

## キメラニワトリ作出における胚培養および細胞注入法の検討

寺井明喜子・市川 舜・森津 康喜  
酪農学園大学, 江別市 069

Investigation of injection methods of blastodermal cells and culture of chick embryo in production of chimeric chick embryos.

Akiko TERAJI, Shun ICHIKAWA and Yasuyoshi MORITSU

Rakuno Gakuen University, Ebetu-shi 069

キーワード: ニワトリ胚操作, 胚盤葉細胞, 注入法, 羽毛色キメラ

Key words: chick embryo manipulation, blastodermal cells, injection method, pulmage cell chimeras

### 要 約

胚盤葉細胞の移植操作による羽毛色キメラの発現率におよぼす細胞注入方法の効果の検討と併せて培養初期胚の生存率の向上を試みた。ホスト卵に白色レグホーン種, ドナー卵には胚, または雛の時に黒色羽毛を有する横斑プリマスロック種(略語 BPR)の受精卵を用い, 体細胞レベルのマーカースとした。培養初期胚に及ぼす転卵回数増加の効果を検討した。培養3日目の生存率は, 1回/10 min 転卵(方法1)では97.3%, 1回/1 hr 転卵(方法2)では82.0%を示し, 有意な差はないものの転卵回数を増やした方法1が高い生存率を示した。また培養中の移し替え操作の妨げとなる胚と卵殻の癒着率は, 方法1で2.6%, 方法2では37.1%で有意な差が認められた( $P < 0.05$ )。転卵回数が多い方法1では胚の発育遅延, 形成不全がみられなかった。転卵回数を増すことで胚の移し替え操作時におこる卵殻と胚の癒着が防止され, 培養初期の生存率に向上が見られた。キメラ作出のためにホスト卵の胚盤にドナー卵の胚盤葉細胞を注入し培養した。注入操作には, 細胞注入のみを行う方法, ホスト卵の胚盤の一部を抜き取った後ドナー細胞を注入する方法を採用した。羽毛色キメラ胚の出現頻度は細胞注入のみを行った胚で14.3%, 抜き取り後注入した胚では33.3%となり, 明らかな差はないものの胚盤葉細胞を抜き取り後注入したものの方が高かった。注入のみおよび, 抜き取り操作後注入したものともにBPR由来の黒色羽毛の発現部位を頭部に有するキメラ胚が多く認められたが, それ以外の部位における黒羽毛発現に特定の傾向は認められなかった。

### 緒 言

鳥類は初期胚の発生が卵黄上で進み, 卵管内で卵形成を完了し体外へ放卵された時には胚盤葉はある程度の細胞分化をしている(内藤, 1991)。また卵内に存在する卵黄, 卵白の物質代謝によって, 母体とは独立した卵殻内で胚発生が進行し孵化に至る特徴がある。遺伝子組み換えニワトリを作成すること(阿形, 1991)を目標にすでにニワトリ胚操作に関する研究分野において細胞レベルのキメラニワトリの作出(MARZULLO, 1970 PETITTE and ETCTTES, 1988)が進められている。近年, ニワトリ始原生殖細胞は胚盤葉中央部にその発生起源を持つことが報告されるなど(鏡味, 1997), 胚操作技術の向上による高率的なキメラニワトリの作出が求められている。

そこで今回, 先報(寺井, 1997)に引き続きキメラニワトリ作出のために移植胚の生存率向上を目的とした基礎技術の改善を試みた。さらに, キメラ個体作出率の向上を目的に, ホスト卵の胚盤葉細胞の一部を抜き取った後, ドナー細胞の注入を行い, キメラ個体形成率について従来の方法と比較した。また, 得られたキメラ個体についてドナー細胞由来の羽毛色の発現部位について検討した。

### 材料と方法

#### 1. 供試受精卵

キメラニワトリ作成のための供試受精卵はホスト卵に白色レグホーン種の放卵直後の卵(発生ステージX, HAMBERGER and HAMILTON: 1951) 121個を用い, ドナー卵には黒色拡散遺伝子型(E/E)を有する横斑プリマスロック種(略語 BPR)を用いた。黒色拡散遺伝子は優性遺伝子で発育中の胚を黒色羽毛とすること

から体細胞レベルのマーカーとした。

## 2. 移植する胚盤葉細胞の採取方法

放卵直後の横斑プリマスロック受精卵（発生ステージX）の胚盤葉からドナー細胞を採取した。胚盤葉はMEM溶液中で卵黄から分離し、0.05%のEDTA（PBS（-））で洗浄後、トリプシン（0.1%トリプシン/PBS（-）, 37℃, 10分）で処理した。その後、10%ウシ胎児血清を含むMEMを加えて遠心（1,000 rpm, 10分）した後、沈殿した細胞を血清を含まないMEMに再浮遊させ移植用の胚盤葉細胞とした（Figure 1, a）。

## 3. 胚盤葉細胞の注入操作

胚盤葉細胞の移植には先端外径約100 μmのガラス針に胚盤葉細胞浮遊液を2～5 μl（約500細胞）吸引

し、先報（寺井, 1997）に従い細胞移植操作は宿主卵胚盤の中央部に針を直角に穿針し細胞注入する方法を採用した。また本実験では細胞注入のみを行う方法の他に、ドナー細胞の注入前に宿主卵胚盤葉の中央部に穿針しあらかじめ細胞の一部（約700細胞）を吸引して抜き取り、その後ドナー細胞を注入する方法も用い、胚生存率と羽毛色キメラの発現率を比較した（Figure.1, b）。

## 4. 注入操作後の培養法と転卵操作

注入操作後の胚はあらかじめ用意した培養用卵殻（宿主受精卵とほぼ同等の重さの卵）に移し替えポリエチレン製ラップフィルムと保定リングで固定し37.8℃, 湿度60%で3日間培養した（Figure 1, c）。その後、準備しておいた別の培養器用の卵殻（宿主

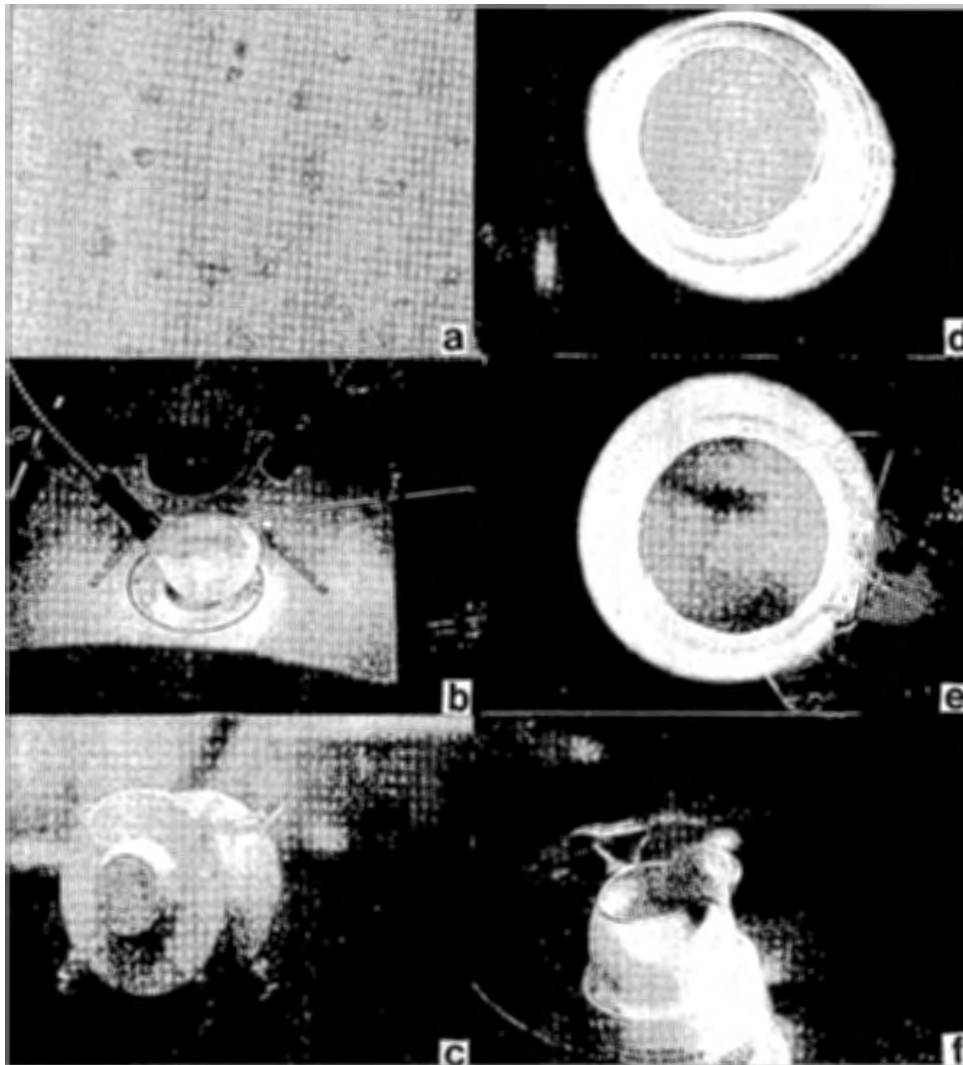


Figure.1 Manipulation system for producing chimeric chicks by transfer of blastodermal cells.

- a. Dissociated blastodermal cells.
- b. Injection of the blastodermal cells into fertilized egg.
- c. Culture system of chick embryo during first 3 days.
- d. Culture system of chick embryo re-transferred to new egg shell after 3-day culture.
- e. Chick embryo cultured for 15 days.
- f. Chick embryo cultured for 21 days.

受精卵よりも約 30 g 重い卵)に移し替え卵殻の窓をポリエチレン製ラップフィルムで密封し、立体孵卵器中(37.8℃, 湿度 60%)で 18 日間培養した (Figure.1, d, e, f)。初期培養時に卵殻と胚が癒着すると移し替え時に発達した血管の損傷, 卵黄の破損があり, その後の胚の不形成, 発育遅延を引き起こしやすい。その際卵殻と胚の癒着を防ぐために転卵回数の増加効果を検討した。なお実験には方法 1 は培養 3 日目まで 1 回/10 min 転卵するもの, また方法 2 では 1 回/1 hr 転卵するものとした。

## 結果および考察

### 1. 転卵回数の違いが初期胚の生存率に及ぼす影響

培養初期の胚の生存率は培養全期間を通じて生存率, および平均孵化率に大きく影響することから孵化率の改善のためには培養 3~6 日にかけての生存率を向上させることが望まれる。本実験ではまず培養初期の胚の正常発育, および移植操作の妨げとなる卵殻と胚の癒着の防止を目的に細胞移植注入後の初期 1~3 日目までの生存率に及ぼす転卵回数の増加の効果を検討した。

Figure.2 では転卵回数の違いによる培養初期胚の生存率を示した。培養操作した胚の死亡率が急激に増加する時期は培養 3~6 日目と 18~21 日目で, これらの時期は通常孵卵の場合と同じ傾向となった。培養 3 日目の生存率を見ると 1 回/10 min 転卵 (方法 1) では 97.3%, 1 回/1 hr 転卵 (方法 2) では 82.0%を示した。また移し替え操作後の培養 6 日目の胚生存率は方法 1 においては 78.9%, 方法 2 では 57.1%となり, 有意差はないものの転卵回数を増やした方法 1 の方が高い生存率を示した。4 日目以降は両方とも同様な生存率の推移を示したことから, 培養 3 日目までの転卵回数の増加が胚の生存率を向上させると考えられた。また移し替え操作の妨げとなる胚と卵殻の癒着率は, 方法 1 で 2.6%, 方法 2 では 37.1%で有意な差が認められた ( $P < 0.05$ )。転卵回数が多い方法 1 では胚の発育

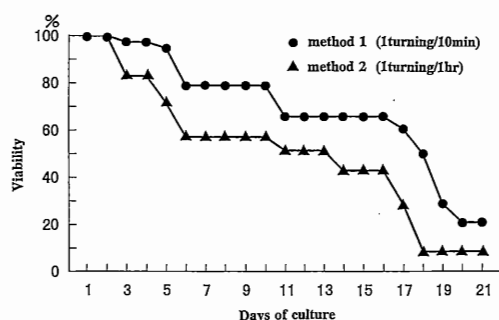


Figure.2 Viability of manipulated chick embryos cultured with different turning rates during first 3 days.

遅延, 形成不全がみられなかった。培養 3 日目の生存率低下がその後の平均孵化率に影響することから転卵回数の増加が卵殻と胚の癒着を防ぎ, 移し替え時の操作を容易にし, ひいては生存率の改善に効果をおよぼしたと考えられた。

### 2. 注入操作が胚生存率に及ぼす影響

キメラニワトリを作出する操作方法として, 今回はあらかじめ宿主卵の胚盤葉中央部の一部の細胞を抜き取りドナー細胞を注入する方法も採用し, 注入操作胚の生存率, および得られたキメラ胚における羽毛色キメラ率を検討した。なお対照として宿主卵にドナー細胞注入移植のみを行った胚を用いた。また前述の結果より注入操作後の培養時転卵回数は 1 回/10 min とした。

細胞注入操作を行った胚の生存率の推移を Figure.3 に示した。培養 6 日目の生存率は注入のみを行ったもので 92.0%であったのに対して, 抜き取り操作後に注入したものでは 73.9%と若干低下を示した。培養 6 日目以降の生存率の推移は同様であったことから, 抜き取り操作の生存率への影響は培養 3~5 日目で大きいものと考えられた。また培養の 12 日目にはそれぞれ 84.2%と 65.2%となり有意差はないものの胚の生存率は注入操作のみを行った胚で培養期間中良好であった。抜き取り操作後細胞注入した胚では培養 3~5 日目に発育遅延, 胚の眼球形成不良あるいは卵黄の破損などが観察された。細胞移植の際の胚盤への穿針操作はその後の胚の発生に与える影響も大きいとされていることから今回行った抜き取り後の注入操作時は 2 回の穿針操作が胚生存率に影響したものと考えられた。しかし, 抜き取り後細胞注入した胚のうち, 培養 5 日目までの生存が確認された胚のそれ以降の生存率については, 対照の細胞注入操作のみを行った胚と同様の傾向を示したことから, 抜き取りおよび細胞注入操作を改善することにより培養初期の生存率を向上させることが可能であると考えられた。

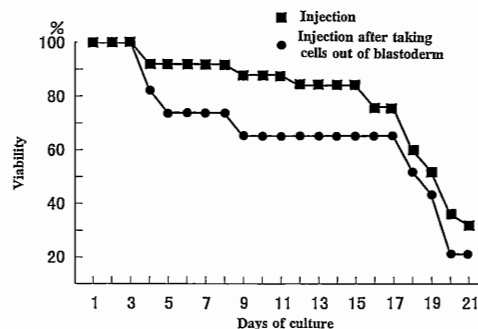


Figure.3 Viability of chick embryos injected with blastodermal cell by different methods.

3. 胚盤葉細胞の注入操作が羽毛色キメラの出現頻度と発生部位に及ぼす影響

異なる注入操作によって得られた羽毛色キメラ胚の出現頻度を Table 1, またキメラ胚における BPR 由来黒色羽毛の発現部位を Table 2 に示した。

培養により羽毛が明らかに確認できるまでに発生した胚 (HAMBERGER and HAMILTON : 1951 の発生段階 40~45) は, 細胞注入のみを行った胚で 21 胚, 抜き取り後注入したものでは 15 胚であった。これらのうち胚体の一部に黒い羽毛が認められた胚は, 注入のみ行ったもので 3 胚, 抜き取り後注入操作を行ったもので 5 胚であった。羽毛色キメラの出現頻度は細胞注入のみを行った胚で 14.3%, 抜き取り後注入した胚では 33.3% となり, 有意な差はないものの胚盤葉細胞を抜き取り後注入したものの方が羽毛色キメラの出現頻度が高かった。これらの結果は鏡味ら (1997) の報告と同様の傾向であった。注入のみおよび, 抜き取り操作後注入した胚ともに BPR 由来の黒色羽毛の発現部位を頭部に有するキメラ胚が多く認められたが, それ以外の部位における黒色羽毛発現に特定な傾向は認められなかった。ドナー卵細胞由来の羽毛の発現部位は PETITTE (1988), 山川 (1990) の報告と一致するものと考えられた。なお今回, 抜き取り後の細胞注入操作により得られたキメラ胚では胚体全域に占める黒色羽毛の部位の割合も細胞注入のみによって得られた胚よりも高く, また BPR 由来の黒色羽毛が胚体全域に散

在している胚も得られた。

今後, 今回の実験の例数を増やすとともに, 抜き取りおよびその後の注入操作技術の改善と孵化率, キメラ率の向上を企む必要がある。さらに生殖腺をはじめとした各組織におけるドナー細胞寄与率の詳細な検討も必要と考えられる。

文 献

阿形清和・内藤充・大塚勝正・木野勝敏・江口吾朗 (1991) ニワトリ受精卵への遺伝子導入. 細胞工学, **10** : 507-512.

HAMBURGER, V. and H. L. HAMILTON. (1951) A studies of normal stage in the development of the chick embryo. J. Morphology, **88**: 49-92.

鏡味裕・田上貴寛・松原悠子・春海隆・花田博文・内藤充 (1997) ニワトリ胚盤葉における始原生殖細胞の発生起源の同定. 日畜会大会号, **92** : 193.

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.

PETITTE, J. N. and R. J. ETCHES. (1988) The produc-

Table 1 Appearance frequencies of pulmage chimeras

method	No. of chick embryos with pulmage	No. of chick embryos with only white pulmage	No. of chick embryos with white and black pulmage	Pulmage chimeras percentage
Injection only	21	18	3	14.3%
Injection after taking cells out of blastoderm	15	10	5	33.3%

Table 2 Distribution of black pulmages derived from BPR in chimeric chicks.

method	chimeric chick embryo	head	neck	abdomen	back	tail	leg	wing
Injection only	1	●			●			
	2	●						
	3	●		●			●	
Injection after taking cells out of blastoderm	1					●		
	2	●			●			
	3	●	●	●	●	●	●	●
	4		●					●
	5	●		●				

tion of chimeric chicks by embryo cell transfer.  
Poultry Sci., **67**: 137.  
寺井明喜子・市川 舜・森津康喜 (1997) 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. 北畜会報, **39**: 34-37.  
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  
大会号, **27**: 436.