

# 鶏窓開け卵を用いたキメラ作成時において、胚盤葉細胞を移植された卵の孵化率に及ぼす要因

大原睦生・森寄七徳・宝寄山裕直・杉本亘之

北海道立滝川畜産試験場，滝川市 073

(1994. 1. 28 受理)

キーワード：鶏，窓開け卵，キメラ，胚盤葉細胞，孵化率

## 要 約

鶏窓開け卵を用いたキメラ作成時において、胚盤葉細胞を移植された卵の孵化率に及ぼす要因について検討した。

解離した上胚盤葉細胞を移植したとき孵化率は16.7%であり、胚盤葉全体の細胞を解離して移植したときの0%よりは高い孵化率であった。

細胞を移植し、その後12℃で貯卵したところ、貯卵0, 3および4日間の孵化率はそれぞれ12.5, 26.3および19.2%となり、貯卵しなかった場合に比較し、4日間までの貯卵による孵化率の低下は認められなかった。

胚盤に対して、細胞を注入する針の角度が直角のとき孵化率は28.6%、傾斜して角度があると15.4%であった。

上胚盤葉細胞を移植したところ、142個の受精卵から孵化21日目の2羽の羽色キメラ胚が得られた。これら胚の羽毛は白色レグホーンと横斑プリマスロックに由来することを示す、白色と黒色の羽毛から構成されていた。

## 緒 言

鶏において、最近、凍結精液の保存技術はほぼ目的とした水準に到達し(大原ら：1990 A)、実用化への展望がひらけてきたが(大原ら：1990 B)、他の家畜にみられるような胚の凍結保存などの操作技術は未だ確立されていないのが現状である。鶏の受精卵

には大量の卵黄が存在し、産卵時には胚が数千の細胞に分裂しているなどの特徴があるため、鶏胚の操作は哺乳類胚とは異なる技術体系で行う必要があり、胚の凍結保存などの鶏の胚操作に関する技術開発を進める必要があると考えられている。

この体系のひとつのポイントとなるものは細胞レベルにおける、胚操作技術を用いたキメラ鶏の作出であり、キメラ鶏を高率に作出する方法が開発されると、鶏の胚操作技術の用途は育種への応用等に大きく広がると考えられる(内藤：1992)。

キメラ鶏の作出に関してはMARZULLO(1970)およびPETITTE et al.(1990)が報告しているが、今回、効率的なキメラ作出方法を検討するため、鶏窓開け卵を用いたキメラ作成時において、胚盤葉細胞を移植された卵の孵化率に及ぼす要因について検討した。

## 実 験 方 法

### 1. 鶏胚盤葉細胞の解離

細胞の解離は概ね黒田(1974)の方法に準拠して横斑プリマスロック卵黄から分離した胚を上胚盤葉および下胚盤葉に分離した。上胚盤葉、または下胚盤葉をメディアウムに入った試験管に移し、解離させ、注入移植に用いた。

### 2. 蓋用卵殻の準備

窓開け卵の蓋に用いる蓋用の卵殻を一边7.5mmの正方形に技工および治療用マイクロモーター(東京歯科産業株式会社)で切断し、使用した。

Factors Affecting the Hatchability of Chimeric Chicks Produced by Blastodermal Cells Transfere on Windowed Eggs: Mutsuo OHARA, Shichinori MORISAKI, Hironao HOUKIYAMA and Nobuyuki SUGIMOTO (TAKIKAWA Animal Husbandry Experiment Station of HOKKAIDO, Takikawa-shi 073)

### 3. 窓開け卵への解離胚盤用細胞の移植

窓開け卵への移植は白色レグホーンの受精卵卵殻を1辺8mmの正方形に技工および治療用マイクロモーターで切断し、卵殻を除去し、卵殻膜と卵殻を液状瞬間接着剤で接着した後、卵殻膜を切断(1辺6mm)除去し、先の解離細胞懸濁液2~4 $\mu$ lを受精卵の胚盤葉に注入した。注入の後、先の蓋用卵殻をゼリー状瞬間接着剤で接着し、孵卵器に入れ孵卵した。孵卵中の生存率は7日目、14日目に検査した。

### 4. 実験計画

実験設計については表1に示した。統計的検定は田口(1977)の方法に基づいて行った。

表1. 実験計画

実験1. 移植した細胞が胚の生存性に及ぼす影響	移植した細胞：上胚盤葉および下胚盤葉細胞	処理卵数	87
実験2. 細胞移植後の貯卵期間が胚の生存性に及ぼす影響	移植した細胞：上胚盤葉細胞	処理卵数	61
実験3. 細胞移植用注入針の角度が胚の生存性に及ぼす影響	移植した細胞：上胚盤葉細胞	処理卵数	48
実験4. 羽色キメラ胚の発生	移植した細胞：上胚盤葉細胞	処理卵数	142

### 結果および考察

実験1：上胚盤葉細胞または上および下胚盤葉細胞を移植したとき、それぞれの細胞が生存率および孵化率に及ぼす影響を検討した結果を表2に示した。上胚盤葉細胞を移植したところ、孵卵14日目の生存率は20.8%、孵化率では16.7%であった。上胚盤葉細胞および下胚盤葉細胞を移植したときの孵卵14日

表2. 移植した細胞が胚の生存性に及ぼす影響

移植した細胞	処理卵数	孵卵14日目生存率(%)	孵化率(%)
上胚盤葉	48	20.8	16.7a
上胚盤葉+下胚盤葉	39	10.3	0b

異なる文字を付けた数値の間で有意差 (P<0.05)

目の生存率は10.3%、孵化率は0%であった。上胚盤葉細胞を移植した場合、上胚盤葉および下胚盤葉を移植したときに比較して、有意に高い孵化率(p<0.05)を示した。

実験2：胚盤葉細胞を注入移植した卵を貯蔵(以下、貯卵と略)出来ると、雛の発生時期を揃えることなどが可能となる。これにより、育種に応用するときの雛の管理およびワクチンの接種などが容易になり、利用範囲が広がると考えられる。そこで、細胞移植後の貯卵が生存性に及ぼす影響を検討した。

細胞を移植した後12℃、湿度75%で貯卵した。孵卵14日目の生存率は、表3に示したように、移植当日の孵卵開始(貯卵0日間)で25.0%、貯卵3日間では26.3%および貯卵4日間で38.5%であった。孵化率は表3に示したように、貯卵0日間では12.5%貯卵3日間では26.3%および貯卵4日間で19.2%であった。細胞移植後4日間の貯卵しても、貯卵せずに移植当日から孵卵を開始した場合に比較して、孵化率の低下は認められなかった。このことから、窓開け卵を用いたキメラ鶏の作出において、貯卵が可能であると考えられた。

表3. 細胞移植後の貯卵が胚の生存性に及ぼす影響

貯卵日数	処理卵数	孵卵14日目生存率(%)	孵化率(%)
0	16	25.0	12.5
3	19	26.3	26.3
4	26	38.5	19.2

実験3：卵を1時間以上横向きに置くことで、胚盤は上の方に向くが、窓を開けた直下に位置するとは限らない。窓開け卵の胚盤に解離細胞を注入する際、注入針の角度が孵化率に及ぼす影響を検討した結果を表4に示した。注入針の角度が胚盤に対して、直角のとき孵化率は28.6%であり、一方、注入針が胚盤に対して角度があるとき15.4%であった。孵卵14日目までの生存率は同様に、直角のとき28.6%、

表4. 細胞移植用注入針の角度が胚の生存性に及ぼす影響

胚盤に対する角度	処理卵数	孵卵14日目生存率(%)	孵化率(%)
直角	35	28.6	28.6
傾斜	13	15.4	15.4

傾斜しているとき 15.4% であった。したがって、窓の直下に胚盤がくるように条件を整えることが重要と思われた。

実験 4：上胚盤葉細胞を移植した結果、142 の受精卵から孵化 21 日目に HAMBERGER and HAMILTON (1951) の発生段階 44 から 45 と考えられる 2 羽の羽色キメラ胚が得られた。これらのキメラ胚は頸部、背部に横斑プリマスロック由来の黒色の羽毛が認められた。黒色の羽毛の出現部位は山川ら (1990)、PETITTE and ETCHES (1988) および PETITTE et al. (1990) の報告とはほぼ一致し、今回の実験においても、以前の研究報告にみられるのと同様に、色素細胞は胚全体に分布したと考えられる。

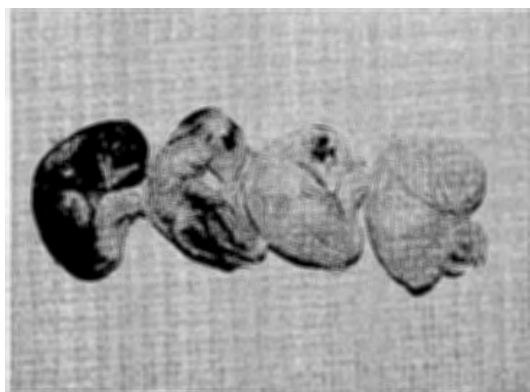


図 1. 孵卵 21 日のキメラ胚

中央 2 羽は白色レグホーン胚盤に横斑プリマスロック上胚盤葉細胞を注入した結果のキメラ胚で、横斑プリマスロック由来の黒色の羽毛と白色レグホーン由来の白色の羽毛が認められる。左側の胚は横斑プリマスロック胚、右側の胚は白色レグホーン胚である。

今回の実験では、胚盤葉細胞を注入した受精卵の生存率および孵化率を向上させる条件のいくつかが明らかとなった。しかし、羽色キメラ胚は得られたが、羽色キメラ鶏の孵化はみられなかった点が問題点として残された。

今後、注入方法などの物理的手段の改善と併せて、注入移植される細胞の発育ステージの検討などが必要と考えられる。

## 謝 辞

本研究の一部は財団法人伊藤記念財団の研究助成金によって遂行されました。ここに付記し、同財団に深甚な謝意を表します。

## 文 献

- HAMBERGER, V., and HAMILTON, H. L., (1951) A studies of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphology*, 88: 49-92.
- 黒田行昭, (1974) 動物細胞培養法. 初版. 95-118. 共立出版株式会社. 東京都.
- MARZULLO, G., (1970) Production of chick chimaeras. *Nature*, 225: 72-73.
- 内藤 充, (1992) ニワトリ受精卵(胚)の体外培養と初期胚操作. *動物血液型蛋白多型研究会誌*, 20: 1-13.
- 大原陸生・小関忠雄・田村千秋・高橋 武・草刈直仁, (1990) Hiroshima 希釈液を用いて凍結した鶏精液の注入量及び融解後の再々希釈希釈倍率が受精率に及ぼす影響. *家禽会誌*, 27: 403-408.
- 大原陸生・小関忠雄・田村千秋・高橋 武・草刈直仁, (1990) 雄鶏個体別凍結精液の受精率並びに 7 日間隔で 4 回人工授精した時の凍結精液の受精率. *家禽会誌*, 27: 398-402.
- PETITTE, J. N., and ETCHES, R. J., (1988) The production of chimeric chicks by embryonic cell transfer. *Poultry Sci.*, 67: 137.
- PETITTE, J. N., CLARK, M. E., LIU, G., VERRINDER GBBINS, A. M., and ETCHES, R. J., (1990) Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*, 108: 185-189.
- 田口玄一, (1977) 実験計画法. 第三版. 737-744. 丸善株式会社. 東京.
- 山川好樹・増田 圭・前田照夫・寺田隆登, (1990) 窓開け卵を用いた鶏キメラ作製法について. *家禽会誌*, 27: 436.