

# ウコッケイ胚の体外培養における生存率と 孵化率に及ぼす代用卵殻の影響と 卵殻中ミネラル動態

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：本実験では、白色レグホン卵殻を代用卵殻として、ウコッケイ胚の体外培養を行い、その生存率におよぼす影響を検討するとともに、ウコッケイと白色レグホン有精卵の通常孵卵中における day 0 および day 21 の骨形成に係る卵殻中ミネラル含有量を検証した。体外培養は、孵卵器内にて 3 日間通常孵卵したウコッケイ胚を白色レグホン卵殻に移し培養を行った。また、通常孵卵の day 0 と day 21 の卵殻は高周波プラズマ発光分析装置にて、Ca, P, Mg の含有量を分析した。体外培養の結果、白色レグホン卵殻を用いることによって、ウコッケイ胚を孵化させることに成功したが、その孵化率は低値を示し、生存率の推移から卵殻からの Ca 供給不足が推察された。一方、有精卵の卵殻含有量分析から day 0 から day 21 までの Ca 減少率がウコッケイでは白色レグホンの約 1.8 倍を示し、品種により Ca の供給量が異なっていることが示唆された。しかし、その他のミネラル分においては、大差が認められなかった。本実験の結果から、白色レグホン卵殻を用いてウコッケイ胚を培養した場合に生じる孵化率の低下は、主に卵殻から胚へ供給される Ca に起因していることが推察された。しかし、孵化した胚は、正常に成長し繁殖能力を得た。

キーワード：ウコッケイ、白色レグホン、代用卵殻、体外培養、ミネラル動態

## 1. はじめに

ニワトリ胚の体外培養法は、PERRY<sup>1)</sup>によって開発され、NAITO<sup>2)</sup>によって改良が図られた二黄卵卵殻を用いた培養法によって、高い孵化率が得られるようになった。また、二黄卵卵殻以外にも代用卵殻としてアイガモ卵殻<sup>3)</sup>、アヒル卵殻<sup>4)</sup>やシチメンチョウ卵殻<sup>5)</sup>を用いた培養法がこれまでに報告されており、いずれも孵化に成功しているが、その孵化率は、ニワトリ二黄卵卵殻を用いた場合よりも低く、卵殻の適合性に種特異性があることが示唆されている。卵殻は、気孔を通じて胚における酸素の取り込みと炭酸ガスの放出を行うとともに、胚が利用するカルシウムの約 80% を補っている<sup>6)</sup>。卵殻から胚へ供給されるカルシウムは、そのほとんどが骨形成に用いられると考えられるが、骨形成には、カルシウム以外にマグネシウム、リンなどのミネラル分が必要である<sup>7)</sup>。このことから、我々は代用卵殻を使用した際に起こる孵化率低下の要因として、カルシウムをはじめとする卵殻中ミネラル分の含有量や使用量の違いが影響していると考えている<sup>8)</sup>。

本実験では、白色レグホン卵殻を代用卵殻として、ウコッケイ胚の体外培養を行い、その生存率におよぼす卵殻の影響を検討するとともに、ウコッケイと白色レグホンに

おける放卵時 (day 0) および孵化時 (day 21) の骨形成に係る卵殻中ミネラル含有量の動態を検証した。

## 2. 材料および方法

### (1) 供試材料

本研究の材料として、当研究室にて繁殖、育成したウコッケイの有精卵 (平均値±標準偏差: 40.3±2.5 g) および白色レグホンの有精卵 (62.1±6.7 g) を使用した。

### (2) 体外培養法

体外培養は、ウコッケイ卵を温度 37.6°C、湿度 57~62% の条件下の孵卵器 (昭和フランキ、埼玉) 内で 15 分毎に 90° 転卵を行いながら 3 日間孵卵した後、卵の内容物を白色レグホン卵殻に移しラップで封をした。また、内容物を他のウコッケイ卵殻に移したものを対照区とした。その後、再び同条件下の孵卵器内にて 1 時間毎に 30° 転卵を行いながら 15 日間培養した。孵化までの残りの 3 日間は発生座に移し静置状態で培養した。この際、ラップの封に針で数ヶ所の穴を開け胚の呼吸を助ける処置を施した。孵化後は、直ちに電子天秤により雛の重量を測定し、学内施設にて飼育、育成を行った。

\* 東京農業大学生物産学部生物生産学科

## (3) ミネラル含有量分析法

ウコッケイおよび白色レグホンの有精卵を温度 37.6°C、湿度 57~62% の条件下の孵卵器内で孵卵し、放卵時 (day 0) および孵化時 (day 21) の卵殻についてミネラル含有量の分析を行った。各卵殻は縦軸の赤道線上から採取し卵殻膜を除去後、乳鉢を用いて粉末状にした。粉末状した卵殻をドライオープンにて水分を完全に蒸発させ乾重量を測定し、0.1 g ずつ抽出し灰化用試験管に移した。サンプルを入れた灰化用試験管に 2 ml の灰化溶液 (過塩素酸:硝酸=4:1) を加え 1 晩常温にて放置した後、ドライサーモユニットバス (DTU-2C, タイテック, 埼玉) を用いて最終加熱温度が 180°C になるまで徐々に熱を加え、有機物を完全に分解する湿式灰化を施した。湿式灰化後、0.2 ppm のペリリウムを添加した 0.05 規定塩酸溶液を用いて希釈調整し、高周波プラズマ発光分析装置 (ICPS-8000E, 島津製作所, 京都) により、ペリリウムを内部標準元素とする検量線を用い、定量分析法により分析を行った<sup>9)</sup>。測定対象としたミネラルは、カルシウム (Ca), マグネシウム (Mg), リン (P) とした。

## (4) 統計処理法

体外培養における生存率は、代用卵殻に移し培養を開始した 3 日目を 100% とし算出し、孵化率については、カイ二乗検定方法により統計学的処理をした。また、培養により得られた雛については、その重量を平均値±標準偏差により示し、t 検定法により統計学的に処理した。さらに、卵殻のミネラル含有量についても、平均値±標準偏差により示し、同一 day での品種間差、同一品種間での日齢差を t 検定法でそれぞれを比較した。

## 3. 結 果

## (1) 体外培養

図 1 に白色レグホン卵殻およびウコッケイ卵殻を用いたウコッケイ胚の体外培養結果を示した。各代用卵殻に移し

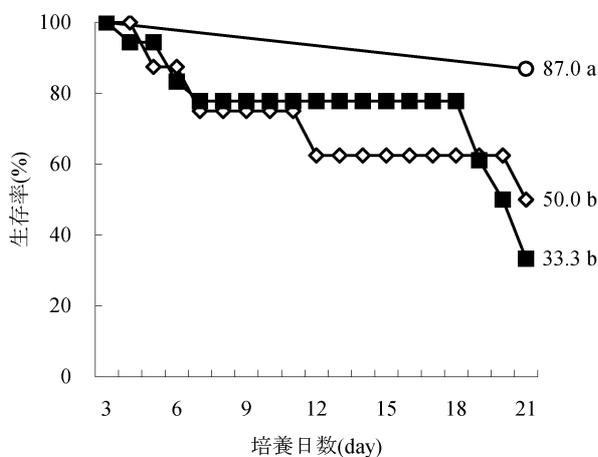


図 1 各代用卵殻を用いたウコッケイ胚の体外培養における生存率および孵化率への影響。○: 自然発生 (n=24), ◇: ウコッケイ卵殻 (n=16), ■: 白色レグホン卵殻 (n=18), a-b 間に有意差有り (P<0.05)。

た直後の約 5 日間で、いずれの卵殻を用いた場合においても胚発生の停止が認められた。しかしその後、ウコッケイ卵殻を用いた培養胚においては、顕著な発生の停止は認められず、最終的に 50.0% (8/16) が孵化に至った。一方、白色レグホン卵殻を用いた培養胚では、培養 18 日目まではウコッケイ卵殻を用いた培養胚よりも高い生存率 (77.8%) を示したものの、その後急激な胚発生の停止が認められ、孵化に至った胚はウコッケイ卵殻より得られた孵化率と有意な差は認められなかったものの、33.3% (6/18) に止まった。しかし、各代用卵殻を用いた培養胚の孵化率は、同条件下で自然発生により得られた孵化率 83.3% (20/24) よりも有意に低値 (P<0.05) であった。

## (2) 体外培養により孵化した雛の重量

図 2 に各代用卵殻を用いた体外培養および自然発生により孵化した雛の重量を示した。ウコッケイ卵殻を用いて孵化した雛は、孵化率では自然発生と比べ有意に低かったものの、重量では前者が  $27.1 \pm 2.2$  g, 後者が  $24.6 \pm 1.0$  g であり、有意な差は認められなかった。一方、白色レグホン卵殻を用いて孵化した雛は、孵化率のみならず重量においても  $21.5 \pm 1.2$  g であり自然発生よりも有意に低値を示し (P<0.05), ウコッケイ卵殻を用いて孵化した雛と比較してもその差は有意なものであった (P<0.05)。しかし、孵化後は正常に成長し繁殖能力を得るに至った。

## (3) 卵殻ミネラル含有量

図 3~5 にウコッケイおよび白色レグホン卵殻における放卵時 (day 0), 孵化時 (day 21) の Mg, P, Ca の含有量の結果を示した。day 0 におけるミネラル含有量は、P を除き Mg および Ca は白色レグホン卵殻よりもウコッケイ卵殻の方が有意に多く含まれていた。また、day 0 と比べ day 21 においては、ウコッケイ卵殻、白色レグホン卵殻ともにすべてのミネラル含有量において減少傾向がみられ、特に Mg の白色レグホンの値および Ca の白色レグホンとウコッケイの値に day 0 から day 21 間で有意な減少が認

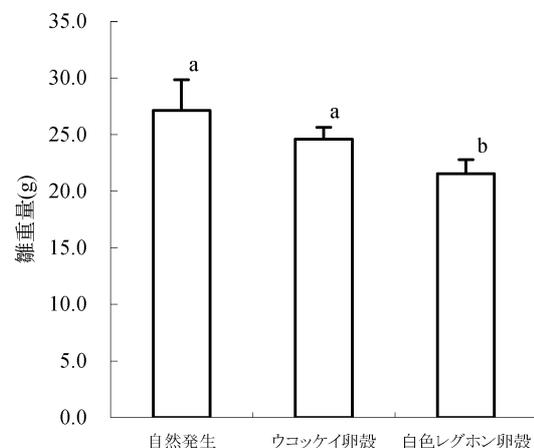


図 2 各代用卵殻を用いたウコッケイ胚の孵化時重量。自然発生 (n=20), ウコッケイ卵殻 (n=8), 白色レグホン卵殻 (n=6), a-b 間に有意差有り (P<0.05)。

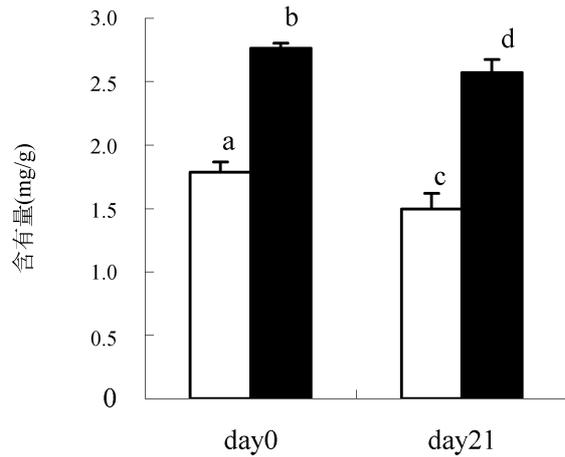


図 3 白色レグホンおよびウコッケイ卵殻におけるマグネシウム含有量。□：白色レグホン卵殻 (n=10), ■：ウコッケイ卵殻 (n=8)。a-b, c-d, a-c 間に有意差有り (P<0.05)。

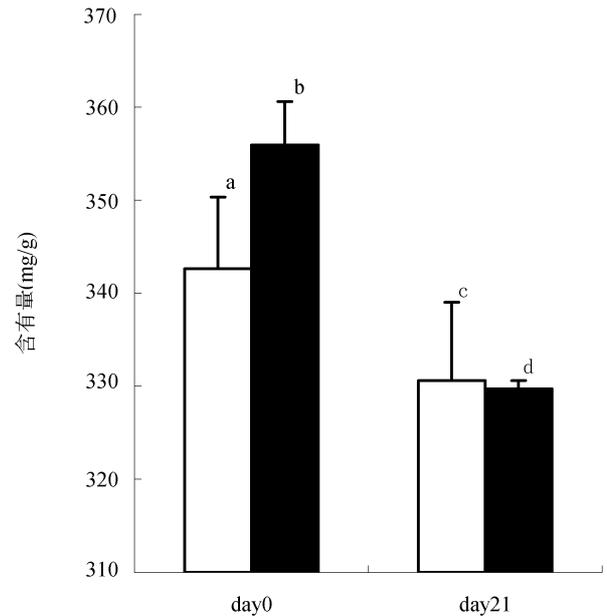


図 5 白色レグホンおよびウコッケイ卵殻におけるカルシウム含有量。□：白色レグホン卵殻 (n=10), ■：ウコッケイ卵殻 (n=8)。a-b, a-c, b-d 間に有意差有り (P<0.05)。

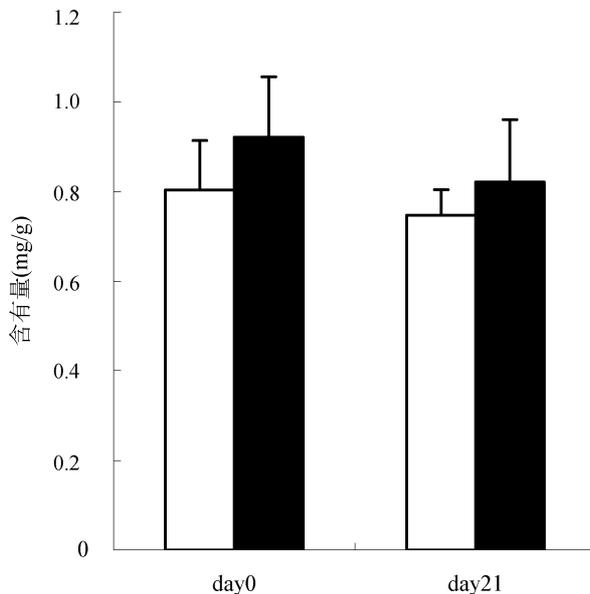


図 4 白色レグホンおよびウコッケイ卵殻におけるリン含有量。□：白色レグホン卵殻 (n=10), ■：ウコッケイ卵殻 (n=8)。

められた。一方, day 0 から day 21 にかけての減少率は, Mg, P ではほぼ同等であったのに対し, Ca ではウコッケイ卵殻の減少率が白色レグホン卵殻における減少率の約 1.8 倍を示した。

#### 4. 考 察

本研究の体外培養結果より, ウコッケイ胚は代用卵殻として白色レグホン卵殻を用いることによって孵化させることが可能であることが示された。このことから, 白色レグホン卵殻を用いた場合においてもウコッケイ胚は, これまで報告されている代用卵殻を用いた体外培養と同様に卵殻からカルシウムと主とするミネラル吸収および酸素を取り

込み, 炭酸ガスを放出する呼吸作用をウコッケイ卵殻の場合と程度の差はあっても行われていたことが示された。しかし, 白色レグホン卵殻を代用卵殻として用いた場合, 同様の操作を施したウコッケイ卵殻を用いた体外培養よりも孵化率および孵化雛の重量において低値を示したことから, 代用卵殻の違いが胚発生に影響を与えていることが示唆された。また, 白色レグホン卵殻を用いた体外培養において生存率の低下が認められた時期は, 骨組織形成におけるカルシウム沈着が活発に進行していることが示されている時期<sup>10,11)</sup> や軟骨に石灰化が認められるようになる時期<sup>2)</sup> と一致しており, 白色レグホン卵殻を用いた場合, ウコッケイ胚へ十分な量のカルシウムを供給することができなかったことが推察された。一方, 本研究の卵殻ミネラル含有量の分析から, ウコッケイ卵殻と白色レグホン卵殻では day 0 段階から含有量に有意な違いが認められ, さらにウコッケイ卵殻ではカルシウムにおいて day 0 から day 21 までに白色レグホンの約 1.8 倍の減少率が認められた。このことから, ウコッケイと白色レグホンとでは孵化までに要求されるカルシウム量が大きく異なっていることが示唆された。しかし, カルシウム以外の骨形成に係るミネラル分であるリンおよびマグネシウムにおいては, day 0 から day 21 までの減少率にマグネシウムで若干差があったが総体的に大差なく, 代用卵殻として白色レグホン卵殻を用いた場合, これらのミネラルについては胚発生に与える影響はほとんど無いことが推察された。

本研究により, 白色レグホン卵殻を用いたウコッケイ胚の体外培養における孵化率の低下は, ウコッケイと白色レグホンとの間の卵殻に生じているカルシウム含有量およびその使用量の相違に起因していることが推察され, 今後,

本実験系でカルシウムの添加により発育改善がみられるかどうか検討したい。さらに、ウコッケイ、白色レグホン両品種間の卵殻のサイズは明らかに異なることから、卵殻内部に広がる漿尿膜の表面積も異なり、それがカルシウムあるいは他のミネラルの吸収に影響を及ぼしている可能性もあろう。しかし、孵化した雛については、その初期重量には有意な差が認められるものの、その後は卵殻の違いによる影響は認められず正常に成長し繁殖能力を得ていることから、不十分であった骨形成については孵化後に必要とされるミネラル分を補っている可能性があるが、今後検討が必要である。

#### 引用文献

- 1) PERRY, MM., 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature.*, 331 : 70-72.
- 2) 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.
- 3) 傍島英雄・松原悠子・鏡味 裕・田上貴寛・春海 貴・内藤 充, 2000. ニワトリ胚の体外培養システムにおけるアイガモ卵殻の利用. *日本家禽会誌*, 37 : 175-178.
- 4) 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—最初の孵化例—. *実験動物学会誌*, 40 : 251-254.
- 5) ROWLETT, K. and SIMKISS, K., 1987. Explanted embryo culture : in vitro and in ovo techniques for domestic fowl. *British Poultry Science.*, 28 : 91-101.
- 6) FREEMAN, BM. and VINCE, MA., 1974. Development of the avian embryo. 1974. Development of the avian embryo., Chapman and Hall, London, 237-248.
- 7) 黒川 清・鈴木正司・秋澤忠男・松本俊夫・塚本雄介, 1997. 腎と骨代謝ハンドブック 第1版. 日本メディカルセンター, 東京.
- 8) 藤田悠記・高橋俊介・宮田貴士・橋詰良一・伊藤雅夫, 2007. ニワトリ発生過程における骨形成に関するミネラル動態の検証. *日本畜産学会報*, 78, 印刷中.
- 9) 原口紘丞, 1998. ICP 発光分析の基礎と応用 第8版. 講談社, 東京, 109-157.
- 10) 河南保幸・苅田 淳, 1988. ニワトリの孵化期にみられる骨組織形成の特徴. *日本畜産学会報*, 59 : 311-318.
- 11) 河南保幸・米沢 勉・苅田 淳, 1984. ニワトリの前腕骨の組織形成と酵素分布の変化. *神戸大学農学部研究報*, 16 : 325-331.
- 12) 山口 朗・山名裕見・上野隆司・山崎 亨・立川哲彦・吉木周作・須田立雄, 1982. 鶏胚胚骨の形成過程に関する形態学的研究. *昭和歯学会雑誌*, 1 : 146-153.

# Influences of Surrogate Eggshell on Viability and Hatchability of Silkie Fowl Embryos Cultured *In vitro* and Dynamics of Minerals in Eggshell

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** : Using White Leghorn eggshell as a surrogate, silkie fowl embryos were cultured *in vitro*, and its influence on their viability was investigated. In addition, the mineral content of eggshell, which is involved in bone formation, was measured in normal silkie fowl and White Leghorn fertilized eggs on days 0 and 21 of incubation. In *in vitro* culture, silkie fowl embryos cultured in an incubator by the conventional method for 3 days were transferred into White Leghorn eggshell. The Ca, P, and Mg contents of eggshell of the normal eggs were measured by high-frequency plasma emission spectrochemical analysis on days 0 and 21 of incubation. Using White Leghorn eggshell in *in vitro* culture, some silkie fowl embryos hatched, but the hatchability was low, and changes in the viability suggested a lack of Ca supply from the eggshell. The content analysis of fertilized eggshell revealed that the Ca reduction rate from day 0 to day 21 was about 1.8 times higher in silkie fowl than in White Leghorn, suggesting a difference in Ca supply between the breeds. However, no major differences were noted in any other mineral content. These findings suggested that the reduction of hatchability in *in vitro* culture of silkie fowl embryos using White Leghorn eggshell was due to Ca mainly supplied from the eggshell. However, the growth of hatched embryos was normal, and they acquired reproductive ability.

**Key words** : Silkie fowl, White Leghorn, surrogate eggshell, *in vitro* culture, dynamics of minerals

---

\* Department of bioproduction, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture