

代用卵殻環境が培養ニワトリ胚の発生に およぼす影響

藤田悠記*・高橋俊介*・那須章人*・下井 岳*・亀山祐一*・橋詰良一*・伊藤雅夫*

(平成 19 年 3 月 2 日受付/平成 19 年 6 月 8 日受理)

要約: ウズラ胚体外培養法を応用し, 卵殻を使わず人工容器でのニワトリ胚の発生能について検証した。ニワトリ胚は, 白色レグホンをを用い, 孵卵器内で 3 日間培養した後, 卵の内容物を 100 ml カップ内に空気透過性のあるテフロン膜を卵型に装着した人工容器に移し, ラップで封をした。再び孵卵器内で孵化までの 18 日間培養した。人工容器は空気の流通を完全に遮断したもの (Type 1), 空気の流通を自由に行かせたもの (Type 2), さらに空気の流通量をある程度人工的に調節可能としたもの (Type 3) の以上 3 タイプを用いた。また, 人工容器に移す際には卵殻粉末あるいは乳酸カルシウムを添加した。人工容器を用い培養した結果, 孵化させるまでは至らなかったが, 卵殻粉末の添加により孵化直前の 20 日目まで培養することに成功した。最も好成績であったもので培養 16 日目に 76.0%, 18 日目に 52.0%, 20 日目に 12.0% の生存率が得られた。一方, 対照として行った, 二黄卵卵殻を代用卵殻に用いた場合は 60% が孵化したが, 人工容器を用いた場合と同様に培養初期 (孵卵 6 日目) と後期 (孵卵 16 日目) に生存率の低下が認められることから, この 2 つの時期がニワトリ胚の体外培養において重要な時期であると推察された。

キーワード: ニワトリ, 体外培養, 二黄卵卵殻, 人工容器, 卵殻粉末

1. はじめに

ニワトリ胚の発生においては, 胚構成成分の全てが, 卵黄, 卵白および卵殻から供給される。そのうち, 卵殻の主成分は炭酸カルシウム (CaCO_3) であり, 卵黄とともに鳥類の発生過程において重要なカルシウムの供給源と考えられている¹⁻³⁾。しかも, 卵殻から胚へのカルシウム供給量は, 孵化に必要なカルシウムの約 80% とされている。また, 卵殻は発生胚へのカルシウム供給源のほか, 1 卵殻当たり 7,000~17,000 個存在する卵殻孔 (気孔) により, 卵内と外界とのガス交換を行っていると考えられ, その調節機能も有していると考えられている。このように, 卵殻は胚の発生において, カルシウムをはじめとするミネラル供給機能と, ガス交換機能の 2 つの機能がある。

このように, 卵殻は, 鳥類胚の発生において必要不可欠なものと考えられてきたが, 近年 KAMIHIRA らにより, ウズラ胚ではあるが, 卵殻をまったく用いない人工容器における体外培養法の成功例が報告された⁴⁾。この報告により, 卵殻機能を人工的に補うことが可能であることが示されたが, ニワトリ胚における成功例は現在のところみられない。

そこで本実験では, 卵殻を使わず人工容器でつくった代用卵殻環境が培養ニワトリ胚の発生にいかなる影響を及ぼすかを検討することとした。

2. 材料および方法

(1) 供試材料

実験の材料として, 本大学内にて繁殖, 育成した白色レグホン種の有精卵 (平均値±標準偏差: 62.1 ± 6.7 g) から取り出した胚を培養に供した。

(2) 培養容器

本実験の培養容器として, 二黄卵 (86.3 ± 6.4 g) の鈍端部を電動カッターにて, 直径が約 40 mm になるように切断した二黄卵卵殻を使用した。また, 100 ml ポリプロピレンディスカップに卵型に伸ばした空気透過性のあるテフロン膜 (Millwrap, Nihon Millipore Co.) を吊るした人工容器を作製し使用した。さらに, 人工容器は, 空気の流通を完全に遮断したもの (Type 1), また Type 1 に直径約 2 mm の空気穴を全 16 ヶ所設け空気の流通を自由に行かせたもの (Type 2), さらに空気穴をラップ (ポリ塩化ビニリデン, クレラップ, クレハ製) で覆い, 発生の進行に伴いラップに穴を開けてゆき, 空気の流通量をある程度人工的に調節可能としたもの (Type 3) の以上 3 つの Type を用いた (Fig. 1)。

(3) 体外培養方法

ニワトリ胚は, 始めに自動転卵装置付孵卵器 (昭和孵卵器, 埼玉) 内の温度 37.6°C , 湿度 57~62%, 90 度/15 min

* 東京農業大学生物産業学部生物生産学科

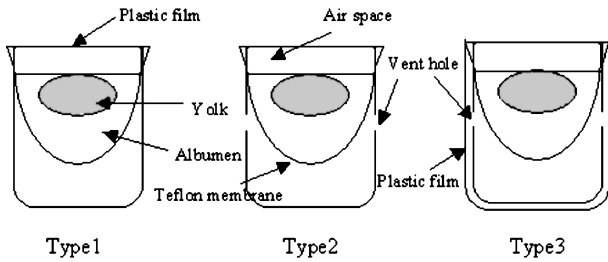


Fig. 1 Three types of artificial vessels. Type 1, with complete blockage of air flow; Type 2, with air flow; and Type 3, with controllable air flow.

転卵条件下にて種卵のまま 3 日間培養した。その後、卵黄の反対側を電動カッターで切り開き、卵の内容物を培養容器に移した。培養容器に移したニワトリ胚は、温度 37.6°C、30 度/h 転卵の条件下で 15 日間培養した。孵化までの残り約 3 日間は発生座にて培養し、転卵は行わなかった。また、ニワトリ胚が尿膜呼吸（表皮呼吸）から肺呼吸へ移行する培養 18 日目に、ラップのフタに針で数ヶ所の空気穴を開け、呼吸を助けた。さらに、卵殻粉末および乳酸カルシウム水溶液を予め水溶性卵白と混合し、同卵白を人工容器に移す方式でそれらを添加した。添加量は KAMIHIRA ら⁴⁾のウズラの添加量を参考にして予備実験を行い 100 mg とした。

(4) 統計処理方法

本実験におけるデータは、培養容器内にて培養を開始した培養 3 日目を 100% とした生存率で示した。また、day 21 における生存率は、孵化率をそれとした。得られたデータは、カイ二乗検定法により統計学的処理を行った。また、胚重量においては、平均値±標準偏差により示し、一元配置の分散分析により統計学的処理を行った。そして、全ての場合において有意差は $P < 0.05$ とした。

3. 結 果

(1) 二黄卵卵殻を用いた体外培養による生存率推移

二黄卵卵殻を用いたニワトリ胚の体外培養における生存率および孵化率を Fig. 2 に示した。二黄卵卵殻を用いて培養したニワトリ胚の培養成績は、day 3 から day 7 にかけて 70.0% にまで生存率の低下が認められたが、その後 day 16 までは、生存率 70.0% と安定していた。その後、day 17 に再び低下が認められ、生存率が 60.0% になったが、これ以降に停止胚は認められず、最終的に 60.0% が孵化に至った。しかし、自然発生より得られた孵化率 88.0% と比べ、その差は有意に低いものであった ($P < 0.05$)。

(2) 人工容器を用いた体外培養による生存率推移

人工容器を用いたニワトリ胚の体外培養における生存率および孵化率を Fig. 3, 4 に示した。Fig. 3 に示したとおり、各 type の人工容器を用いて培養したニワトリ胚の培養成績は、まず空気の流通を完全に遮断した Type 1 では、day 3~4 にかけて 75.0% にまで生存率の低下が認め

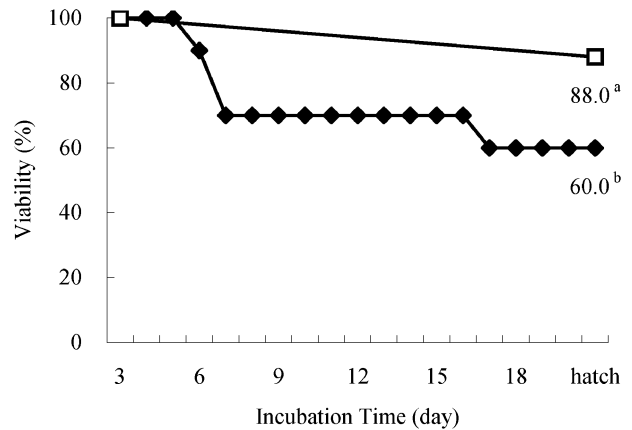


Fig. 2 Viability and hatchability in normal and cultured White Leghorn embryos; ◆: Cultured in double yolk eggshell (n=30), □: Normal control (n=25); Significantly different between a and b. ($P < 0.05$).

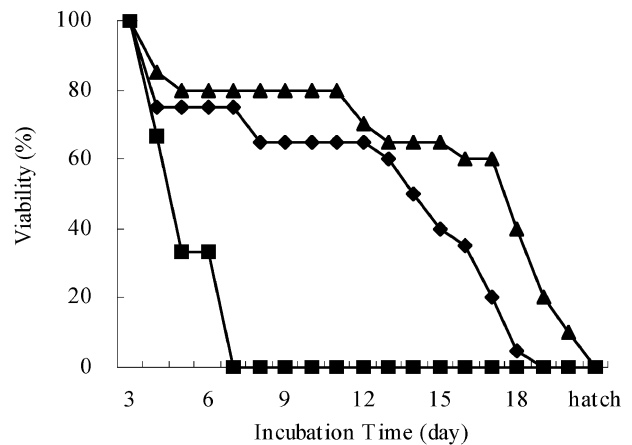


Fig. 3 Viability and hatchability in White Leghorn embryos using three types of artificial vessels; ◆: Type 1 (n=20), ■: Type 2 (n=15), ▲: Type 3 (n=20).

られたが、その後 day 12 まで生存率 60% 以上と比較的安定した生存率が得られた。しかし、day 13 以降から急激な低下が認められ、最終的には day 18 (生存率 5.0%) で生存が確認された以降、全ての胚発生が停止した。次に、初期から空気の流通を自由に行かせた Type 2 では、培養開始直後から生存率に急激な低下が認められ、day 6 (生存率 33.3%) までの生存しか確認できなかった。また、発生の進行に伴い空気穴を徐々に増やし空気の流通を増加させた Type 3 では、day 3~5 にかけて 80.0% まで生存率が低下したが、その後 day 11 までは安定した生存率 80.0% が得られた。しかし、day 12 から再び生存率の低下が始まり、day 17 までに生存率 60.0% まで低下し、さらに、day 17 以降に急激な低下が認められ、最終的に day 20 までに生存率は 10.0% まで低下し、孵化に至らなかった。また、卵殻粉末 100 mg を Type 3 の人工容器に添加した結果を

Fig. 4 に示した。Day 3~5 にかけて 84.0% まで生存率の低下が認められ、その後さらに day 9~11 の間に低下が認められたものの、day 17 までは生存率 76.0% で安定していた。しかし、day 17 以降に急激な生存率の低下が認められ、孵化直前の day 20 (生存率 12.0%) までの生存が確認されたが、孵化には至らなかった。

(3) 胚発育への影響

人工容器を用いた体外培養において最も良好な培養結果を得られた、Type 3 を用い卵殻粉末を添加した胚と自然発生胚 (Normal control) の胚重量を day 19 および day 20 で比較した結果を Fig. 5 に示した。その結果、day 19 および day 20 ともに人工容器の胚重量は自然発生胚と比べて有意な低下が認められた ($P < 0.05$)。

また、孵化直前の day 19 から day 20 にかけての胚重量

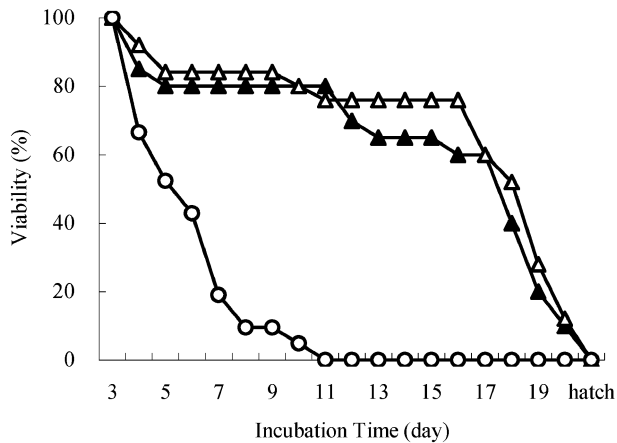


Fig. 4 Viability and hatchability in White Leghorn embryos using artificial vessels with or without addition of calcium ; ▲ : non addition (n=20), △ : eggshell powder addition (n=25), ○ : calcium lactate addition (n=21).

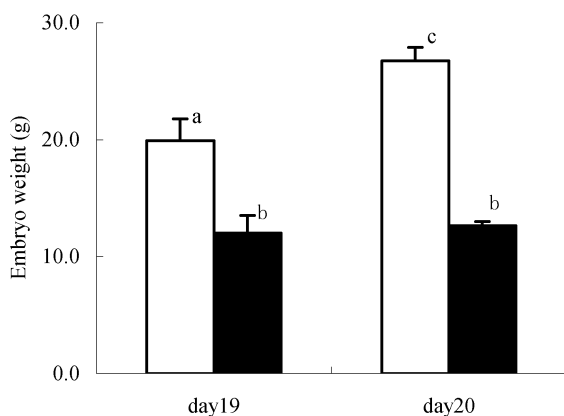


Fig. 5 Weights of embryos in normal control and cultured in the artificial vessel ; □ : Normal control (day19, day20 : n=10), ■ : Artificial vessel (day19 : n=7, day20 : n=3) ; Significantly different among a, b and c. ($P < 0.05$).

の増加が、自然発生胚では約 7g であったのに対し、人工容器を用いた場合には約 0.6g とその差に大きな相違が認められた。さらに、測定時の発生ステージ^{5,6)}においても、自然発生胚がステージ 44~45 であるのに対し、人工容器胚ではステージ 40~42 であり、発生の遅延が認められた。

4. 考 察

人工容器を用いた培養結果と二黄卵卵殻を用いた培養結果を比較すると、人工容器を用いた体外培養では孵化させるには至らなかったのに対し、二黄卵卵殻を用いたものは、60.0% の孵化率を得られた。そのため、卵殻や卵殻膜がニワトリ胚の孵化に際し、補っていると考えられる様々な条件を、本実験で使用した人工容器では果たすことが出来なかったと考えられる。このことから、卵殻および卵殻膜が、ニワトリ胚の生育および孵化に際していかに重要であるかを再確認することができた。また、人工容器と二黄卵卵殻のいずれの培養容器を用いた場合においても、培養初期に生存率の低下が認められた。これは、NAITO^{7,8)} の二黄卵卵殻を用いた同様の報告でも低下が認められるが、その報告では約 5% の低下に止まっている。そのため、本実験における培養初期の生存率の低下は、操作によるダメージが要因の 1 つであることが推察された。さらに、本実験における人工容器での培養中期から後期にかけての生存率の低下は、ニワトリの通常孵化においてみられる、培養中期から後期にかけての尿膜循環 (表皮呼吸) から肺循環への移行時期とほぼ一致している⁹⁾。すなわち、酸素の需要が増加する時期に人工容器はその調整をうまく出来ない要因があると考えられる。

人工容器の Type 別の培養成績を比較すると、Type 2, Type 1, Type 3 の順で、良好な培養結果が出ており、Type 3 において day 20 まで最も良好な成績が得られた。Type 2 では、空気穴が開いている事によって、空気の流通量が過剰となり、胚の粘膜等の乾燥が一部みられ、Type 1 および Type 3 よりも人工容器内湿度が低下したことが、胚に悪影響を及ぼした主な要因であると推察された。一方、Type 1 では空気穴が開いていないことによって、人工容器内湿度は保たれるが、空気の流通が全く無く、胚への酸素供給が不足することが最終的に胚発生に影響を及ぼした要因であると推察された。そのため、Type 3 では、空気穴をラップで覆ったことによって人工容器内湿度が保たれると共に、発生の進行に伴い空気穴を徐々に増やし空気の流通を増加させたことから、胚への酸素供給など胚発生に良い影響を与えたものと推察された。これら 3 Type の人工容器による生存率の推移を総合的に判断すると、発生初期においては湿度を保つことが重要であり、発生中期以降においては十分な空気の流通が必要であることが示唆された。ウズラ胚の場合では、人工容器に空気穴を開け、これをテフロン膜で覆うという方法で孵化に成功しているが、これは培養期間中、孵卵器内に酸素を通気させ、その通気量を培養日数が進む中で増加させていく方法で行われている。この方法は、ウズラ胚とニワトリ胚の酸素要求量の違いが生じると推察され、さらにそれに伴う酸

素の毒性についての懸念は在るが、有効な方法の一つであると考えられた。

卵殻の主な構成要素は、炭酸カルシウムであり、胚発生の間に必要とされるカルシウムの約80%は、胚由来の漿尿管が卵殻膜を介して卵殻から得て、胚に供給しているとされている¹⁻³⁾。しかし、炭酸カルシウムや骨と歯の主成分であるリン酸カルシウムのような不溶性無機物カルシウムの添加によって生存率が低下し、塩化カルシウムのような水溶性カルシウム塩の添加は、添加直後に致命的な影響を胚に及ぼしたという報告がある¹⁰⁾。そのため、本実験では、KAMIHIRAらの報告⁴⁾と同様に水溶性が低く、比較的毒性の低いことが知られる乳酸カルシウムを添加した。しかし、本実験では培養直後から生存率が直線的に低下し、早期に胚の発生停止が起きた。乳酸カルシウムがウズラのように効果を示さなかった原因は不明であるが今後、添加方法、添加量等の検討が必要であろう。一方で、卵殻粉末を添加した場合は、胚発生が進んだことから、粉末の直接的添加は比較的有効であることが示唆された。しかし、二黄卵卵殻を用いた体外培養と同様の漿尿管発達が認められるものの、人工容器を用いた体外培養においては、孵化に至らなかった。そのため、卵殻粉末を卵白部分に添加するという方法では、胚へのミネラル供給が充分に行われていないことが推察された。さらに、人工容器を用いて得られた胚と自然発生胚を重量において比較した結果、有意的な発育の遅延が認められ、発生ステージにおいても差が認められた。このことから、卵殻粉末のみでは胚発生に十分なミネラル分が供給されていないことが推察され、より明確な発生に際するミネラルの動態を検証する必要があること

が推察された。

引用文献

- 1) TEREPKA, AR., COLEMAN, JR., ARMBRECHT, HJ. and GUNTER, TE., 1976. Transcellular transport of calcium. *Symposia of Society for Experimental Biology.*, **30** : 117-140.
- 2) SIMKISS, K., 1961. Calcium metabolism and avian reproduction. *Biological Reviews.*, **36** : 321-367.
- 3) JOHNSTON, PM. and COMAR, CL., 1955. Distribution of calcium from the albumen, yolk and shell to the developing chick embryo. *The American Journal of Physiology.*, **183** : 365-370.
- 4) KAMIHIRA, M., OGUCHI, S., TACHIBANA, A., KITAGAWA, Y. and IJIMA, S., 1998. Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Development Growth and Differentiation.*, **40** : 449-455.
- 5) HAMBURGER, V. and HAMILTON, HL., A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology.*, **88** : 49-92.
- 6) EYAL, GILADI H. and KOCHAV, S., 1976. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Developmental Biology.*, **49** : 137-142.
- 7) NAITO, M. and PERRY, M.M., 1989. Development in culture of the chick embryo from cleavage to hatch. *British Poultry Science.*, **30** : 251-256.
- 8) NAITO, M., NIRASAWA, K. and OISHI, T., 1990. Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *Journal of Experimental Zoology.*, **254** : 322-326.
- 9) ROWLETT, K. and SIMKISS, K., 1985. The surrogate egg. *New Scientist.*, **15** : 42-44.
- 10) 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. *日本家禽学会誌*, **25** : 27-33.

Influence of Surrogate Eggshell Environment on Development of Cultured Chicken Embryos

By

Yuki FUJITA*, Shunsuke TAKAHASHI*, Akihito NASU*, Gaku SHIMOI*,
Yuichi KAMEYAMA*, Ryoichi HASHIZUME* and Masao ITO

(Received March 2, 2007/ Accepted June 8, 2007)

Summary : The developmental ability of chicken embryos in an artificial vessel without eggshell was investigated using the *in vitro* quail embryo culture method. After White Leghorn eggs were incubated in an incubator for 3 days, the egg content was transferred into an artificial vessel consisting of a 100-ml cup attached with an egg-shaped air-permeable Teflon membrane and sealed with wrap, followed by incubation in an incubator for 18 days until hatching. Three types of artificial vessels were used : Type 1 with complete blockage of air flow, Type 2 with air flow, and Type 3 with controllable air flow. Eggshell powder or calcium lactate was added when the egg content was transferred to a vessel. Although no hatching was obtained, the eggshell powder addition allowed the culture by day 20, immediately before hatching. In the group with the best outcomes, the viabilities on days 16, 18, and 20 of culture were 76.0%, 52.0%, and 12.0%, respectively. In contrast, in the control group using eggshell containing 2 yolks as surrogate eggshell, 60% of the eggs hatched, but the viability decreased at early (day 6) and late (day 16) time points, similar to the eggs cultured in the artificial vessel. These findings suggested that these 2 time points are important for *in vitro* culture of chicken embryos.

Key words : Chicken, *in vitro* culture, eggshell containing 2 yolks, artificial vessel, eggshell powder

* Department of Bioproduction, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture