

## キメラニワトリ胚の作成時における胚盤葉細胞の移植法の検討

寺井明喜子・盛田 フミ・森津 康喜・市川 舜

酪農学園大学, 江別市 069

Investigation of transfer methods of blastodermal cells  
in production of chimeric chick embryos.

Akiko TERAI, Fumi MORITA, Yasuyoshi MORITSU and Shun ICHIKAWA

Rakuno Gakuen University, Ebetsu-shi 069

キーワード: ニワトリ胚, 胚盤葉細胞, 羽毛キメラ, 胚操作

Key words: chick embryo, blastodermal cells, plumage chimeras, embryo manipulation.

## 要 約

キメラニワトリ胚作成時において胚盤葉細胞の移植法が胚の生存率, 孵化率におよぼす影響について検討した。

体細胞レベルのマーカースとしてドナー卵に胚のとき黒色羽毛を有する横斑プリマスロック種, ホスト卵には白色レグホーン種の受精卵を用いた。

ホスト卵の胚盤にドナー卵の上層胚盤葉細胞を注入した時, 培養6日目の生存率は67.5%, 上層および下層胚盤葉細胞を注入した時は39.6%, 培養15日目では26.3%と9.4%の値を示した。しかし孵化率は14.4%と0%となりキメラ作成のための胚盤葉細胞の注入移植には上層胚盤葉細胞を注入した方が生存率, 孵化率共に良好であった。

さらに細胞移植操作において穿針(ガラス針)の角度が胚に与える影響を見たところ培養6日目の生存率は, 穿針の角度が胚盤に対して直角(約90度)のとき62.5%, 傾斜(約45度)では36.8%, 対照卵(移し替えのみ以下, 無処理)は84.8%であった。孵化率は直角の穿針を用いたとき20%, 傾斜のもの7.8%, 対照は48.4%となり胚盤葉細胞移植注入操作には直角に穿針を注入したものが生存率, 孵化率共に良好であった。

この上層胚盤葉細胞の移植注入により2例の羽毛キメラ胚が得られた。これらのキメラ胚には頭部, 首部和背部にドナー細胞の横斑プリマスロック種由来の黒色羽毛が認められた。

## 緒 言

ニワトリの受精卵は卵内部に大量の卵黄, 卵白があり産卵時の胚盤にはすでに分裂が約60,000個の細胞

を有するまでに胚の発生は進んでいる。したがって鳥類の胚の操作には哺乳類とは異なった技術が必要である。近年, ニワトリの胚操作に関する研究が多数報告されているが遺伝子導入ニワトリの開発は実用化まで至っていない。この一つの方法として細胞レベルにおける胚操作技術を用いた生殖細胞キメラの作出により, 遺伝子導入ニワトリを容易に作製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, 現状では胚操作技術によるそれらの胚の発生率, 孵化率は低く, またキメラ胚培養の基礎技術の情報も十分とは言えない。

そこで今回は先報に引き続き培養胚の孵化の基礎技術と合わせてキメラニワトリの作出を目的に胚盤葉細胞の注入する位置とその操作が培養胚の生存率, 孵化率に及ぼす影響について検討を試みた。

## 材料と方法

## 1, 供試受精卵

供試した受精卵はドナー卵として黒色拡散遺伝子(E/E)をもつ横斑プリマスロック種を用いた。この黒色羽毛は体細胞レベルでのマーカースとして利用した。またホスト受精卵には白色レグホーン種の放卵直後(発生ステージX, HAMBERGER and HAMILTON: 1951)の卵を用いた。

## 2, 胚盤葉細胞の採取

ドナー細胞を分離するための胚盤は放卵直後の受精卵(発生ステージX, HAMBERGER and HAMILTON: 1951)を用いた。胚盤はMEM溶液中で分離し, 0.05%のEDTAを用いて洗浄後, トリプシン(0.1%トリプシン/PBS(-)37°C, 10分)で処理した。その後, 10%ウシ胎児血清入りのMEMを加えて遠心(1,000 rpm, 10分)した後, 沈殿を血清を入れてないMEMに再浮遊させ移植用の胚盤葉細胞を作製した。

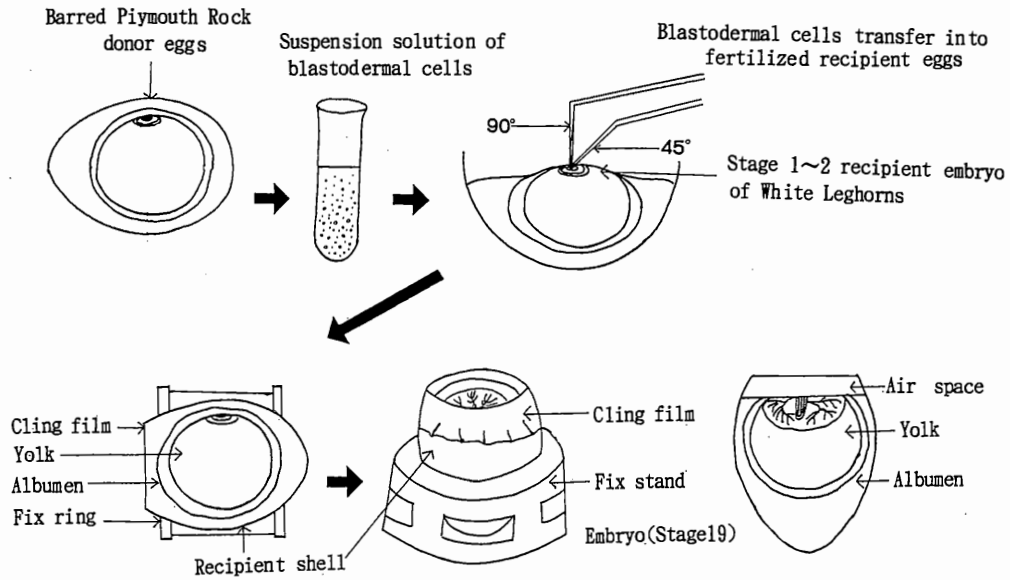


Figure 1. Manipulation system producing chimeric chicks by transfer of blastodermal cells.

### 3. 胚盤葉細胞の移植と培養法

先端の外径約 100  $\mu\text{m}$  のガラス針に 2 ~ 4  $\mu\text{l}$  胚盤葉細胞浮遊液を入れ、直ちに注入操作を行った。ガラス容器に移し、ホスト卵の胚盤葉下腔に以下のように注入細胞と注入方法を変え、生存率、孵化率に与える影響を調べた。

### 4. 胚の培養法

注入移植する胚盤葉細胞は、上層胚盤葉細胞の場合と上層および下層胚盤葉細胞とに区分した。また、操作の胚盤葉細胞の注入時における穿針の角度を胚盤に対して直角（約 90 度）区と傾斜（約 45 度）区とに設定した。対照卵では移し替えのみ（以下、無処理）とした。注入後、培養器卵殻に移し替え 3 日間培養した。その後、あらかじめ準備した培養用の卵殻にそれらを移し替え速やかに卵殻の窓をラップで密封し、立体孵

卵器で温度 37.8℃、湿度 60%、角度 45 度 1 時間 1 回転卵で残りの 18 日間を培養した。供試卵数は合計 240 個を用い胚盤葉細胞由来と移植法の違いによる胚の発生過程、生存率について記録した。

### 結果および考察

放卵後の胚盤は胚盤葉上層と胚盤葉下層の 2 層に別れ構成されている。また、鳥類の始原生殖細胞は胚盤葉上層が起源とされている。そこでドナー卵細胞の的確かつ容易な採取操作法を考える時、上層胚盤葉細胞と、上層および下層胚盤葉細胞を注入移植した場合について、培養胚の生存率と孵化率におよぼす影響を比較検討した。

Figure 2, 由来を異にする細胞液移植後の胚の生存率を示した。培養 6 日目の生存率を見ると、上層胚盤

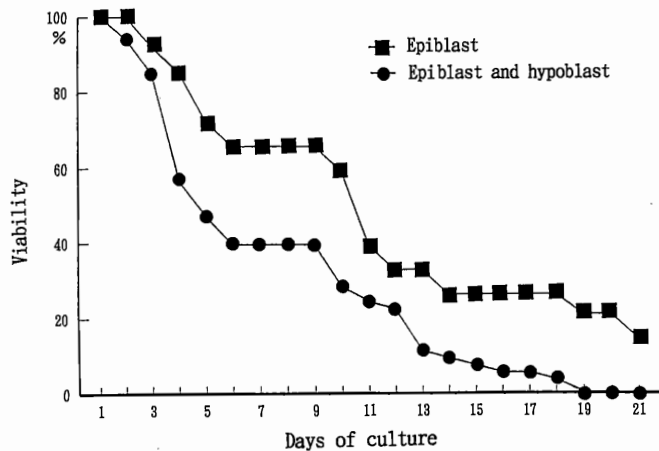


Figure 2. Viability of chick embryos by transfer of two types of blastodermal cells.

葉細胞を注入したものの65.7%，上層および下層胚盤葉細胞の注入では39.6%の値を示した。また15日目では、それぞれ26.3%と9.4%となり経過は上層胚盤葉細胞が上層および下層胚盤葉細胞を注入したものに比べて高い生存率を示した。更に孵化率では14.4%，0%とかなり低下したが、ここでも上層胚盤葉細胞の注入が良好であった。これらの経過から、注入するドナー細胞は上層胚盤葉細胞のみを注入した方が良いものと思われた。

細胞移植の際、胚盤への穿針操作はその後の胚の発生に与える影響が大きいとされている。そこで、今回は注入する細胞を宿主卵の胚盤葉下腔へよりの確に注入するために移植注入の際の角度を変え、それらの違いが生存率、孵化率におよぼす影響を検討した。なお、実験区は穿針の角度は注入する宿主卵胚盤葉に対し直角(約90度)と傾斜(約45度)、対照の3区を設定した。

その結果をFigure3に示した。培養3日目の胚の発生は対照、続いて穿針の角度が胚盤に対して直角なものの方が良好な経過であった。また、培養6日目の生存率は穿針が直角なもの62.5%、傾斜36.8%と対照84.8%のとなり、また孵化率では対照区が50%胚盤に対して直角20%、傾斜7.8%を示した。したがって胚盤への穿針角度は直角に注入したものが比較的良好な生存率、孵化率が得られた。しかし、以上の過程で発生を中止した胚の多くは直角、傾斜のいずれの場合も培養、5日～6日目に増加し、生存率の急激な低下が見られた。これらの経過からニワトリ胚の胚盤への穿針による生存率に及ぼす影響は培養6日目までの胚に多くみられた。また細胞注入の際は穿針を宿主卵の胚盤中央に直角に注入することが望ましいと思われた。

### 体細胞キメラの出現頻度

上層胚盤葉細胞を移植した76個の受精卵から羽毛

の色が確認できるまで发育した20胚のうち2羽がHAMBERGER and HAMILTON (1951)の発生段階43から45にまで至り、羽毛キメラであった。またこれら2例の羽毛キメラ胚は頭部から首部にかけてと背部に横斑プリマスロック由来の黒色羽毛が認められた(Figure4)。これらの結果からドナー卵細胞由来の羽毛の発現部位はPETITTE (1988)、山川ら(1990)の報告と一致しているものと思われた。今回は羽毛の発現に注目したが、ドナー卵の色素細胞は羽毛に限らず胚の各所に分布しているものと思われ、羽毛にキメリズムが出現しなかった個体中にもキメラ個体が含まれる可能性があるため、隠れたキメリズムを明らかにする方法なども今後検討する必要がある。

今回の実験からキメラニワトリ作成時における細胞移植操作の際の穿針の角度、また注入する胚盤葉細胞の位置によって、培養胚の生存率に差が見られ、これらの操作が培養胚に影響をおよぼす結果が示された。また、ドナー細胞を注入した2例の体細胞、羽色キメラ胚が得られた。しかし、これらの羽色キメラニワトリは正常な孵化には至らず、先報と同様にここでも特に培養19日目～21日目の孵化直前、孵化直後に死亡した。これらは胚が漿尿膜を通した呼吸から肺呼吸に移り変わる時期と考えられた。

今後、体細胞羽色キメラニワトリの孵化とキメラ率の向上に向けて、注入操作技術と細胞注入される胚のステージ、胚盤葉細胞移植における羽色の発現部位の分布などの詳細な検討が必要と思われた。

### 文 献

- DUNN, B.E. and M.A. BOONE (1976) Growth of the chick embryo in vitro. *Poultry Sci.*, **55**: 1067-1071.
- HAMBURGER, V. and H.L. HAMILTON. (1951) A studies of normal stage in the development of the

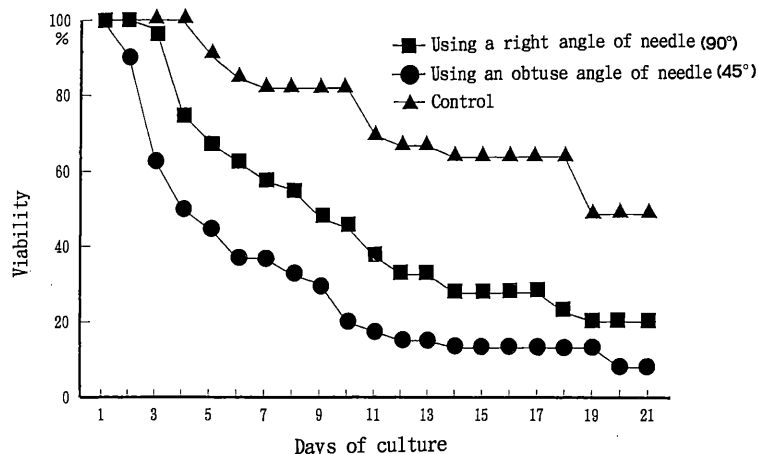


Figure3. Viability of chick embryos are treated by using the two types of injection needles.



Figure4. The chimeric chick embryos were cultured for 19 day. The center is chimeric chick embryo that is produced by epiblast cells of Barred Plymouth Rocks transferred into blastodermal of White Leghorns are recognized on the chimeric chick embryo. The right chick embryo Barred Plymouth Rocks. The left chick embryo is White Leghorns.

- chick embryo. *J. Morphology*, **88**: 49-92.
- MARZULLO, G. (1970) Production of chick chimeras. *Nature*, **255**: 72-73.
- 松谷 豊 (1993) 動物細胞培養入門. 初版. 74-88. 学会出版センター. 東京.
- 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.
- PERRY, M.M. (1988) A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, **331**: 70-72.
- 大原陸生・森寄七徳・宝寄山裕直・杉山恒之 (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およぼす要因. *北畜会報*, **36**: 49-51.
- 大塚勝正・木野勝敏・太田元好・餅井 真・阿形清和・江口吾朗(1991) ニワトリキメラの作成, *細胞工学*, **10**: 513-518.
- PETITTE, J.N. and R.J. ETCHES. (1988) The production of chimeric chicks by embryo cell transfer. *Poultry Sci.*, **67**: 137.
- PETITTE, J.N, M. CLARK, E. LIU, G. VERRINDER, A. M. GBBINS, and R.J. ETCHES. (1990) Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*, **108**: 185-189.
- THORAVAL, P., F. LASSERRE, F. COUDERT and G. DAMBRINE (1994) Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white leghorns by transfer of early blastodermal cells. *Poultry Science*, **73**: 1897-1905.
- 寺井明喜子・八木康一・市川 舜 (1996) 卵白の交換培養とニワトリの発育. *北畜会報*, **38**: 109-111.
- 渡辺美穂・絹谷政江 (1991) ニワトリウズラ胚盤葉キメラ. *細胞工学*, **10**: 519-525.
- 山川良樹・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.