J. Mamm. Ova Res. Vol. 13, 1996

8細胞期胚の割球集合によるキメラハムスターの作出

天野　朋和・堀内　俊孝・山田　　學・織部　智宏

広島県立大学生物資源学部　広島県庄原市　〒727

要旨：本研究では，毛色の異なる2種類のシリアンハムスター（ゴールデン系とアルビノ系）から採取した8細胞期胚の割球集合によりキメラハムスターの作出を試みた．8細胞期胚の回収液としては，HEPES-HECM-3培養液を用い，胚培養液としてはHECM-3培養液を用いた．フィトヘマアグルチニンを用いて付着させた凝集胚は37.5°C，10%O_2-10%CO_2-80%N_2の気相条件下で20時間培養した．凝集胚354個のうち，87個（25%）が桑実胚に，234個（66%）が胚盤胞胚に発生した．これらの胚の一部を3匹のレシピエント（Day 3）の子宮に移植したところ2匹が妊娠し，分娩した．移植胚の胎仔への発生率は，妊娠ハムスターあたりでは11%（7/64）となった．この7匹の産仔のうち毛色がキメラを示したもの（アグーチ）は6匹であった（雄5匹と雌1匹）．これら全てのキメラハムスターは雌雄とも正常な外部生殖器の形態を示した．

キーワード：キメラ，ハムスター，凝集胚，発生．

Tarkowski［1］およびMintz［2］がマウス初期胚の割球集合によりキメラを作出して以来，マウスを用いたキメラの研究が活発に行われている．これらキメラの研究から性分化［3］，胚発生の細胞分化の過程［4］，細胞間の相互作用［5］について貴重な情報が得られてきている．マウス以外ではラット［6］，ウサギ［7，8］，ヒツジ［9］，ウシ［10］，ヒツジ－ヤギ間［11］，ハムスター［12］でキメラは作出されている．しかし，ハムスターでのキメラ作出に関する検討は少なく，いまだ十分とは言えない．

現在，マウスはヒト疾患モデルとして基礎医学の分野で活発に用いられている．しかし，マウスのリポ蛋白質は高密度リポ蛋白質であるのに対してヒトとハムスターは共に低密度リポ蛋白質で，リポ蛋白質代謝はマウスとヒトとの間では異なると報告されている［13］．また，心臓筋疾患を持つハムスターの系統が存在し，ヒトの疾患動物モデルになると報告されている［14］．さらに，ハムスター卵子はマウスや他の哺乳動物卵子と比べ光への感受性が高く，染色体の異常が起こりやすいこと［15］や他の動物種と比較して少ない細胞数で胚盤胞期に発生し，内細胞塊と栄養膜細胞に分化するなどの特徴を持っている．そのため，ハムスターは，マウスとは異なる実験動物としての利用が期待されている．

そこで，本研究は，毛色の異なる2種類のシリアンハムスター8細胞期胚を割球集合させ，胚盤胞期への発生を調べたのち，キメラハムスターの作出を試みた．

材料および方法

供試動物：ゴールデン系とアルビノ系のシリアンハムスターは，日本エスエルシー社（静岡）から導入し，本学の実験動物舎で自家生殖したものを用いた．飼育室の温度と相対湿度はそれぞれ25°C±1，50%±10で，14時間明期・10時間暗期のサイクル下で維持し，餌と水は自由摂取とした．

供試胚：成熟雌ハムスターの発情周期はOrsini［16］に従って決定した．発情周期第1日目（Ovulation Discharge，OD）の日に両系の成熟雌ハムスター（6～8週齢）へPMSG（セロトロピン，帝国臓器）15 iuを筋肉内注射し，過剰排卵を誘起した．PMSG投与後3日目の夕方，成熟雄ハムスターと同居させ，翌朝にOD内の精子を確認した．精子を確認した日を妊娠1日目として，2日後の妊娠3日目の12：00に交尾雌ハムスターを頚椎脱臼で屠殺し，卵管と子宮を切り出した．次いで，前もって37°Cに温めたHEPES-HECM-3培養液で卵管と子宮を灌流し，8細胞期胚を採取した．

割球集合：8細胞期胚を数個ずつ0.5%プロナーゼ（アクチナーゼE，科研製薬）に10～15秒間静置し透明帯を除去した［17］．そして，それらの胚をHECM-3培養液のドロップ（50 μl）に移し洗浄した．次いで，フィトヘマアグルチニン（PHA，Difco；5 μl/ml）液のドロップに

（受付　1995年12月14日／受理　1996年1月25日）
別刷請求先：〒727　庄原市七塚町土橋山562
広島県立大学生物資源学部　堀内俊孝

ゴールデン系とアルビノ系ハムスター胚を1個ずつ置き，それらの胚をピペットで軽く押し付着させた．5分間後，凝集した胚をHECM-3培養液のドロップ（10 μl）に1個ずつ配置し，37.5°C，10%O_2-10%CO_2-80%N_2の気相条件下で20時間培養した．

胚移植：精管結紮した成熟雄ハムスターと交配した偽妊娠レシピエント（Day 3）に，キシラジン（セラクタール，バイエル社；1 mg/体重100 g）とケタミン（ケタラール，三共；5 mg/体重100 g）を筋肉内注射し麻酔した［18］．レシピエントの背側部を切開し，卵巣，卵管，子宮角上部を引き出した．まず注射針で子宮を刺し，その孔に沿って移植用ピペットを子宮内腔に挿入した．そして，少量の培養液と共に凝集胚を子宮内腔に注入し，ゆっくりとピペットを腔から抜いた．移植後は，速やかに子宮を腹腔内にもどし，切開部位を縫合した．

結　果

ゴールデン系とアルビノ系のハムスターから採取した総計708個の8細胞期胚を本研究では用いた．これら2種類のハムスター8細胞期胚をPHAで凝集させ，37.5°C，10%O_2-10%CO_2-80%N_2の気相条件下で培養した（Table 1）．桑実胚への発生率は25%（87/354），胚盤胞胚への発生率は66%（234/354）であった．

桑実胚と胚盤胞胚に発生した凝集胚の一部をレシピエント（Day 3）へ移植した．3匹のレシピエントに各29個，26個，35個の凝集胚を移植したところ，No. 1と3のレシピエントが妊娠し，分娩した．凝集胚の胎仔への発生率をTable 2に示した．妊娠したレシピエントにおいて，凝集胚の胎仔への発生率は11%（7/64）となった．

No. 1のレシピエントから生まれた産仔をFig. 1に示した．この産仔の毛色は茶色と白色が混在した状態（アグーチ）であった．また，No. 3のレシピエントから生まれた3匹の産仔のうち，2匹はアグーチであったが，1匹は白色（アルビノ）を示した．毛色がキメラを示した産仔は5匹が雄で1匹が雌であった．これら6匹のキメラハムスターは正常な外部生殖器の形態を示した．

考　察

本研究では，毛色の異なる2種類のシリアンハムスター（ゴールデン系とアルビノ系）から得た8細胞期胚をPHAにより凝集させ培養した．その結果，単一の桑実胚と胚盤胞胚へ91%と高率に発生し，これらの胚を偽妊娠レシピエント（Day 3）に移植したところ低率ではあるがキメラハムスターを作出することができた．

Seshagiri and Bavisterは，培養液中のグルコースとリン酸塩がハムスター8細胞期胚の体外発生を抑制すると報告した［19, 20］．我々はハムスター8細胞期凝集胚の体外培養液として，グルコースとリン酸塩が除去されたHECM-3培養液［21］にBSA（Albumin Fraction V, SIGMA；0.1 mg/ml）を加えて使用した．この培養液でハムスター8細胞期凝集胚はPiedrahitaらの報告［12］よりも高率に桑実胚と胚盤胞胚へ発生した．彼らはキメラハムスター作出において，凝集胚の培養にSeshagiri and Bavisterが報告した［22］HECM-2培養液を用いている．HECM-2培養液はHECM-3培養液とは異なりピルビン酸と20種類のアミノ酸が添加されているが，これら

Table 1. *In vitro* development of aggregated hamster eight-cell embryos

No. of trial	No. of aggregated embryos	No. (%) of embryos developing		
		total	morula	blastocyst
17	354	321 (91)	87 (25)	234 (66)

Table 2. Development of aggregated hamster embryos after embryo transfer

Recipient	No. of embryos transferred			No. (%) of chimeric pups born		
	total	morula	blastocyst	total	albino	agouti
1	29	15	14	4	0	4
2	26	11	15	0	0	0
3	35	3	32	3	1	2
total	90	29	61	7 (8)	1	6 (7)

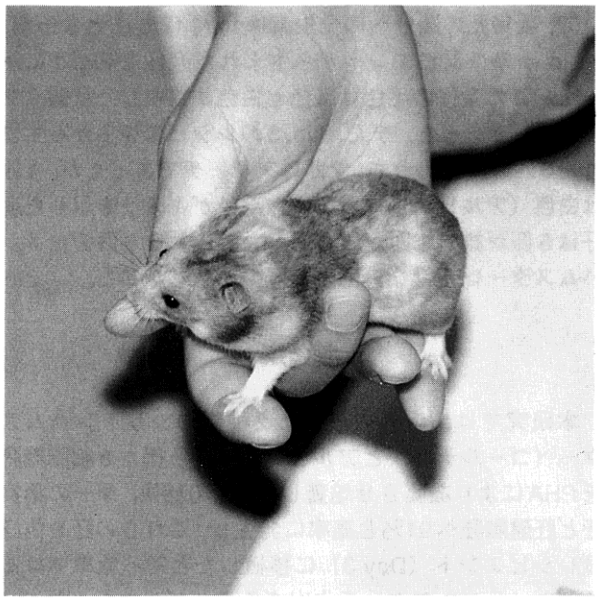

Fig. 1. A chimeric hamster produced by aggregation of eight-cell embryos. This hamster was determined as a chimera by coat color (Agouti).

の培養液組成の相違で発生率に差異がついたのか明らかではない．しかし，Mckiernan and Bavister は着床前胚の培養にアミノ酸を添加した培養液（HECM-6）を用い，低濃度のアミノ酸添加は胚発生に有効であると報告している［23］．

Piedrahita ら［12］は8細胞期胚を付着させる際，PHA を使用していないが，今回の実験では PHA を使用することでほぼ100%の胚を凝集させることができた．そのため，PHA により完全に胚を凝集させることが桑実胚や胚盤胞胚への発生を高率にしたものと考えられる．

本研究室でのゴールデン系は分娩後の産仔の喰殺が多く産仔数が著しく低下するため，今回はレシピエントとしてアルビノ系を用いた．しかし，キメラ胚着床後の胎仔と子宮との相互作用を両系統間で見るためには，ゴールデン系をレシピエントとした検討も必要かもしれない．

Sato and Yanagimachi［24］は性周期を同期化させたレシピエントの子宮へ胚盤胞胚を移植したとき，最も高い胎仔への発生率を示すと報告している．また，Bavister ら［25］はドナーとレシピエントの性周期を同期化させた方が着床の率が増加すると報告している．しかし，Piedrahita ら［12］は Day 4 の 8 細胞期凝集胚を Day 3 のレシピエントの子宮に移植している．今回のアルビノハムスターへの 8 細胞期凝集胚の移植は Piedrahita ら［12］の方法に従い Day3 の偽妊娠レシピエントに試みた．本研究では各レシピエントに平均30個の凝集胚を移植したところ，2匹のレシピエントが妊娠し，7匹の産仔を分娩した．移植した胚数に対する凝集胚の胎仔への発生率は 8%と非常に低かった．Schini and Bavistar［26］は移植する胚数が多すぎると逆に妊娠率は低下すると報告している．また，Jarosz and Dukelow［27］は子宮内腔へ移植用ピペットを挿入させる際に子宮内膜を傷つけ，黄体退行作用のあるプロスタグランジンが放出されることで妊娠率は低下すると報告している．今回の移植における胎児への低発生率がレシピエントの性周期非同期化によるものか，多数胚移植により着床不全あるいは着床後の流産を生じたのか，子宮内移植時の技術的な問題によるものか今後の検討が必要である．

Mclaren［28］はマウスでの凝集キメラ作出において，産仔の性表現型は雄と雌の比率が約3：1であったと報告した．今回得られた産仔の性表現型は5匹が雄，2匹が雌で，彼女らの報告と同様，約3：1となった．また，Piedrahita ら［12］は 40%（2/5）の雄性ハムスターが不妊で，得られた雌性キメラハムスターは全て生殖キメラになっていたと報告している．本研究で得られたキメラハムスターについては交配実験で検討中である．

現在，マウスにおけるキメラ動物の作出は胚性幹細胞（ES 細胞）を用いた遺伝子導入等の研究に応用されている．遺伝子導入された ES 細胞を用いたキメラ動物の作出と，その後の交配によって遺伝子導入動物を生産することが容易に出来るようになってきた．しかし，ハムスターにおいては，ES 様細胞株樹立の報告があるのみである［29］．そのため，ハムスターでの ES 細胞株の樹立とその利用によるキメラ動物の作出は遺伝子導入の研究において重要であると考えられる．

文　献

1) Tarkowski, A.K. (1961): Mouse chimaeras developed from fused eggs. Nature, 190, 857–860.
2) Mintz, B. (1962): Experimental recombination of cells in the developing mouse egg: normal and lethal mutant genotypes. Am. Zool., 2, 541–542.
3) Mclaren, A. (1975): Sex chimaerism and germ cell distribution in a series of chimaeric mice. J. Embryol. Exp. Morphol., 33, 205–216.
4) West, J.D. (1984): Cell markers. In: Chimeras in Developmental Biology (Le Douarin N. and Mclaren, A., eds.), pp. 39–67, Academic Press, London.
5) Papaiannou, V.E., Artzt, K., Dooher, G.B. and Bennet, D. (1979): Effects of chimerism for two T/t complex mutations on sperm function. Gamete Res., 2, 147–151.
6) Mayer, J.F. and Fritz, H.I. (1974): The culture of pre-

implantation rat embryos and the production of allophanic rats. J. Reprod. Fertil., 39, 1–9.
7) Garner, R.L. and Munro, A.J. (1974): Successful construction of chimeric rabbits. Nature, 250, 146–147.
8) Babinet, C. and Bordenave, G.R.(1980): Chimaeric rabbits from immunosurgically-prepared inner-cell-mass transplantation. J. Embryol. Exp. Morphol., 60, 429–440.
9) Tucker, E., Moor, R.M. and Rowson, L.E.A. (1974): Tetraparental sheep chimeras induced by blastomere transplantation. Change in blood type with age. Immunology, 26, 613–621.
10) Brem, G., Tenhumberg, H. and Krausslich, H. (1984): Chimerism in cattle through microsurgical aggregation of morulae. Theriogenology, 22, 609–613.
11) Fehilly, C.B., Willadsen, S.M., Dain, A.R. and Tucker, E.M.(1985): Cytogenetic and blood group studies of sheep/goat chimaeras. J. Reprod. Fertil., 74, 215–221.
12) Piedrahita, J.A., Gillespie, L. and Maeda, N. (1992): Production of chimeric hamsters by aggregation of eight-cell embryos. Biol. Reprod., 47, 347–354.
13) Spady, D.K. and Dietschy, J.M. (1985): Rates of cholesterol synthesis and low-density lipoprotein uptake in the adrenal glands of the rat, hamster, and rabbit *in vivo*. Biochim. Biophys. Acta., 836, 167–175.
14) Homburger, F. (1979): Myopathy of hamster dystrophy: History and morphologic aspects. Ann. N.Y. Acad. Sci., 317, 2–17.
15) Hirao, Y. and Yanagimachi, R (1978): Developmental effect of visible light on meiosis of mammalian eggs *in vitro*. J. Exp. Zool., 206, 365–370.
16) Orsini, M. (1961): The external vaginal phenomena characterizing the stages of the estrous cycle, pregnancy, pseudopregnancy, lactation, and the anestrous hamster, *Mesocricetus auratus* Waterhouse. Proc. Anim. Care Panel., 11, 193.
17) Mintz, B. (1962): Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida. Science, 138, 594–595.
18) Curl, J.L. and Peters, L.L. (1983): Ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride anaesthesia in the golden hamster. Lab. Anim., 17, 290–293.
19) Seshagiri, P.B. and Bavister, B.D. (1989): Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos *in vitro*. Biol. Reprod., 40, 599–606.
20) Seshagiri, P.B. and Bavister, B.D. (1989): Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos *in vitro*. Biol. Reprod., 40, 607–614.
21) Barnett, D.K. and Bavister, B.D. (1992): Hypotaurine requirement for *in vitro* development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocysts, and production of term offspring from *in vitro*-fertilized ova. Biol. Reprod., 47, 297–304.
22) Seshagiri, P.B. and Bavister, B.D. (1990): Assessment of hamster blastocysts derived from eight-cell embryos cultured in hamster embryo culture medium-2 (HECM-2): Cell numbers and viability following embryo transfer. J. In Vitro Fert. Embryo Transfer., 7, 229–235.
23) Mckiernan, S.H. and Bavister, B.D. (1994): Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. Human Reprod., 9, 2123–2129.
24) Sato, A. and Yanagimachi, R. (1972): Transplantation of preimplantation hamster embryos. J. Reprod. Fert., 30, 329–332.
25) Bavister, B.D., Leibfried, M.L. and Lieberman, Gay. (1983): Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol. Reprod., 28, 235–247.
26) Schini, S.A. and Bavister, B.D. (1990): Normal offspring produced after transfer of hamster embryos grown from two- to eight-cell in a chemically-defined culture medium. Theriogenology, 33, 1255–1262.
27) Jarosz, S.J. and Dukelow, W.R. (1990): Embryo transfer and pregnancy rate in the golden hamster. Zool. Sci., 7, 85–91.
28) Mclaren, A. (1975): Sex chimaerism and germ cell distribution in a series of chimaeric mice. J. Embryol. Exp. Morphol., 33, 205–216.
29) Doetschman, T., Williams, P. and Maeda, N. (1988): Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. Developmental Biology, 127, 224–227.

Production of Chimeric Hamsters by Transfer of Aggregated Eight-Cell Embryos

Tomokazu Amano, Toshitaka Horiuchi, Manabu Yamada, Tomohiro Oribe

Laboratory of Animal Reproduction, Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University, Shobara, Hiroshima 727, Japan

Chimeric hamsters were produced by the aggregation of eight-cell embryos obtained from two stains (golden and albino) of Syrian hamster. Eight-cell embryos were collected by flushing of oviduct and uterus using HEPES-HECM-3 medium. The aggregated embryos by PHA were cultured in HECM-3 medium for 20 h under 10%O_2-10%CO_2-80%N_2 at 37.5°C. Of 354 aggregated embryos, 87 (25%) and 234 (66%) had developed into morulae and blastocysts, respectively. Total 90 aggregates (morulae and blastocysts) were transferred to 3 recipients at Day 3 of pseudopregnancy. Of 3 recipients, 2 became pregnant. Seven pups were born from the two recipients. Of 7 pups born, 6 were determined as chimeric hamsters by coat color (agouti). Of 6 chimeras, 5 were phenotypic males, and 1 was a phenotypic female. All chimeric hamsters had normal external genitalia.

Key words: Chimera, Hamster, Aggregated embryos, Development.