

## 鶏胚の長期保存と胚の操作技術の開発

### 胚の操作技術の開発

折原惟子・橋本光一郎<sup>1</sup>・岸井誠男・矢後啓司  
(<sup>1</sup>明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所)

Development in the Method of Long Term Storage of Chicken Embryo  
and Manipulation of Chicken Embryo

Development of Manipulation of Chicken Embryo

Yuiko ORIHARA, Koichiro HASHIMOTO, Yoshio KISHII and Keiji YAGO

鶏の効率的な育種改良のため、生殖系列キメラ鶏の作出方法を検討した。異なる品種の胚盤葉細胞を移植した胚の孵化率は、二黄卵卵殻を用いた方法で2.1%、窓開け卵を用いた方法で9.1%だった。孵化した雛を育成し、性成熟後雄7羽雌12羽について後代検定を行った結果、雄2羽が生殖系列キメラであり、移植した細胞由来の雛の発生率は0.8%及び1.4%だった。始原生殖細胞を移植した胚の孵化率は14.9%で、雄4羽雌6羽について後代検定を行い、雄1羽雌2羽が生殖系列キメラであり、移植した細胞由来の雛の発生率はそれぞれ17.0%、7.8%、3.6%だった。

キーワード：鶏、育種改良、生殖系列キメラ、胚盤葉細胞、始原生殖細胞

鶏の育種改良は、集団遺伝学に基づき行われ、多くの年月と羽数を必要としてきた。最近になって、1細胞期から孵化までの鶏胚の体外培養法<sup>1)</sup>が開発され、卵・肉質、抗病性等の改良や、有用蛋白質等の生産を目的とした形質転換鶏の作出、希少鶏種の遺伝資源の保存等の研究が進められている。

形質転換鶏作出のため、鶏胚への遺伝子導入が検討され、未分割の受精卵に注入する方法<sup>2) 3)</sup>、胚盤葉細胞や始原生殖細胞に導入する方法<sup>4) 5)</sup>等が報告されている<sup>6)</sup>。胚盤葉細胞や始原生殖細胞に導入する方法は、放卵後の受精卵を用いるので材料を得やすく、これらの細胞の培養が可能になれば効率良く遺伝子導入できると考えられる。そこでこれらの細胞を他の胚に移植して孵化させ、生殖系列キメラを作出する方法が検討され、羽毛色等をマーカーとして胚盤葉細胞及び始原生殖細胞の移植による生殖系列キメラの作出が報告されている<sup>7) 8) 9) 10) 11) 12)</sup>。また、生殖系列キメラを利用して特殊鶏作出の可能性もある。

本試験では、効率的な育種改良及び特殊鶏作出

の基礎技術として、異なる品種の胚盤葉細胞及び始原生殖細胞の移植による生殖系列キメラ鶏の作出方法について検討した。

#### 材料及び方法

(1)胚盤葉細胞の移植による生殖系列キメラ鶏の作出

ドナー胚にはロードアイランドレッド、比内鶏、名古屋、シャモ、アローカナ、横斑プリマスロック、黒色ミノルカ及び烏骨鶏の放卵後の受精卵を、レピメント胚には白色レグホンの放卵後の受精卵を用いた。

ア. 胚の培養に二黄卵卵殻を用いた方法

注入用胚盤葉細胞の調製は、Naito et al.の方法<sup>13)</sup>に準拠した。胚盤葉を卵黄から剥離して、トリプシン処理(0.1%トリプシン/PBS<sup>-</sup>, 37°C, 10分)を行い細胞を分離し、500-1000個/ $\mu$ l(PBS<sup>-</sup>)になるように調製した。この胚盤葉細胞浮遊液1-2 $\mu$ lを、ガラスマイクロピペットを用いて、シャーレに割卵したレピメント胚の胚盤葉下腔に注入した。その後レピメント胚をNaito et al.の方法<sup>14)</sup>により培養し、孵化させた。培養

4, 7, 14日目の胚の生存率と孵化率を調査した。

#### イ. 胚の培養に窓開け卵を用いた方法

胚盤葉を卵黄から剥離し、中心部を直径1.5-2mmの円状に残して周辺部を除去し、KAv-1 medium<sup>15)</sup>中でガラスマイクロピペットを用いてピペットインクを行い細胞を分離し、注入用胚盤葉細胞を調製した。この胚盤葉細胞浮遊液1-2 $\mu$ lを、受精卵中央部の卵殻を直径6-8mmの丸型に切り取って作成した窓から、レビメント胚の胚盤葉下腔に、ガラスマイクロピペットを用いて注入した。1個の胚盤葉中心部から調製した細胞浮遊液を約3個のレビメント胚へ注入した。注入後、卵殻の窓の部分のアセテートフィルムテープで密封し、孵卵機内の温度38.0 $^{\circ}$ C、湿度60%、転卵は30 $^{\circ}$ で1回/1時間の条件で培養し、培養18日目に転卵を止めて培養を続け孵化させた。培養7, 14日目の胚の生存率と孵化率を調査した。

#### (2) 始原生殖細胞 (primordial germ cells:PGC) の移植による生殖系列キメラ鶏の作出

ドナー胚には白色レグホンの受精卵を、レビメント胚にはロードアイランドレッド、比内鶏、名古屋、シャモ、アローカナ、横斑プリマスロック、黒色ミノルカ及び烏骨鶏の受精卵を用いた。

PGCの採取及び注入方法は、Yasuda et al.の方法<sup>16)</sup>に準拠した。発生ステージ13-15<sup>17)</sup>のドナー胚からガラスマイクロピペットを用いて1-2 $\mu$ l採血し、濃度勾配遠心分離法によりPGCを回収した。このPGC100-200個を含むKAv-1medium<sup>15)</sup>1-2 $\mu$ lを、鋭端部の卵殻を直径6-8mmの丸型に切り取って作成した窓から、発生ステージ13-15<sup>17)</sup>のレビメント胚の血管に注入した。血液から回収したPGCの一部は、CO<sub>2</sub>5%、空気95%、37.0 $^{\circ}$ Cの培養器内で1-5日間培養後、同様にレビメント胚に注入した。注入後、(1)イ.の方法と同様にテープを貼って密封し、培養し、孵化させた。培養14日目の胚の生存率と孵化率を調査した。

#### (3) 移植した細胞由来の雛の発生率の検討

胚盤葉細胞または始原生殖細胞を移植して孵化した雛を育成し、性成熟後、次の組合せで人工授精により交配し、移植した細胞由来の雛の発生率を調査した。

鶏の羽毛色は、白色レグホンの持つ優性白色遺伝子が、有色羽毛種の持つ黒色、赤笹、小麦色遺伝子などに対して上位である<sup>18)</sup>。このことから、有色羽毛種の胚盤葉細胞を白色レグホンの胚に移植した鶏に、それぞれの有色羽毛種の鶏を交配して孵化した雛の羽毛色が有色であれば、移植した細胞由来の雛であると判断した。また、白色レグホンの始原生殖細胞を有色羽毛種の胚に移植した

鶏に、それぞれの有色羽毛種の鶏を交配して孵化した雛の羽毛色が白色または白色に有色の刺毛であれば、移植した細胞由来の雛であると判断した。

## 結果

細胞を移植した鶏胚の生存率及び孵化率を表1に示した。方法アにより胚盤葉細胞を移植した胚を142個培養した結果、胚の生存率は培養後4日目で51.4%、7日では14.1%、14日では8.5%となり、孵化率は2.1%(3羽)だった。

方法イにより胚盤葉細胞を移植した胚を307個培養した結果、胚の生存率は、培養後7日で30.9%、14日で20.5%であり、孵化率は9.1%(28羽)だった。

始原生殖細胞を移植した胚を101個培養した結果、胚の生存率は、培養後14日で38.6%であったが、孵化率は14.9%(15羽)だった。

細胞を移植して孵化した雛の育成期の生存率を表2に示した。方法アにより孵化した雛の生存率は150日齢で33.3%だった。方法イでは150日齢で85.7%、始原生殖細胞を移植して孵化した雛の生存率は150日齢で73.3%だった。

胚盤葉細胞を移植した鶏が生殖系列キメラ鶏であるかを検討した結果を表3に示した。方法アにより孵化した雛は、人工授精を開始する前に全羽死亡したので後代検定を実施できなかった。方法イにより孵化して育成した鶏のうち、雄7羽雌12羽について人工授精法を用い、雛を20~280羽孵化させ羽毛色を調査した結果、雄2羽が生殖系列キメラ鶏であることが明らかになった。この雄2羽の、移植した細胞由来の雛の発生率はそれぞれ0.8%(251羽中2羽)及び1.4%(74羽中1羽)だった。

始原生殖細胞を移植した鶏が生殖系列キメラ鶏であるかを検討した結果を表4に示した。雄4羽雌6羽について人工授精法を用い、雛を50~290羽孵化させ羽毛色を調査した結果、雄1羽雌2羽が生殖系列キメラ鶏だった。この3羽の移植した細胞由来の雛の発生率は、雄1羽が17.0%(253羽中43羽)、雌がそれぞれ7.8%(129羽中10羽)及び3.6%(166羽中6羽)だった。

## 考察

本試験では、異なる品種の胚盤葉細胞または始原生殖細胞を移植して生殖系列キメラ鶏を作出できるか検討した。

胚盤葉細胞の移植による方法のうち、二黄卵卵殻を用いた方法では、培養7日目で生存率が14.1%と大きく低下し、孵化率は2.1%まで低下した。これは、細胞注入時の胚盤葉の損傷や、培養4日目に胚を別の卵殻に移し換える時の胚や卵黄の損傷により生存率が大きく低下したと考えられる。

また、胚と卵白の量や卵殻の大きさのバランスが悪かったり、孵化時のラップの穴開け時期が適当

表1 細胞を移植した鶏胚の生存率及び孵化率

移植した細胞	培養方法	培養胚	生存率			孵化率
			4日	7日	14日	
胚盤葉細胞	二黄卵卵殻	(142)	51.4	14.1	8.5	2.1(3)
胚盤葉細胞	窓開け卵	(307)		30.9	20.5	9.1(28)
始原生殖細胞	窓開け卵	(101)			38.6	14.9(15)

注)数値の単位は%、()内は胚数を示す。

表2 孵化した雛の生存率

移植した細胞	培養方法(羽)	育成羽数	生存率(%)		
			30日齢	90日齢	150日齢
胚盤葉細胞	二黄卵卵殻	3	66.7	33.3	33.3
胚盤葉細胞	窓開け卵	28	100.0	85.7	85.7
始原生殖細胞	窓開け卵	15	93.3	73.3	73.3

表3 胚盤葉細胞を移植した鶏の雛の羽毛色調査

性	個体No.	羽毛色調査雛数(羽)	移植した細胞由来雛数(羽)	移植した細胞由来雛の発生率(%)	
雄	83	251	2	0.8	
	92	43	0	0.0	
	106	21	0	0.0	
	117	74	1	1.4	
	118	61	0	0.0	
	119	178	0	0.0	
	123	287	0	0.0	
	雌	82	101	0	0.0
		89	110	0	0.0
		99	145	0	0.0
100		128	0	0.0	
101		133	0	0.0	
102		159	0	0.0	
104		138	0	0.0	
107		132	0	0.0	
109		110	0	0.0	
120		94	0	0.0	
121		115	0	0.0	
124		106	0	0.0	

表4 始原生殖細胞を移植した鶏の雛の羽毛色調査

性	個体No.	羽毛色調査雛数(羽)	移植した細胞由来雛数(羽)	移植した細胞由来雛の発生率(%)
雄	95	253	43	17.0
	112	120	0	0.0
	115	222	0	0.0
	125	291	0	0.0
	雌	84	54	0
97		78	0	0.0
110		129	10	7.8
111		166	6	3.6
114		127	0	0.0
128		50	0	0.0

でなかったなどの理由で孵化率が低下したと考えられる。Naito et al.<sup>13)</sup>や大塚ら<sup>8)</sup>は、同様の方法で孵化率がそれぞれ約40%、20~25%と報告しており、本試験との孵化率の差は、主に胚の培養技術の違いと考えられる。

胚盤葉細胞の移植で窓開け卵を用いた方法では、培養7日目で生存率は30.9%だったが孵化率は9.1%と低下した。これは、細胞注入時の胚盤葉の損傷や、卵殻の窓をふさいだテープの接着剤部分への卵白の付着により生存率が低下したと考えられる。また、孵化時に、はしうちがテープ部分に妨げられるなど胚の孵化直前の死亡や死籠り卵により孵化率が低下したと考えられる。Petitte et al.<sup>7)</sup>は、窓開け卵を用いた方法で、培養10~16日目の胚の生存率は28%、孵化率は7%と報告しており、胚の死亡率は培養初期と後期に多く、本試験も同様の傾向を示した。

始原生殖細胞の移植による方法では、胚の孵化率は14.9%だった。これは、細胞注入時の胚の血管の損傷や、卵殻の窓のテープ部分への卵白の付着により生存率が低下したと考えられる。また、前述の窓開け卵の方法と同様の理由で孵化率が低下したと考えられる。

細胞を移植して孵化した雛の150日齢での生存率は、二黄卵卵殻を用いた方法で33.3%、窓開け卵を用いた方法で85.7%、始原生殖細胞の移植による方法で73.3%と、通常の育成期の生存率よりやや低かった。これは、通常と異なる方法で孵卵したためにやや虚弱だった雛の育成中の死亡による。

胚盤葉細胞を移植して孵化した鶏のうち、雄7羽雌12羽について生殖系列キメラであるか後代検定した結果、雄2羽の生殖系列キメラが確認され、移植した細胞由来の雛の発生率は、それぞれ0.8%及び1.4%だった。

大塚ら<sup>8)</sup>は、発生ステージ X<sup>19)</sup> のレビ<sup>o</sup>ント胚に胚盤葉細胞を500-1000個移植して孵化させ、後代検定した雄3羽のうち2羽が、また、発生ステージ VIII-IX<sup>19)</sup> のレビ<sup>o</sup>ント胚に移植し後代検定した雄4羽のうち2羽が生殖系列キメラであり、移植した細胞由来の雛の発生率は、それぞれ0.37及び1.37%、0.48%及び0.58%と報告している。Petitte et al.<sup>7)</sup>は、胚盤葉細胞を200-500個移植して孵化させ、後代検定した雄1羽雌2羽のうち雄1羽が生殖系列キメラであり、移植した細胞由来の雛の発生率は、0.28%と報告している。Kagami et al.<sup>10)</sup>の報告ではレビ<sup>o</sup>ント胚の胚盤葉明域中心部、周辺部、暗域を除去し、その部分にドナー胚の胚盤葉細胞を約500個移植し、孵化後それぞれ27羽、24羽、24羽の後代検定を行い、17羽、11羽、7羽が生殖系列キメラであった。これらの生殖系列キメラ鶏の、移植した細胞由来の雛の発生率は8~100%、1~76%、1~25%と報告している。また、Carsience et al.<sup>9)</sup>は、レビ<sup>o</sup>ント胚にγ線照射し、胚盤葉細胞を100個移植して孵化させ、後代検定した雄13羽雌11羽のうち雄2羽雌1羽が生殖系列キメラであり、移植した細胞由来の雛の発生率は1.9%、5.1%及び1.3%と報告している。また、胚盤葉細胞を200-400個移植した場合は、後代検定した雄6羽雌8羽のうち雄5羽雌3羽が生殖系列キメラであり、移植した細胞由来の雛の発生率は、2.3~100%だったと報告している。

本試験と他の報告を比較すると、後代検定を行った羽数に対する生殖系列キメラ鶏の羽数は、本試験の方がやや少なかった。また、生殖系列キメラ鶏の、移植した細胞由来の雛の発生率は、レビ<sup>o</sup>ント胚にの無処理のものを用いた報告とは同程度かやや高い数値で、レビ<sup>o</sup>ント胚除去などの処理を行ったものよりは低い数値だった。本試験では移植する胚盤葉細胞をドナー胚の胚盤葉中心部から採取し、レビ<sup>o</sup>ント胚は無処理のものを用いた。放卵時の受精卵の胚盤葉中心部には、周辺部より始原生殖細胞になる細胞が多く存在する<sup>20)</sup>ため、移植した細胞由来の雛の発生率を高めるには、この部分の移植が適すると考えられる。また、レビ<sup>o</sup>ント胚に対するドナー胚の始原生殖細胞の割合を高めるため、レビ<sup>o</sup>ント胚の胚盤葉を一部除去するなどレビ<sup>o</sup>ント胚の条件を検討する必要もあると考えられる。

始原生殖細胞を移植して孵化した鶏のうち、雄4羽雌6羽について生殖系列キメラであるか後代検定した結果、雄1羽雌2羽の生殖系列キメラ鶏が確認され、移植した細胞由来の雛の発生率は、それぞれ17.0%、7.8%及び3.6%だった。

Tajima et al.<sup>11)</sup>は始原生殖細胞を100個移植して孵化させ、後代検定した17羽のうち13羽が生殖

系列キメラであり、移植した細胞由来の雛の発生率は0.6~11.8%と報告している。本試験と比較すると、後代検定を行った羽数に対する生殖系列キメラ鶏の羽数は、本試験の方が少なかった。また、生殖系列キメラ鶏の、移植した細胞由来の雛の発生率は、同程度の数値だった。

本試験では、移植した細胞由来の雛の発生率は、始原生殖細胞を移植する方法が胚盤葉細胞の場合より高かった。鳥類の始原生殖細胞は、発生に伴い胚盤葉上層からやがて生殖三日月環へ移動し、血流中を循環した後、生殖隆起へ到達すると言われている<sup>21)</sup>。このことから、本試験の二方法では、始原生殖細胞を移植した方法の方が、胚盤葉細胞を移植した場合よりも、レビ<sup>o</sup>ント胚の生殖隆起にドナー胚由来の始原生殖細胞が到達した割合が高かったと考えられる。

Naito et al.<sup>12)</sup>は、レビ<sup>o</sup>ント胚の血液を抜いた後に、ドナー胚の始原生殖細胞200個を移植して孵化させ、後代検定を行った。その結果、移植した細胞由来の雛の発生率は77~95%となり、血液を抜かずに移植したものは5~62%だったと報告している。また、Kagami et al.<sup>10)</sup>は胚盤葉明域中心部を除去した胚を発生ステージ 15<sup>17)</sup>まで培養し、血液中の始原生殖細胞数を測定した結果、通常より減少したと報告している。これらのことから、レビ<sup>o</sup>ント胚に対するドナー胚の始原生殖細胞の割合を高めるために、レビ<sup>o</sup>ント胚の始原生殖細胞数を減少させる方法の検討も必要であると考えられる。

本試験で、異なる品種の胚盤葉細胞または始原生殖細胞を移植して生殖系列キメラ鶏を作成できることを確認した。さらに生殖系列キメラになる率と、移植した細胞由来の雛の発生率を高めるためには、移植する胚盤葉細胞の採取部位や細胞数、始原生殖細胞数や、細胞浮遊液注入量などドナー細胞の条件と、先述のレビ<sup>o</sup>ント胚の条件の両面の検討が重要と考えられる。

## 文 献

- 1) Perry MM. 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 331:70-72.
- 2) Naito M, Agata K, Otsuka K, Kino K, Ohta M, Hirose K, Perry MM, Eguchi G. 1991. Embryonic expression of  $\beta$ -actin-lacZ hybrid gene injected into the fertilized ovum of the domestic fowl. *Int. J. Dev. Biol.* 35:69-75.
- 3) Naito M, Sasaki E, Ohtaki M, Sakurai M. 1994. Introduction of exogenous DNA into somatic and germ cells of chickens by microinjection into the germinal disc of

- fertilized ova. *Mol.Reprod.Dev.* 37:167-171.
- 4) Brazorot CL, Petite JN, Etches RJ, Verrinder Gibbins AM. 1991. Efficient transmission of chicken cells by lipofection, and introduction of transfected blastodermal cells into the embryo. *Mol.Reprod.Dev.* 30:304-312.
- 5) Watanabe M, Naito M, Sasaki E, Sakurai M, Kuwana T, Oishi T. 1994. Liposome-mediated DNA transfer into chicken primordial germ cells in vivo. *Mol.Reprod.Dev.* 38:268-274.
- 6) 内藤 充 1995. トランスジェニックニトリ作出の現状と展望. *農林水産技術研究ジャーナル* 18(6):10-16.
- 7) Petite JN, Clark ME, Liu G, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ. 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108:185-189.
- 8) 大塚勝正・木野勝敏・村山肇・太田元好・餅井真・阿形清和 1991. 体細胞及び生殖細胞レベルのキメラニトリの作出. *愛知農総試研報* 23:431-436.
- 9) Carsience RS, Clark ME, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ. 1993. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117:669-675.
- 10) Kagami H, Tagami T, Matsubara Y, Harumi T, Hanada H, Maruyama K, Sakurai M, Kuwana T, Naito M. 1997. The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Mol.Rep.and Dev.* 48:501-510.
- 11) Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T. 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 40:509-519.
- 12) Naito M, Tajima A, Yasuda Y, Kuwana T. 1994. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol.Reprod.and Develop.* 39:153-161.
- 13) Naito M, Watanabe M, Kinutani M, Nirasawa K, Oishi T. 1991. Production of quail-chick chimaeras by blastoderm cell transfer. *British Poult.Sci.* 32:79-86.
- 14) Naito M, Nirasawa K, Oishi T. 1990. Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *J. Exp. Zoology* 254:322-326.
- 15) Kuwana T, Hashimoto K, Nakanishi A, Yasuda Y, Tajima A, Naito M. 1996. Long-term culture of avian embryonic cells in vitro. *INT.J. Dev. Biol.* 40:1061-1064.
- 16) Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T, Kuwana T. 1992. A method to obtain germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *J.Reprod.Fert.* 96:521-528.
- 17) Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J.Morphol.* 88:49-92.
- 18) 田名部雄一 1971. 鶏の改良と繁殖 第1版 60-81. 養賢堂. 東京.
- 19) Eyal-Giladi H, Kochav S. 1976. From cleavage to primitive streak formation a complementary normal table and a new look at the first stages of the development. *Development Biology* 49:321-337.
- 20) Ginsburg M. 1994. Primordial germ cell formation in birds. *Germ.Dev.* 52-67.
- 21) Kuwana T. 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Development Growth and Differ.* 35(3):237-243.