

卵白の交換培養とニワトリ胚の発育

寺井明喜子・八木 康一・市川 舜

酪農学園大学, 江別市 069

Culture and development of chick embryo in exchanged albumen

Akiko TERAJ, Koichi YAGI and Shun ICHIKAWA

Rakuno Gakuen University, Ebetsu-shi 069

キーワード : 卵白, 培養操作, ニワトリ胚, 生存率, 発育

Key words : albumen, culture manipulation, chick embryo, viability, development.

要 約

産卵直後の胚および産卵後 72 時間孵卵した胚を用いたニワトリ胚の体外培養法の際に、卵白交換が胚の生存率および孵化率ならびに雛の活力に与える影響について検討した。

交換卵白は a) 横斑プリマスロック, b) 烏骨鶏, c) ウズラと d) 白色レグホーン (対照) の 4 種類を用いた。白色レグホーンの産卵直後の胚または孵卵 72 時間の胚のそれぞれ培養 21 日目までの生存率と孵化率を観察した結果, 他の異品種, あるいは異属間のいずれの卵白交換においても, 培養可能であったがウズラ卵白へ交換した場合は孵化に至らなかった。

産卵直後の受精卵を移し替えて培養したときの孵化率は 1-a (12.5%), 1-b (5.5%), 1-c (0%) および 1-d (21%), また孵卵 72 時間に胚を移し替えた時の孵化率は 2-a (31.2%), 2-b (18.7%), 2-c (0%) および 2-d (43.7%) となり発生が進んでからの操作の方が, 高い孵化率を示した。しかし, どちらの培養でも孵化した雛の体重は操作しない雛より軽く, 雛の活力は低かった。

緒 言

鳥類胚は卵内部に貯えられる栄養分によって母体とは独立して発育孵化に至ることから, 哺乳類の体外培養とは異なる培養技術が必要とされる。ニワトリの受精卵の体外培養技術が PERRY (1988) によって開発されて以来, わが国でも内藤 (1991), 葦澤ら (1992), 大原ら (1993) によってニワトリ胚あるいはウズラ胚の培養法, キメラニワトリの作出などの成果が報告されている。特に, 細胞レベルにおける胚操作技術やキメラニワトリを容易に作出する方法が開発されると,

これらの技術は育種への応用技術へと大きく広がるものと思われる。しかし, その現状は鳥類胚の培養技術が確立しておらず, その孵化率は 30 から 40% に留まっている。したがって, 胚培養の基礎技術の情報は十分とは言い難い。そこで, 体外培養胚の孵化に至るまでの機構の基礎的知見を得る目的で, 今回は産卵直後の胚と孵卵 72 時間目の胚を用い異品種ニワトリ卵白および, ウズラ卵白との卵白交換がその後の胚の生存率および孵化率に及ぼす影響について検討した。

材料と実験方法

1. 供試受精卵

供試した受精卵は自然交配した白色レグホーンから採取した。実験 1 は産卵直後の発生段階 1~2 の胚盤葉期 (HAMBERGER and HAMILTON : 1951) の胚, 実験 2 では産卵後 72 時間常法により孵卵した発生段階 19 (HAMBERGER and HAMILTON : 1951) の胚を培養に供した。

2. 培養器として用いる卵殻の準備

培養器用の卵殻には 1. で用いた受精卵よりも 20~30 g 重い卵を選び, あらかじめよく卵殻面を清拭し, 卵の鈍端部に直径約 3.5~4.0 cm の窓を開け, 卵内容物を除き, 再度卵殻を洗浄して用いた。

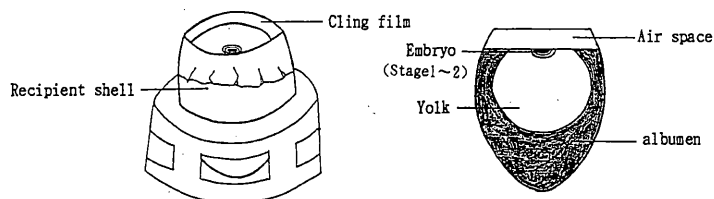
3. 交換用卵白の準備

培養時の卵白交換には a) 横斑プリマスロック (BPR), b) 烏骨鶏 (SF), c) ウズラ (JQ) と d) 白色レグホーン (WL : 対照) の 4 種類の卵白を用いた。これらはクリーンベンチ内であらかじめ各々の卵内容物から卵黄を除去し, その都度, 新鮮なものを準備した。

4. 培養器用卵殻への胚の移し替え操作

受精卵を割卵し, 卵白を除去した卵黄は, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で軽く洗浄し, 3. で準備した交換用卵白を添加した後, 2. で準備した培養器用の

Experiment 1 : Freshly laid eggs



Experiment 2 : Eggs incubated for 3 days

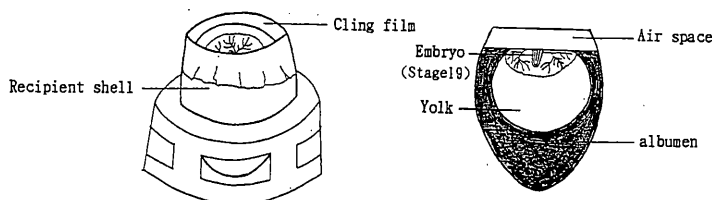


Fig. 1 Culture system for the chick embryo

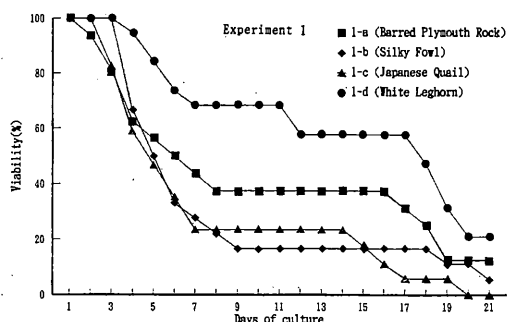


Fig. 2 Viability of embryo in exchanged albumen. Albumen of fertilized eggs at stage 1~2 (Hamburger & Hamilton; 1951) were exchanged for that of Barred Plymouth Rock, Silky Fowl, Japanese Quail, and White Leghorn.

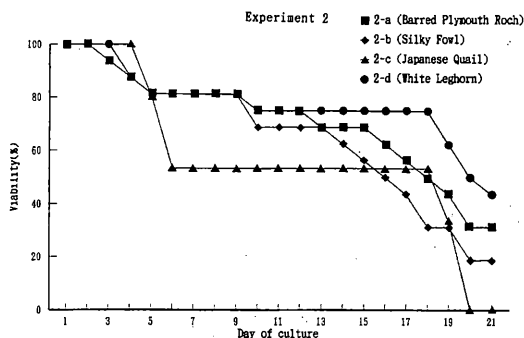


Fig. 3 Viability of embryo in exchanged albumen. Albumen of incubating embryo at stage 19 (Hamburger & Hamilton; 1951) were exchanged for that of Barred Plymouth Rock, Silky Fowl, Japanese Quail, and White Leghorn.

卵殻にそれらを移し替え、すみやかに卵殻の窓をラップで密封した。

5. 培養方法

実験1および実験2の培養方法をFig.1に示した。

いずれの実験においても、受精卵の卵黄と添加卵白を培養器用の卵殻に移し替え、ラップで密封後立体孵卵器で温度37.8℃、湿度60%、転卵角度45度の条件で培養した。

なお、実験1, 2の各々を1-a(BPR), 2-a(BRP), 1-b(SF), 2-b(SF), 1-c(JQ), 2-c(JQ)と1-d(WL), 2-d(WL)と区分した。なお、供試卵数は合計266個でそれぞれの胚の発生過程について記録した。

結果および考察

実験1：産卵直後の胚を用いての卵白交換培養は培養4日目から6日目において胚の生存率はFig.2に示すようにa), b), c)およびd)のいずれも急激に低

下した。これらの死亡原因は培養1日から6日目における発生途上胚では原基の確立と急速な組織の形成が始まる時期で、培養操作による卵内環境の変化が生存に影響したものと思われた。しかし、生存胚は培養8日目から17日目頃までは正常な胚発生の経過が観察され、ウズラ卵白以外の生存率は比較的安定して経過し、Fig.4に示すように正常に孵化した。また孵化率は1-a (12.5%), 1-b (5.5%), 1-c (0%)と1-d (21%)であった。

実験2：Fig.3に示したように孵卵72時間目胚を用いた卵白交換培養では培養4日目から6日目にやはり发育途上の胚死亡が多く現れたが、培養10日目前後頃の生存率は2-a (75%), 2-b (68.7%), 2-c (53.3%)と2-d (75%)となり良好な経過を示し、胚の发育は比較的正常に進んだ。しかし培養後期18日目から21日目に再び生存率の低下が見られた。18から21日目の低下は肺呼吸への移行期など发育過程の複雑な変化が

影響したものと考えられる。実験2は実験1に比べいずれの時期も生存率は比較的に良好な経過であった。これらの結果は移し替え操作時に、胚の発生の原基形成が整い、また發育速度の旺盛な時期に入っていることが要因と思われた。また実験2の孵化率は2-a(31.2%)、2-b(18.7%)、2-C(0%)と2-d(43.7%)であった。

実験1、2の、各々の種類の異なる卵白を交換した時の生存率を比較すると、特にBRPとWL(対照)の卵白を用いたものは、SF、JQに比べ培養11日目には1-a(37.5%)、2-a(75.0%)、1-d(68.4%)、2-d(75.0%)と良い経過を示した。同様に、培養19日目においても1-d(31.5%)、2-d(62.5%)と比較的良好な生存率を示した。しかしウズラ卵白を用いた培養胚は他の卵白を交換したものに比べ鶏胚の成長に著しい遅延が見られ、特に培養後期にかけて死亡胚が多く観察され孵化したものはなかった。これらの結果は鳥類の卵白は水分と微量であるが多くの種類の物質が、胚発生の組織の形成から孵化に至るまでの過程において、重要な要因を占めているものと思われた。今回ウズラ卵白を用いた培養では実験1、2共に培養20日目まで生存したが孵化には至らなかった。しかし、異品種のニワトリ卵白を用いた培養では卵白を全て交換しても胚の成長が良好に経過した事から異品種の卵白でも培養が可能な事が示された。これらの結果は内藤(1991)、葦澤ら(1992)の報告と一致するものと思われた。また、今回の実験から産卵後の胚の移し替えと卵白の交換によって、Fig. 4に示したように雛は正常に孵化した。しかしこれらの培養方法で孵化した雛は通常に孵卵した雛(生時体重、約40.6g)よりも約10g程度小さく、また活力がわずかに劣るように思われた。

以上のような結果から、培養操作時に用いる卵白が異品種間と異属間との間で完全に卵内の卵白を交換した場合、いずれも胚の発生が進むことが認められた。しかし、同種間の卵白交換では孵化に至ることが認められたが、属間のウズラ卵白では孵化した雛を得るこ

とはできなかった。また、産卵後72時間孵卵後の卵を体外培養したときの方が産卵直後移し替えたものよりも胚の生存率、孵化率とも高かった。

今後、キメラニワトリの作出や遺伝子導入技術の開発の際、胚の生存率、孵化率を向上させるために、移し替えの時期や卵白の種類等の影響について、さらに基礎的な知見を得る必要性が考えられた。

文 献

- B. E. DUNN and M. A. BOONE (1976) Growth of the chick embryo in vitro. *Poultry Sci.*, **55**: 1067-1071.
- 後藤和文・高橋陽子・中西喜彦・小川清彦 (1988) 鶏受精卵の卵殻外発生. *家禽会誌*, **25**: 27-33
- HAMBURGER, V., and H. L. HAMILTON (1951) A studies of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphology*, **88**: 49-92.
- H. R. Wilson (1991) *Avian Incubation*. Butterworth-Heinemann, US, Massachusetts: 280
- M. M. PERRY (1988) A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, **331**: 70-72.
- 三浦克洋・末吉益雄・神部昌行・岡 基 (1991) アヒル卵殻を用いた鶏胚の培養. *Exp. Anim*, **40**: 251-254.
- 内藤 充 (1991) ニワトリ受精卵(胚)の体外培養法. *細胞工学*, **10**: 501-506.
- 葦澤圭二郎・内藤 充・大石孝雄 (1992) ウズラ初期胚のニワトリ卵殻を用いた培養. *家禽会誌*, **29**: 139-144.
- 大原陸生・森寄七徳・宝寄山裕直・杉本亘之 (1994) 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. *北畜会報*, **36**: 49-51.
- 高橋陽子・後藤和文・田原みさ・中西喜彦・小川清彦 (1988) 鶏受精卵の七面鳥卵殻における発生. *畜産の研究*, **42**: 749-750.
- 寺井明喜子・森津康喜・市川 舜 (1993) 卵殻を用いた鶏胚培養法の検討. 第49回北畜会大会, (講演要旨), **22**.
- 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.



Fig. 4 Hatching of the chick embryo cultured in exchanged albumen.