左手で保定リングを押さえる。輪ゴムは8番を用い、一ヶ所につき2個用いる。



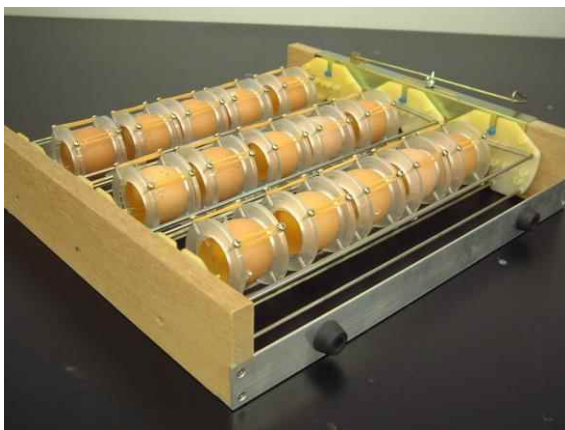
⑭ 保定リングを右手で押さえ直して、左手で輪ゴムを付ける。リングを押さえる指は均等に真下に力かける。保定リングは内径 3.5cm、外径 5.5cm、厚さ 5mm。



⑮ 輪ゴムの固定が完了したら、ラップ面を横にする。



⑯ 昭和ふ卵器 P-008 型の卵座。写真の様に金棒を通すと保定リングのネジの部分で固定される。

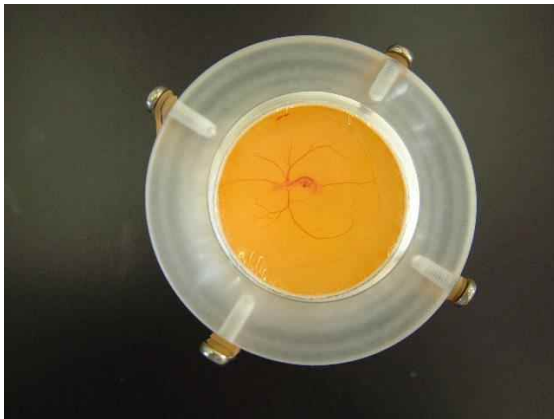


⑰ ラップ面を横にして、卵座にセットする。



⑱ 37.8～38.0℃でふ卵する。転卵角度は90度、5～15分間隔で転卵を行う。

(5) 体外培養法システムⅢの卵殻移し替え



① ふ卵3日目の胚



② ラップ面を上にして、保定リングの輪ゴムをはずす。



③ ラップをはがす。



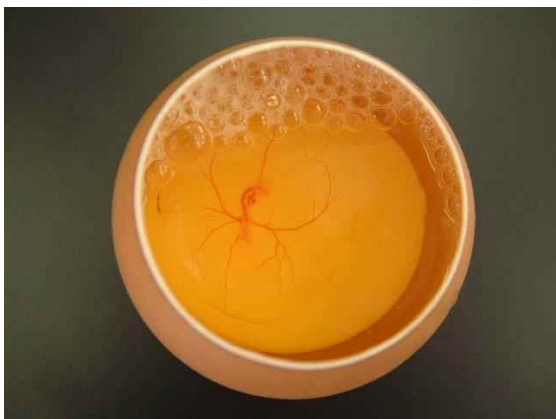
④ 二黄卵の卵殻を被せる。



⑤ クルッと素早くひっくり返す。



⑥ 移し替え完了。



⑦ 移し替え終わったものを真上から見たもの。



⑧ 薬サジで泡を取り除く。薬サジに付いた泡はキムワイプで拭きながら取り除く。



⑨ 綿棒に水溶性卵白を吸わせ、卵殻の切り口周囲に塗る。流れ落ちない程度に塗る。これがラップの接着剤となる。



⑩ 4.5cm 四方に切ったポリエチレンラップを被せる。



⑪ ラップを貼り付けたあと、隙間が出来るので水溶性卵白を吸わせた綿棒を使って、外側から卵白を吸わせて隙間を埋める。



⑫ P-008 型ふ卵器に入れた所。卵トレーを3つに切断し、裏返して転卵装置にセットする。

(6) 体外培養法システムⅢの発生までの作業



- ① 昭和ふ卵器 P-008 型
写真は前面の扉がアクリル板のもの。
転卵角度と転卵時間が調節可能。



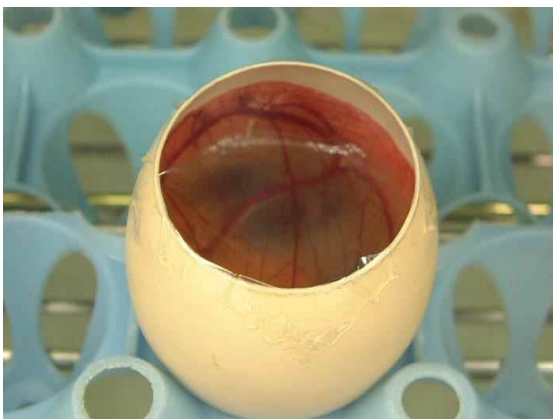
- ② ふ卵器内の状況
移し替えてからは、転卵角度は30度、
30分～1時間に1回の転卵を行う。



- ④ ふ卵7日目
血管が広がり、卵殻膜に達する。



- ④ ふ卵14日目
血管は卵殻膜に張り付き更に広がる。
このころから羽が生え始める。



- ⑤ ふ卵18日目
ふ卵開始後18～20日で、転卵を止める。
ふ卵温度を37.6℃に落とす。



- ⑥ ふ卵20日目
嘴をパクパクして胚呼吸が始まる。
この状態になったらラップに穴を開ける。



⑦ ふ卵 20 日目
ラップに数カ所穴を開けた状態。



⑧ ふ卵 21 日目
卵殻内で、もがいている状態。ラップに羽毛が付いている。



⑨ ふ卵 21 日目
⑧の状態になったら、ラップを外して卵を横向きにする。後は自力で出てくる。



⑩ ふ卵 21 日目
ヒナが卵殻から出てきたところ。しっかりと立つことはまだ出来ない。



⑪ ふ卵 21 日目
発生から数時間たった所。歩いてはしゃがむ行動をとる。



⑫ ふ卵 22 日目
羽が乾燥して、立ち上がって動き回る。

脇道コラム 窓開け受精卵法

(1) 横に穴を開ける方法

まず、卵の横に 5mm 四方の卵殻を切り、内側の卵殻膜は 3mm 四方を切り取ります。胚が穴から見えるので、ドナー細胞の注入等の操作が行えます。操作後は別の卵殻から切り取った 5mm 四方の卵殻で塞ぎ、水気をふき取り、5mm 四方の卵殻で塞いだ後で、その上から 8mm 四方の卵殻を瞬間接着剤で貼り付けます。卵殻によっては隙間ができるのでいくつも作っておいて合うものを用いるようにします。ふ卵器内で窓の部分をしばらく上にして接着剤を乾燥させた後、穴の部分を下にして横向きにした状態で 10 日間転卵を行い、以降は穴を下にした状態で転卵を止めます。ふ化率は 50%程度です。

(2) 鋭端部に穴を開ける方法

ふ卵 2.5 日目、始原生殖細胞 (PGC) の注入を行うのに用いられている方法です。まず、鋭端部に直径 2cm 程度の穴を開け、PGC の注入を行ったあと転卵しても零れないように卵白を少し抜き取り、穴を上にして幅の広いセロハンテープで封をして体外培養システムⅢの様に転卵角度 30 度でふ卵します。ヒナは自力で卵殻を割って出てきます。

レシピエント胚の細胞一部除去

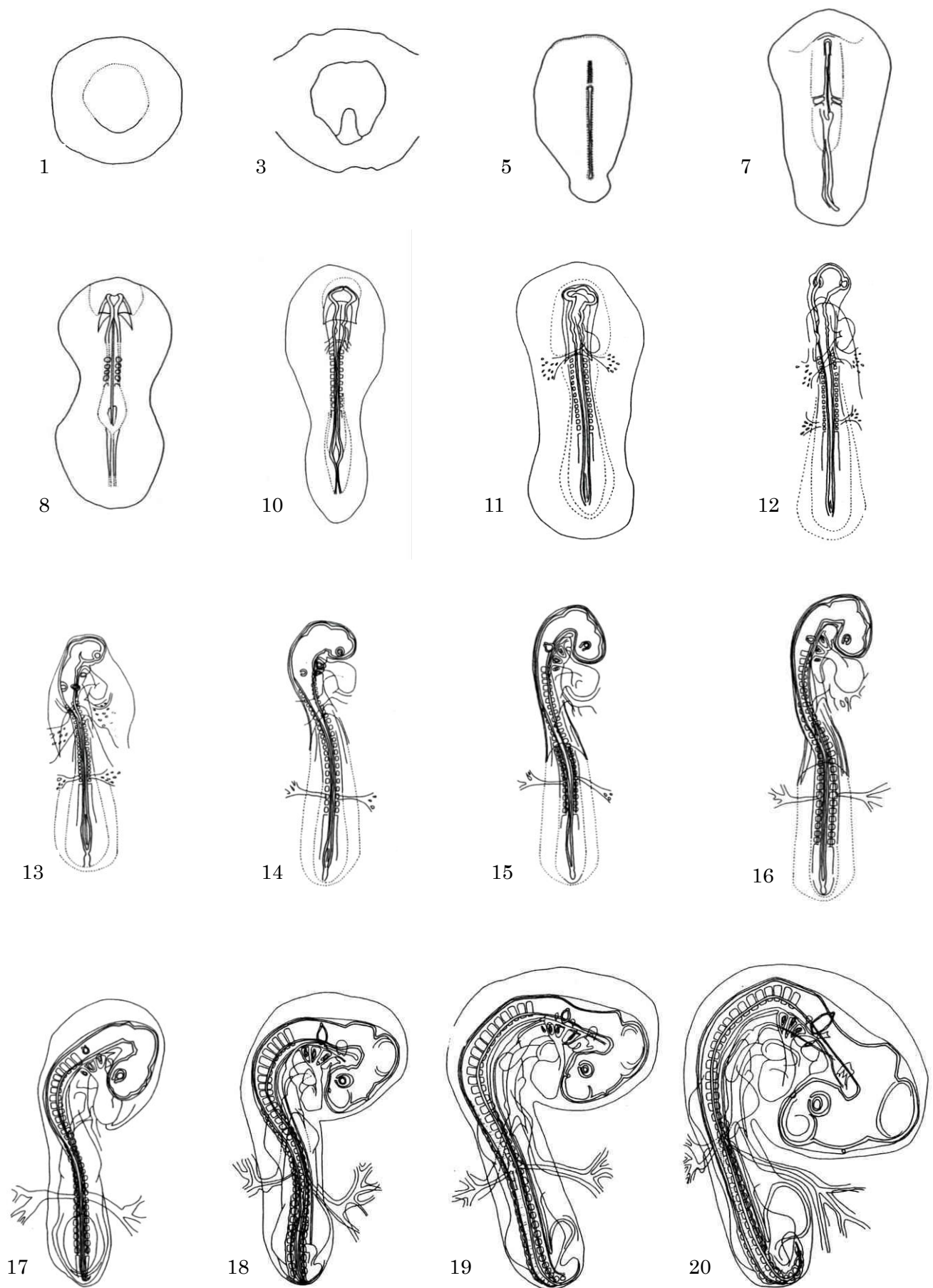
キメラを作出するために必ずしも必要ではありません。レシピエント胚の中央に PGC の前駆細胞が存在すると思われることから、胚盤葉中心部の細胞を抜き取ることが行われています。しかし、私どもが中心部を抜き取ると胚が 2 つに分断され双子になって発育し、発育途中で全て死亡します。また、中央より端の細胞を抜き取ることも行いましたが、やはりふ化率は著しく低下します。それでも今回の方法で加えたのは、ドナーとレシピエントの性を同一にする場合などでは必要と考えてのせました。この場合の細胞除去は、胚盤葉暗域で良いのですが、ふ化率はやはり低下します。

レシピエント胚への軟 X 線照射

これも必ずしも必要ではありません。レシピエント胚に放射線を照射すると、細胞の DNA の一部が破壊されるため、培養しても DNA 修復がまず行われることから細胞分裂するまでに時間がかかります。放射線を照射していないドナー細胞はこのようなことは無いため、ドナー細胞割合が増加すると考えられます。放射線の照射量によっても発育遅延の時間は異なりますが、キメラの発生割合が増加する傾向があるように思われます。

Hamburger & Hamilton('51)による発生ステージ表（ふ卵 3.5 日まで）

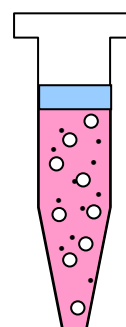
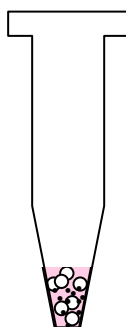
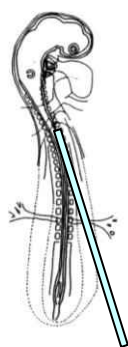
発生ステージ	ふ卵時間	胚の発育状況
1	0 時間	前条期、Eyal-Giladi('76)および Kochav et al.('80)における初期発生 の発生ステージ X と同じ。
2	6～7 時間	初原条期、原条が短く縦と横がほぼ同じ 0.3～0.5mm。
3	12～13 時間	中原条期、原条がほぼ中央にまで伸びている。
4	18～19 時間	定原条期、原条は平均 1.88mm に達する、明域は西洋梨型。
5	19～22 時間	頭突起期、脊索（頭突起）が前へ伸びる。
6	23～25 時間	頭褶期、脊索の前方にある明瞭な胚盤葉のひだが胚そのものの前 端を示す。体節はまだ現れていない。
7	23～26 時間	1 体節期、1 対の体節を持つ。2 対であれば 7 ⁺ 。
8	26～29 時間	4 体節期、体節が 3 つであれば 8 ⁻ 。
9	29～33 時間	7 体節期、一次眼胞がある。心臓原基が融合し始めている。
10	33～38 時間	10 体節期、心臓はわずかに右に傾いている。
11	40～45 時間	13 体節期、眼胞は基部がくびれている。心臓は右に湾曲している。
12	45～49 時間	16 体節期、頭は左側を下にして傾き始めている。一次眼胞と眼柄 は十分に完成している。心臓はやや S 字形をしている。
13	48～52 時間	19 体節期、頭は部分的または完全に左側を下に横転している。頭 屈曲と頸屈曲はゆるやかな曲線を描いている。
14	50～53 時間	22 体節期、頭屈曲は前脳と後脳はほぼ直角、頸屈曲はゆるやかな 曲線、体幹部屈曲が現れる。一次眼胞が陥入しはじめ水晶体板が 形成されている。
15	約 50～55 時間	これ以降のステージでは体節数にバラツキがあり判定基準とはな らない。頭屈曲は前脳と後脳は鋭角をなしている。
16	約 51～56 時間	屈曲はステージ 15 よりも著しく、体幹部屈曲がステージ 15 より 明確になる。
17	約 52～64 時間	頸屈曲は、ステージ 16 より鋭く曲がっているが、角度はまだ 90 度より大きい。尿嚢はまだない。
18	約 65～69 時間	頸屈曲は、ほぼ 90 度の角度。尿嚢が形成されるが、まだ胞状には なっていない。
19	約 68～72 時間	頸屈曲は、更に鋭角になる。体幹部屈曲は、ほぼまたは完全に消 失している。尿嚢は小さい袋だがまだ胞状にはなっていない。
20	約 70～72 時間	頸屈曲はステージ 19 より更に曲がっている。尾部屈曲は前方へ進 み始めている。眼はほのかに灰色を帯びている。
21	約 3.5 日	尾部屈曲は腰～仙骨域を含んでいる。体幹の背側の輪郭は直線で あるかやや曲がっている。眼はかすかに色素が形成されている。
22	約 3.5 日	屈曲はほとんど変化なし。眼の色素は明瞭である。



H&H の発生ステージ 1~20 (脊椎動物の発生 (上)、培風館、1989 より抜粋)

4. 始原生殖細胞 (PGC) 関連技術

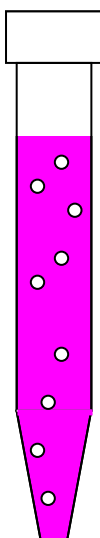
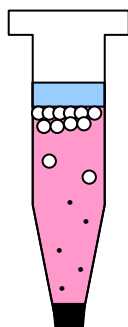
(1) PGC の採取方法



① 胚の中心を走る太い血管に、ガラス管で作製したマイクロピペットを突き刺し血液を吸引する。

② 1.5ml のチューブに採取した血液を集め、200G で 5 分間の遠心を行い、上清を捨てる。

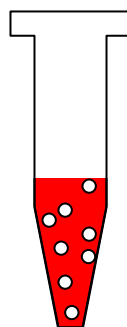
③ 集めた細胞を 16% フィコール MEM 1ml で浮遊させ、0% フィコール MEM を 0.1~0.2ml 重層する。



④ 800G で 30 分間の遠心を行う。赤血球が沈殿し、上層に PGC が集まる

⑤ ④の上清を 15ml の遠心チューブに移し、10ml の 0% フィコール MEM で分散する。

⑥ 200G で 5 分間の遠心を行い上清を捨てる。



⑦ ⑥の沈殿した細胞に KAv-1 を少量加えて攪拌し 1.5ml のチューブに移す。

(2) 血液中の PGC の計測法

- ① 1.5ml のチューブに 3.7%ホルマリン含 PBS(-)を 199 μ l を入れる。
- ② ふ卵開始後 2.5 日目の胚に、1 μ l の位置に目盛りを入れたガラス管で作製したマイクロピペットを血管に刺して 1 μ l 採血し、①の溶液と良く混合する。
- ③ サンプルをマルチウェルスライドガラスの穴に 10 μ l ずつ滴下する。
- ④ 標本が乾燥しないように水滴を落として、倒立顕微鏡 (150 倍) PGC を全てカウントする。PGC は赤血球よりも大きく細胞内に油滴の様なものが見える。赤血球は油滴の様なものが見えないので簡単に判別できる。



細胞を計測するときのマルチウェルスライドガラス。図は 12 穴のもの。



矢印の先の細胞が PGC。他の細胞は赤血球。

(3) PGC の PAS 染色

- ① (2) で作製した標本を 37℃で乾燥させる。
- ② 標本の上に 0.05%セロイジンエタノールを 150 μ l 静かに垂らす。これを 2 回行い 2～3 分静置した後、余分なセロイジンを吸い取り、37℃で乾燥させる。
- ③ 1%過ヨウ素酸 ($\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液に 5 分間漬ける。
- ④ 蒸留水で十分洗った後、Schiff 試薬に 5～10 分間漬ける。
- ⑤ 水洗せずに、0.5%メタ重亜硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 水溶液で 3 回、各 3 分間漬ける。ヘマトキシリン染色は行わない。

(注意)

セロイジン包埋を行うと、空中に浮遊している細かなゴミまで張り付いてしまい、ゴミの中には PAS で染色されるものもある。このようなものは、異常に濃く染色されていたり、形態が PGC とは明らかに異なっているので PGC と区別する。

セロイジン

パラフィンなどと同様に標本を包埋するものです。パラフィンとは異なってスライドグラスに包埋した後も細胞の染色が可能です。以前は、セロイジンとして国産のものが販売されていたのですが現在(2005 年)では販売されていません。ですが、メルク株式会社からセデュコール(Cedukol)と言う試薬が輸入販売されていて、このセデュコール 60g に無水エタノール 375ml とジエチルエーテル 375ml を混合することによって 8%のセロイジンができます。セロイジンの濃度を調整するには、8%のセロイジンに無水エタノールを加えることで行います。

PAS 染色キット

これは、いくつかの薬品会社から販売されています。武藤化学株式会社の製品は、試薬が小さなアンプルに小分けされているので扱いやすいです。キットの中には、核を染めるヘマトキシリンが入っていますが、PGC は細胞内のほとんどが核なので、ヘマトキシリン染色を行うと全部染まってしまうのでニワトリの PGC の場合は行いません。なお、PAS 染色キットは使用期限が比較的短いので、買いだめはしない方が良いでしょう。