

マウス ES 細胞脱核法の検討

安藤 陽子

胚性幹細胞 (embryonic stem cell 以下 ES 細胞) は、自己複製能とすべての細胞に分化する能力を有する細胞である。ES 細胞の核を脱核し患者由来の体細胞核を導入することができれば、既存の ES 細胞を患者自身の遺伝情報を持つ ES 細胞に造り換えることができる。これによって現在の臓器移植における免疫拒絶の問題を回避できると考えられるが、現在のところ ES 細胞から効率よく核を除く方法は報告されていない。そこで ES 細胞の脱核法を検討した。マウス ES 細胞 (E14TG2a-ES cell) にアクチンを脱重合させるためサイトカラシン B を作用させ、その核を除くためにディスク脱核法と重層遠心脱核法の 2 種類の遠心法を行った。

ディスク脱核法により 9,000 rpm では約 23%, 11,000 rpm では約 42% の核を脱核できた。Ficoll の 25%, 20%, 10%, 5% 溶液を重層し、その上に ES 細胞を乗せて 28,500 rpm 60 分間の遠心による重層遠心脱核法では約 40% の効率で脱核できた。脱核した ES 細胞を大量に得る方法としては、重層遠心脱核法が良いと思われた。今後は、電気融合法やセンダイウィルス (HVJ) 法を使って、脱核した細胞に体細胞の核を導入する技術を確認しなければならない。

(平成15年10月20日受理)

An Effective Enucleation Method for Murine Embryonic Stem Cells

Yoko ANDO

Embryonic stem cells (ES cells) are self-renewing and can generate all cell types. In the near future, it is likely that tissues and organs differentiated from human ES cells will be used as materials for transplantation. However, to achieve this goal in regenerative medicine, the immunological rejection of transplanted tissues and organs from the host must be overcome. If the genomic information of ES cells could be replaced within a patient, immunological rejection could be avoided. In the preparation of nuclei-replaced ES cells, it might be possible to replace the nuclei manipulated unfertilized oocytes with ones from a patient's somatic cells using original material, but this method raises bioethical problems.

In the study reported here, nuclei were removed from mouse cultured ES cells (E14TG2a) by two enucleation methods, the disk method or the density gradient method. Both methods utilized cytochalasin B to depolymerize actin filament, and resulted in enucleation from cells under centrifugation. Approximately 23–42% of nuclei were removed from ES cells by the disk method, while 40% were removed by the density gradient method. In the future, these methods will allow us to replace ES nuclei with those of a patient's somatic cells. (Accepted on October 20,

2003) *Kawasaki Igakkaishi* 29 (3): 221-229, 2003

Key Words ① Embryonic stem cell ② Enucleation ③ Regenerative medicine
④ Immunological rejection ⑤ Cytochalasin B

はじめに

人間の体は約60兆個の細胞からできている。その細胞から作られている体の組織、臓器や器官の機能が何らかの理由で損なわれたとき、機能の補助あるいは代替する医療には大まかに3つの方法が考えられる¹⁾。一番目は心臓ペースメーカーや人工関節などの人工臓器を用いる方法である。二番目は臓器移植である。しかし、これらの方法には拒絶反応や提供者の確保が難しいなどの問題がある。三番目の方法として、今注目されているのが再生医療である。再生医療は自然には再生できない組織・臓器を再生させ、機能を回復させる次世代医療である。生体外で組織を再生させるために、自己または同種の幹細胞を用いる方法が現在注目されている。

幹細胞とは、自己複製能と特定の機能を持つ細胞に分化する能力を併せ持つ細胞のことであり、大きく二つに分けることができる。一つは、骨髄幹細胞に代表される臓器幹細胞 (organ stem cell) であり、もう一つは初期胚から樹立された胚性幹細胞 (embryonic stem cell)^{2), 3)} である。胚性幹細胞 (以下 ES 細胞) は適当な条件で培養することで様々な細胞へと分化誘導することが出来る^{4)~9)}。マウス ES 細胞を用いた研究から、ES 細胞は体内すべての細胞になり得る能力、すなわち全能性を持つことが明らかにされている。

ES 細胞の全能性を患者由来の体細胞に付与し、任意の組織や器官に再生させることが出来れば、臓器移植における免疫拒絶の問題を回避できる可能性がある。全能性を付与する方法として、患者由来の体細胞の核を未受精卵にマニピュレーターで移植し、培養して得られた胚盤胞から ES 細胞を樹立する方法が考えられる。しかし ES 細胞化に時間がかかる上に別の個体

から未受精卵を得る必要があり、倫理的に問題がある。一方、継代培養されている ES 細胞の核を予め脱核し、そこに患者由来の体細胞核を導入することができれば全能性を付与できる可能性がある。もしこの方法が確立されるならば、既存の培養 ES 細胞を患者自身の遺伝情報を持つ ES 細胞に造りかえることができ、臨床的にも多大なメリットを提供することができる。接着性の培養細胞ではサイトカラシン B を使ってアクチンを脱重合させることで脱核する方法が報告^{10)~13)}されている。また、浮遊細胞ではサイトカラシン B 存在下で細胞を重層遠心法で脱核する方法が報告¹⁴⁾されているが、確立されたものではない。そこで本研究では、マウス ES 細胞を用いて核を除去する条件を検討した。

材料と方法

培養液は、GMEM (Glasgow's minimum essential medium, Gibco 社) に 10^{-4} M 2-メルカプトエタノール (Sigma 社), 24 mM NaHCO_3 (Sigma 社), 1 mM ビルビン酸ナトリウム (Gibco 社), 100 mM 非必須アミノ酸 (Gibco 社) を純水 (Sigma 社) に加え、塩酸 (Sigma 社) で pH 7.2 に調製後 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌した液に、10% Fetal Bovine Serum (以下 FBS, Gibco 社) と Leukemia Inhibitory Factor (以下 LIF, Chemicon 社) を加えた。

トリプシンは、500 ml の PBS に 125 mg トリプシン (Difco 社), 188 mg EDTA (Sigma 社), 1 g NaHCO_3 (Sigma 社) に 5 ml ニワトリ血清 (Cellect 社) を加え $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌した。

ゼラチン (Sigma 社) は 0.1% の濃度に純水で調製し、滅菌した。

(1) ES 細胞培養条件

E14TG2a-ES 細胞 (国立生理学研究所, 福井

由宇子博士より恵与された)を使用した。ES細胞で confluent になった T25 フラスコの培養液を吸い取り、PBS (Oxoid 社) で洗浄後、液を吸い取った。トリプシン 2 ml を入れ 37℃ 30 秒間加温し細胞をフラスコから剥離させた。培養液を先ほどのフラスコに 3 ml 加え懸濁後 800 rpm 5 分間遠心 (CT5DL 日立)。遠心後上清を吸い取り再び培養液 5 ml 加え 800 rpm 5 分間遠心。培養液 5 ml 加え懸濁させたもののうち 0.5 ml と培養液 4.5 ml をゼラチンコートされたフラスコに播種。これを 37℃, CO₂ 7.5% の条件下で培養した。継代は 2 日に 1 回行った。

(2) ディスク脱核法

①脱核用ディスクの調製および細胞プレート調製

Falcon 社のプラスティックシャーレを特製の Cutter を用いて、直径 25 mm の円形ディスクを作製した。縁をサンドペーパーで整形した後、流水で洗浄し、その後 70% エタノールに 2 時間浸け、クリーンベンチ内で紫外線を照射して滅菌、乾燥させた。ディスクを 10 cm シャーレに 8 枚並べ、0.1% ゼラチンで最低 1 時間インキュベート (4℃) した。そのシャーレのゼラチンを吸い取り、ES 細胞を $2 \sim 5 \times 10^6$ /シャーレに播種し、2 日間培養後、脱核操作を行った。このディスク入りシャーレを 4 つ用意した。

②遠心・脱核

遠心には 8 枚のディスクのうち 6 枚を使用した。

内径 25 mm、容量 50 ml の遠心管にリングを入れる。10 μ g/ml のサイトカラシン B (Sigma 社) を PBS に 5% ウシ胎児血清を加えた溶液に加え (以下 CB 液) 37℃ に温めておき、用意しておいた遠心管に 10 ml 入れた。細胞が付着しているディスク面を下向きにリングの上に乗せ遠心した。遠心機は 37℃ に設定しておいた CR-21 (日立) を使用した。遠心条件は 11,000 rpm 20 分と 9,000 rpm 20 分の 2 種類で行った。

遠心後、血清を含む培養液に 37℃, 2 時間ディスクを浮置させ、細胞形態を復原させた。

③固定・染色

細胞形態を復原させたディスクの入ったディッシュ中の培養液を吸い取り、1.5 ml の PBS で洗浄後、トリプシン 0.5 ml を入れ 37℃ に加温してディスクから細胞を剥がした。この剥離細胞溶液に 0.5 ml の培養液を加えよく懸濁した後、エッペンドルフチューブに移し 3,000 rpm で 5 分間遠心した。回収されたペレットに培養液 1 ml を加え懸濁した後、3,000 rpm で 5 分間遠心し、得られた細胞ペレットに 0.5 ml の培養液を加え懸濁させた。この細胞をサイトスピン (cytospin 3, Shandon 社) で 1,000 rpm 5 分の条件で遠心し、細胞を回収した。4% パラホルムアルデヒド/PBS で 15 分間室温にて固定した。TBST 液 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20) で洗浄後、0.1% Triton X-100/PBS で 10 分間室温下にて透過処理した。TBST で洗浄し、60 分間室温で 4% 正常兔血清/PBS (Chemicon 社) を用いてブロッキングした。10 倍希釈した抗 SSEA-1 抗体液 (Chemicon 社) で 60 分間、室温で反応させた後、TBST で洗浄した。次に 2 次抗体 (FITC 標識 抗マウス Ig 抗体, Chemicon 社) 反応を 60 分間、室温で行った。TBST で洗浄後、DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole, Sigma 社) で染色し脱核できているかどうか検討した。

脱核処理をしていない残りの 2 枚のディスクも同様に細胞を回収後、固定染色を行った。

④フローサイトメトリー

③で剥離した固定前の細胞ペレットを 0.1 ml の PBS に懸濁した。それに 0.1 ml の SYTO11 (10 μ M in PBS, Molecular Probe 社) を混合し 10 分間室温に置き、PBS 0.8 ml を加えナイロンメッシュ (プランクトンネット, 池本理化社) に通した後、フローサイトメトリー (FACS Caliber, 日本ベクトンデッキンソン社) にて解析した。脱核処理をしていない残りの 2 枚のディスクも同様に剥離し、フローサイトメトリーを行った。

(3) 重層遠心脱核法

ES 細胞は、材料と方法の (1) の条件で培

養したものを使用。800 rpm で遠心後、上清を取り除いたペレットに、濃度を2倍で成製したES細胞培養液(2XGMEM) 1 mlを加え、懸濁した。15 μ g/ml サイトカラシン B と 1 mM Hoechst33342 (Sigm 社) を含む25 % Ficoll (Amersham Biosciences 社) を2XGMEM で希釈し、20%/10%/5 % Ficoll 希釈液を作製した。これらの希釈液(25% 3 ml, 20% 2 ml, 10% 2 ml, 5 % 2 ml)を順次遠心チューブに重層し、37°Cで1時間保温した。この遠心チューブにES細胞液(1 $\times 10^7$ cell)を乗せ、28,500 rpm 60分間超遠心した。遠心機はXL-90(Beckman 社)を使用した。遠心後、約2 mlずつ分取した。サンプル0.1 mlあたり0.1 mlのSYTO11を混合し10分間室温に置き、PBS 0.8 mlを加えナイロンメッシュに通した後、フローサイトメリーにて解析した。

結 果

(1) ディスク脱核法

ES細胞を2日間培養したところ、ディスク1枚当たりの細胞数は、2.5~3.3 $\times 10^5$ (平均2.7 $\times 10^5$)であった。9,000 rpmで20分間遠心し脱核処理したところ、ディスク1枚当たりに残った細胞数は0.4~0.6 $\times 10^5$ (平均0.5 $\times 10^5$)であった。また11,000 rpmで20分間遠心した後の細胞数は0.3~0.4 $\times 10^5$ (平均0.35 $\times 10^5$)であった。遠心して残った細胞数の平均は、9,000 rpmでの遠心では約19%であったのに対し、11,000 rpmでの遠心後では約13%であった。

これらの細胞をサイトスピンで細胞を回収後DAPIで染色し、蛍光顕微鏡で観察し脱核率を計測した。その結果、9,000 rpmの遠心では平均22.7%, 11,000

rpmの遠心では平均41.9%の細胞が脱核されていた(Fig. 1)。この脱核率に遠心後の細胞の回収率を考慮すると、最終的なディスク法による脱核細胞の回収率は、9,000 rpmで4.3%, 11,000 rpmで5.4%であった。Figure 2は遠心脱核処理をしていないディスクから回収した細胞の顕微鏡像(A, B)と11,000 rpmで遠心脱核処理後のディスクから回収した細胞の顕微鏡像(C, D)を示した。(A, C)は位相差顕微

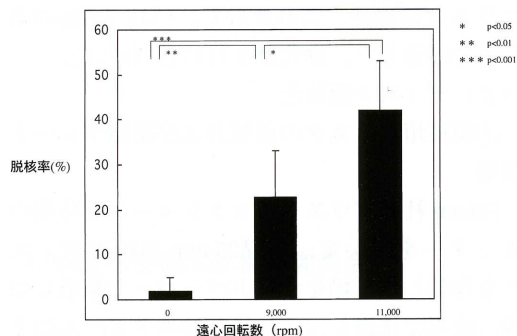


Fig. 1. ディスク法によるES細胞の脱核率

脱核処理を加えていない細胞(0)と脱核処理された細胞(9,000, 11,000)を固定後、位相差顕微鏡像とDAPI染色像を用いて脱核率を計測した。脱核率は、9,000 rpmでは22.7 \pm 10.2%, 11,000 rpmでは41.9 \pm 11.1%であった。

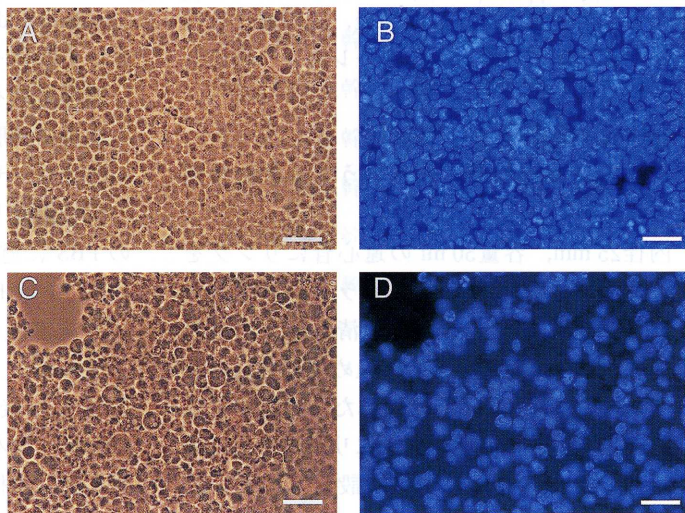


Fig. 2. ディスク法により脱核したES細胞(×200)

(A, B) 脱核処理をしていないES細胞, (C, D) 11,000 rpmで脱核したES細胞, (A, C) 位相差顕微鏡像, (B, D) DAPI染色像. 脱核処理をしていない細胞に比べ約42%のES細胞の核を除去できた。スケールは100 μ m.

鏡像, (B, D) は DAPI 染色像. DAPI 染色像で明らかに脱核処理を加えた方の核密度が少ないことがわかった. **Figure 3** の (A) は 11,000 rpm で遠心脱核処理後のディスクから回収した細胞の顕微鏡像, (B) は (A) と (C) の合成像, (C) は DAPI 染色像. 矢印は 1 つの脱核細胞を示したが, 同様の脱核細胞が多数認められた. 位相差顕微鏡像による観察では 11,000 rpm で遠心した後の ES 細胞の外部形態に特に異常はみられなかった. また未分化マウス ES 細胞の指標である SSEA-1 抗原^{15), 16)}の有無を蛍光抗体法で解析した結果が **Figure 4** である. 脱核前ではほとんどの細胞に核があり (**Fig. 4A**), かつ SSEA-1 抗原が存在する (**Fig. 4B**). 脱核遠心 (11,000 rpm) 後では, 約 40% の細胞

が脱核され (**Fig. 4C**), またそれらの脱核された細胞 (矢印で示す) にも SSEA-1 抗原が存在することが明らかとなり, 未分化状態が保たれていることが明らかとなった (**Fig. 4C**).

更に, ES 細胞を DNA 量 (核の指標) と FSC 値 (前方散乱光 Forward Scatter; 細胞の大きさの指標) を指標にしてフローサイトメトリーにより解析したところ, 脱核処理により DNA 量が少ない細胞の数が増えていることが確認できた (**Fig. 5**).

(2) 重層遠心脱核法

重層遠心脱核後, 比重の最も低い層から順に 2 ml ずつ 5 本 (以下分画 1, 2, 3, 4, 5, と呼ぶ) に分取した. 分画 1, 2 の層はフローサイトメトリーおよび顕微鏡の観察から, 脱核されているが, 細胞の大きさが極めて小さく, 細胞が断片化されたものであった. 分画 3 は脱核され, かつ大きさが正常の細胞である細胞の比率が最も高い層であった.

Figure 6 に分画 3 のフローサイトメトリーの結果を示した. DNA 量, FSC 値に応じて 4 つの区画 A, B, C, D に分けた. 区画 A は脱核され, かつ大きさが正常の細胞, 区画 B は脱核されていない細胞, 区画 C は脱核されているが断片化した細胞である. 脱核され, かつ, 大きさが正常の細胞 (区画 A) は, 全体の約 40% であった. より比重の高い分画 4, 5 の層では, 脱核されていない細胞が大部分を占めた.

考 察

これまでにマウスを用いて, 体細胞に ES 細胞を融合させることに成功したという研究が国

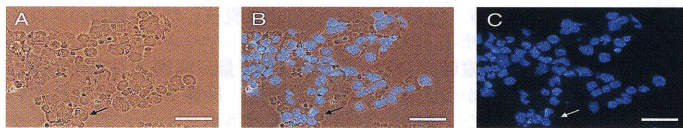


Fig. 3. ディスク法により脱核した ES 細胞 ($\times 400$)
(A) 11,000 rpm で脱核した ES 細胞の位相差顕微鏡像, (B) は (A) と (C) の合成像, (C) は DAPI 染色像. 脱核された細胞 1 つを矢印で示した. スケールは 200 μ m.

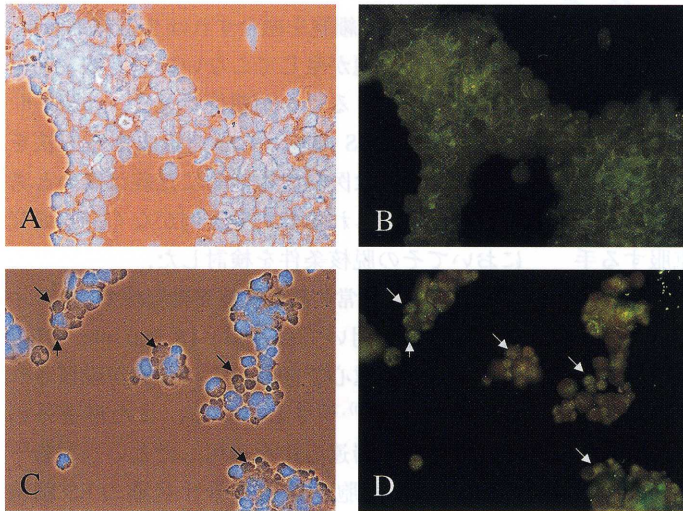


Fig. 4. SSEA-1 抗原の解析 ($\times 200$)
(A, B) は脱核していない ES 細胞, (C, D) は 11,000 rpm で脱核した ES 細胞. (A, C) は位相差顕微鏡像と DAPI 染色像の合成, (B, D) は抗 SSEA-1 抗体で処理後, FITC 標識抗マウス IgG による蛍光染色像. 核が抜けて染色された一部の ES 細胞を矢印で示した.

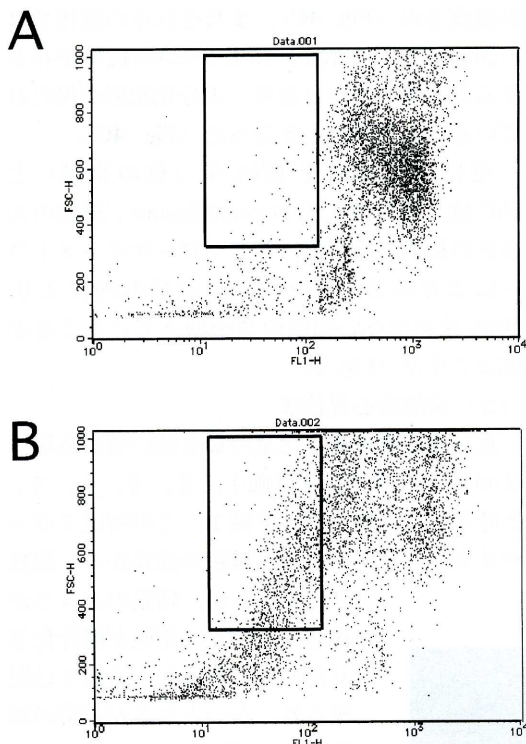


Fig. 5. ディスク法により脱核したES細胞のフローサイトメトリー

(A)脱核処理をしていないES細胞, (B) 11,000 rpmで脱核したES細胞. 縦軸は前方散乱光 (FSC) の強度, 横軸はDNA量. 脱核処理 (B) により, 脱核し, かつ大きさが正常の細胞が増えている (Bの枠内).

内外のグループから報告^{17), 18)}されている. これらの研究では, 体細胞由来のゲノムが融合細胞内で維持され, かつその融合細胞が多分化能を持つことが示されている. しかし, この融合ES細胞では, もとのES細胞自体のゲノムも存在するために, 免疫拒絶の問題を克服する手段にはならない. このためにES細胞自体の核を融合前に予め除去することが必要である. また脱核しないES細胞を用いる融合法の場合, 免疫拒絶以外に別の問題がある. 融合細胞内では, 染色体が4倍体という異常な状態になり, 多くの染色体が離脱したり, 逆に染色体転座が起きるとい問題である. 実際にES細胞に体細胞を融合させた研究で, 染色体の欠損が報告¹⁹⁾されている. このような染色体の不安定性は融合細胞の増殖停止, 細胞死を引き起こすの

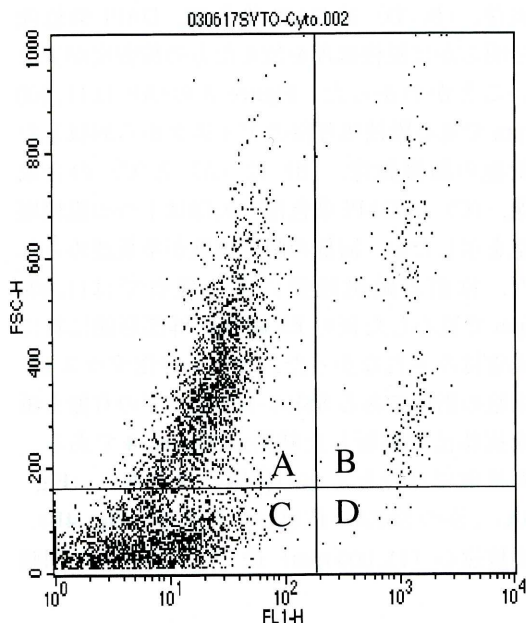


Fig. 6. 重層遠心脱核法により脱核したES細胞のフローサイトメトリー

縦軸はFSC, 横軸はDNA量. 区画Aは脱核され, かつ大きさが正常な細胞, 区画Bは脱核されていない細胞, 区画Cは脱核されているが断片化した細胞. A区域は全体の約40%あった.

で, 融合細胞 (コロニー) の出現率を引き下げることが考えられる. もし当初からES細胞を脱核したものに細胞を融合すれば2倍体であり, このような問題が生じてこないの, 融合効率自体も改善できることが期待できる. この2つの観点から, ES細胞から核を除去する方法を確立することは医学生物学的に意義は高いと考えられるが, これまでに報告例がなく, 本研究においてその脱核条件を検討した.

これまでに通常の接着性培養細胞株では, ディスク脱核法を用いて11,000~15,000 rpm, 15分から30分間の遠心で90%以上の細胞が脱核されることが報告^{20), 21)}されている. また浮遊系の細胞では, 重層遠心法を適用したという報告²²⁾がある. ES細胞, 特に未分化状態のES細胞では, 基質に対する接着性が弱く通常のディスク脱核法の条件では, 遠心中にディスクから細胞そのものが脱落することが予想された. また通常ES細胞を未分化状態に維持するためには,

フィーダー細胞として繊維芽細胞を培養し、その上に ES 細胞を培養する。しかし、この条件では脱核のために遠心すると、ES 細胞がディスクからすべて脱落してしまうことも予想された。最近、フィーダー細胞なしでも未分化状態を維持できる ES 細胞が報告されたので²³⁾、これを用いてまずはディスク遠心による脱核を試みた。

既報の条件中、最も低速の11,000 rpm とそれより低速の9,000 rpm で脱核を試み、それぞれ約42%、23%の脱核率であった。回転数を13,000 rpm 以上に上げると、ほとんどの細胞が脱落してしまった。また11,000 rpm と9,000 rpm で遠心した場合、それぞれ全細胞の13%、19%の細胞しか留まらなかった。この原因として、この ES 細胞はフィーダー細胞の代わりに基質をゼラチンコートする必要がある、このコートへの接着力が弱いために遠心中に脱落しやすいと思われる。ディスクへの細胞の接着性を増強させる方法として、スルホン化や Concanavalin-A 処理の方法が報告²⁴⁾されている。これらの方法がゼラチンコート化した場合に有効かどうか、今後検討する必要がある。また基質に対する接着性が低いとされる未分化 ES 細胞のみが脱核遠心中に脱落し、脱核されてディスク上に残っているのはすべて分化した ES 細胞である、という可能性がある。今回の実験で、マウス ES 細胞未分化状態の指標である SSEA-1 抗原陽性の細胞が、脱核されたディスク上に残っていることから、未分化のまま脱核されることが明らかになった (Fig. 4)。

またもう一つの脱核法、本来浮遊系の株化細胞に適用例のある、重層遠心脱核法を ES 細胞に用いた。この方法で約40%脱核させる条件を見いだした。適当な密度の分画をとることによって、高い脱核率を得ることが期待されたが、ディスク法とほぼ同程度の脱核率であった。この方

法の利点として、1) 接着性の強弱にかかわらず (脱落は関係ないので)、脱核を行うことができる。2) 容易にスケールアップができ、大量に脱核細胞を得ることができる。しかし、1) トリプシン処理直後に浮遊状態のまま細胞に遠心力を与えるために、ディスク法に比べて細胞が破裂しやすい、2) 脱核後シャーレに再度接着させる必要があり、その間に脱核細胞の生存に影響がでる、といった欠点がある。

現在、細胞融合には、主として、電気融合法²⁵⁾、センダイウイルス (HVJ) 法²⁶⁾、ポリエチレングリコール (PEG) 法²⁷⁾の3種類が知られている。脱核後の ES 細胞にどの方法で体細胞を融合させるかによっても、この2種類の脱核法の有効性が異なる。電気融合法の場合には、細胞懸濁液に電気をかける必要があり電気融合装置の構造上、重層遠心脱核法がより有効であろう。HVJ 融合法の場合は、浮遊状態より単層培養した細胞の方がより効率よく融合するとされているので、この場合はディスク法がより有効だろう。PEG 法の場合は、どちらの方法でも同じではないかと考えられる。

本研究において、ES 細胞を用いた脱核が十分可能であることが初めて示され、また2つの脱核法について比較検討がなされた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導・ご校閲を賜りました川崎医科大学学生化学教室湊川洋介教授に深甚なる謝意を表します。また実験の遂行にあたりご指導戴きました川崎医科大学学生化学教室刀柁重信助教授に感謝いたします。細胞を恵与して戴きました国立生理学研究所福井由宇子博士、実験にご協力戴きました国立成育医療センター四宮貴久博士、川崎医科大学 組織培養センター、生化学センターの方々に厚くお礼申し上げます。本研究の一部は第56回日本産科婦人科学中国・四国合同地方部会に於いて発表した。

文 献

- 1) 石渡 勇, 時枝由布子, 井口めぐみ, 玉川朝治, 石渡千恵子, 岡根夏美: ES 細胞を用いた再生医療の問題

点. 産婦人科の世界 55 : 145 - 155, 2003

- 2) Evans MJ, Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 : 154 - 156, 1981
- 3) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145 - 1147, 1998
- 4) Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N : Effects of eight growth factor on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Developmental Biology* 97 : 11307 - 11312, 2000
- 5) Wiles MV, Keller G : Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem cells in culture. *Development* 111 : 259 - 267, 1991
- 6) Biesecker LG, Emerson SG : Interleukin-6 is a component of human umbilical cord serum and stimulates hematopoiesis in embryonic stem cells in vitro. *Experimental Hematology* 21 : 774 - 778, 1993
- 7) Slager HG, Van Inzen W, Freund E, Van den Eijnden-Van Raaij AJ, Mummery CL : Transforming growth Factor- β in the early mouse embryo : Implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Developmental Genetics* 14 : 212 - 224, 1993
- 8) Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI : Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Developmental Biology* 168 : 342 - 357, 1995
- 9) Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold H-H, Hescheler J, Wobus AM : Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo : Developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Developmental Biology* 168 : 87 - 101, 1994
- 10) Carter SB : Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* : 261 - 264, 1967
- 11) Prescott DM, Myerson D, Wallace J : Enucleation of mammalian cell with cytochalasin B. *Experimental Cell Research* : 480 - 485, 1971
- 12) Veomett G, Prescott DM, Shay J, Porter KR : Reconstruction of mammalian cells from nuclear and cytoplasmic components separated by treatment with cytochalasin B. *Proc Nat Acad Sci* 71 : 1999 - 2002, 1974
- 13) Ege T, Ringertz NR : Viability of cells reconstituted by virus-induced fusion of minicells with anucleate cells. *Experimental Cell Research* 94 : 469 - 473, 1975
- 14) Wigler MH, Neugut AI, Weinstein IB : Enucleation of mammalian cells in suspension. *Methods Cell Biol* 14 : 87 - 93, 1976
- 15) Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams RL : Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Developmental Biology* 141 : 344 - 352, 1990
- 16) Solter D, Knowles BB : Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci* 75 : 5565 - 5569, 1978
- 17) Tada M, Takahara Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T : Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology* 11 : 1553 - 1558, 2001
- 18) Pells S, Di Domenico AI, Gallagher EJ, Mcwhir J : Multipotentiality of neuronal cells after spontaneous fusion with embryonic stem cells and nuclear reprogramming in vitro. *Cloning and Stem cells* 4 : 331 - 338, 2002
- 19) Matveeva NM, Shilov AG, Kaftanovskaya EM, Maximovsky LP, Zhelezova AI, Golubitsa AN, Bayborodin SI, Fokina MM, Serov OL : In vitro and in vivo study of pluripotency in intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes. *Molecular Reproduction and Development* 50 : 128 - 138, 1998
- 20) Ege T, Hamberg H, Krondahl U, Ericsson J, Ringertz NR : Characterization of minicells (nuclei) obtained by cytochalasin enucleation. *Experimental Cell Research* 87 : 365 - 377, 1974
- 21) Ege T, Zeuthen J, Ringertz NR : Reactivation of chick erythrocyte nuclei after fusion with enucleated cells. *Somatic Cell Genetics* 1 : 65 - 80, 1975
- 22) Sanford JA, Stubblefield E : General protocol for micro-mediated chromosome transfer. *Somatic Cell Molecular Genetics* 13 : 279 - 284, 1987

- 23) Smith AG : Culture and differentiation of embryonic stem cells. J Tiss Cult Meth 13 : 89-94, 1991
- 24) Gopalakrishnan TV, Thompson EB : A method for enucleating cultured mammalian cells. Experimental Cell Research 96 : 435-439, 1975
- 25) Claude B, Justin T : Homokaryon production by electrofusion : A convenient way to produce a large number of viable mammalian fused cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 114 : 663-669, 1983
- 26) 岡田善雄 : 細胞融合と細胞工学. 「ヘテロカリオンの形成」第1版. 東京, 講談社サイエンティフィク. 1976, pp 51-54
- 27) Davidson RL, Gerald PS : Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol. Somatic Cell Genetics 2 : 165-176, 1976