

人工容器での培養開始時期がニホンウズラ胚の外部計測値とカルシウム及びマグネシウムの含有量に与える影響

福永一朗*・佐々木剛**・安藤元一**・君羅好史***・
上原万里子****・橋本光一郎*****・小川 博**

(平成 24 年 11 月 22 日受付/平成 25 年 3 月 11 日受理)

要約：希少鳥類を発生工学的な手法で増殖させる際に、人工容器による鳥類胚の培養は有用なツールになると考えられる。しかし、人工容器を用いて鳥類胚を胚盤葉期から培養し孵化させる方法は確立されていない。そこで本研究では、ニホンウズラを対象として人工容器培養した胚の形態、カルシウム (Ca) 及びマグネシウム (Mg) の含有量を調べた。人工容器による培養は、胚盤葉期または通常の孵卵を 60 時間行った後に開始した。培養液にはニワトリ水様性卵白 1.5 ml 中に乳酸カルシウム 35 mg または乳酸カルシウム 25 mg + ウズラ卵殻粉末 10 mg を添加したしたものを使用した。供試胚は、胚盤葉期から 60, 120, 240 及び 360 時間培養したのち、乾重量、全長、第 3 趾長、眼直径及び嘴峯長を計測した。対照群として操作を加えず通常孵卵した胚を用いた。胚の Ca と Mg 含有量は原子吸光分析法により測定した。胚の外部計測値は、120 時間まで全ての培養方法において差は認められなかった。しかしながら、360 時間では眼直径を除く全ての項目について、通常孵卵した胚に比べ人工容器で培養した胚で低い値を示した ($p < 0.05$)。また、乾重量、全長及び発生段階の値は、胚盤葉期から人工容器培養を開始した胚、孵卵 60 時間後から人工容器培養を開始した胚、通常孵卵した胚の順に大きくなり、人工容器での培養時間が長いほど低い値を示した ($p < 0.05$)。眼直径は胚盤葉期から培養した胚が最も低い値を示した ($p < 0.05$)。Ca と Mg の含有量は 120 時間まで全ての培養方法において差は認められなかったが、240 から 360 時間にかけて急激な増加を示し、360 時間においては人工容器で培養した胚が通常孵卵した胚に対して低い値を示した ($p < 0.05$)。しかしながら、人工容器による培養では、すべての調査項目において乳酸カルシウムと卵殻粉末の添加量の違いによる差は認められなかった。以上の結果から、本実験で用いた穴の開いていない人工容器による培養では、人工容器での培養を開始する時期に関係なく、乳酸カルシウムや卵殻粉末を添加しても胚成長に必要な Ca や Mg が充分吸収されないことが明らかとなった。

キーワード：人工容器、ニホンウズラ、胚培養、外部計測、カルシウム及びマグネシウム含有量

緒 言

鳥類の胚発生において卵殻は重要な役割を果たしている。すなわち、卵殻を構成する主要なミネラルは炭酸カルシウム 98.43%、炭酸マグネシウム 0.84%、リン酸カルシウム 0.73% であり¹⁾ 胚発生に必要なミネラルの 80% を卵殻から吸収している^{2,3)}。また、卵殻は卵殻孔から卵殻内外のガス交換を行っており、その調節機能も有している⁴⁾。そして、胚発生を安全に行うための器としての役割がある。このように鳥類胚にとって卵殻はミネラル供給源、ガス調整機能及び培養容器の 3 つの役割をもっている。

これまで、卵殻の役割を人工容器に代替させた培養法が検討されてきたが孵化個体は得られていない^{5,6)}。これらの研究で用いられた人工容器は、培養容器としての役割は果たしているものの、ミネラル供給源やガス調節の役割が果たせていなかったことが考えられる。しかし、KAMHIRA *et al.*⁷⁾ はニホンウズラを孵卵 48 時間後から人工容器で培養し、卵殻の主成分である炭酸カルシウムの代替として、乳酸カルシウムと卵殻粉末を卵白に添加することで 43% の孵化率を得ている。人工容器で培養した胚は、乳酸カルシウムや卵殻粉末を添加することで孵化率の向上が認められる⁷⁾ が、ミネラルを添加しても同じ培養日数における通

* 東京農業大学大学院農学研究科畜産学専攻

** 東京農業大学農学部バイオセラピー学科

*** 城西大学薬学部医療栄養学科

**** 東京農業大学応用生物科学部栄養科学科

***** 東京農業大学農学部畜産学科客員教授

常孵卵した胚に比べ体が小さいことがウズラ（乳酸カルシウム、卵殻粉末を添加⁷⁾）とニワトリ（炭酸カルシウムを添加⁸⁾）で報告されている。また、筆者らは人工容器で培養した胚と通常孵卵した胚の大きさを同じ発生段階（ステージ45）で死亡した胚において比較し、乳酸カルシウムを添加したにもかかわらず人工容器で培養した胚は通常孵卵した胚よりも小さいことや胚盤葉期から人工容器で培養した胚は孵卵60時間後から培養した胚よりも小さいことを報告⁹⁾している。

そこで本研究では、乳酸カルシウムと卵殻粉末を添加する量や人工容器での培養開始時期が胚の成長やカルシウム(Ca)及びマグネシウム(Mg)含有量にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

材料及び方法

(1) 供試卵

ニホンウズラの受精卵は、株式会社モトキ (Saitama, Japan) より購入したものを実験に供試した。

(2) 培養容器

本実験で使用した培養容器を図1に示した。50ml ポリプロピレン製チューブ (BD Falcon Conical Tube ; Nihon BD Co, Tokyo, Japan) に培養器内の乾燥を防ぐため滅菌蒸留水を35ml入れた後、多孔性でガス透過性のあるポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製の膜 (Milliwrap ; Nihon Millipore Co, Tokyo, Japan) を袋状に取り付けたものを培養容器とした。上蓋としてポリ塩化ビニリデン製フィルム (Saran Wrap ; Asahi Kasei Life and Living Co, Tokyo, Japan) を用いた。なお、空気層は容器の開口部から5~7mm設けた。なお、培養容器の材料はオートクレーブにより滅菌処理 (121℃, 20分) を施した。

(3) 胚培養

人工容器による培養開始時期は、胚盤葉期 (放卵直後) または孵卵60時間後とした。培養液は KAMIHIRA *et al*⁷⁾ を参考に、乳酸カルシウム (Sigma-Aldrich Co, Tokyo, Japan) 35mg または乳酸カルシウム 25mg+ウズラの卵殻粉末 10mg をニワトリの水様性卵白 (1.5ml) に添加したものを使用した。また、対照群として操作を加えず通常孵卵した胚を用いた。なお、ウズラの卵殻粉末は、卵殻膜を除去し乾

熱処理 (121℃, 30分) を施した後、乳鉢ですりつぶしたものを使用した。胚は、孵卵器 (Type P-008 ; Showa Furanki Co, Tokyo, Japan) を用いて 38.0℃, 湿度 60%, 転卵 60°/時間の条件下で培養した。また、培養開始 60, 120, 240 及び 360 時間後に生存しておりかつ奇形のない胚を回収しサンプルとした。

(4) 胚の外部計測

採取した胚は、卵黄を除去したのち発生ステージ、全長、第3趾長、眼直径、嘴峯長及び乾重量を測定した。胚の発生段階 (ステージ) は、HAMBURGER and HAMILTON¹⁰⁾ の発生段階表を参考にして決定した。

(5) 胚のカルシウム及びマグネシウム含有量の測定法

供試した胚は、凍結乾燥機にて重量変化がなくなるまで乾燥したのち有機物を分解する湿式灰化を施した。すなわち、胚を灰化用試験管に移した後、濃硝酸を4ml入れ、ドライバスで加熱 (100℃, 24時間) し内容を乾固させた。冷却後、同じ灰化用試験管に過酸化水素水を2ml入れドライバスで加熱 (100℃, 24時間) し再び内容を乾固させた。湿式灰化後、0.8Mの塩酸を用いて分析部位ごとに適した希釈率にサンプルを希釈調整した。その後サンプルの全量に対し、10%量の1%塩化ランタンを加え夾雑物を除く処理を施し、原子吸光度計 (AA-640-13 ; Shimadzu Co, Tokyo, Japan) により胚のCa及びMg量を測定した。

(6) 統計処理

外部計測値、発生ステージ、CaとMgの含有量及び濃度は、同一時間内または同一実験区内で One-way ANOVA 後、Scheffe's multiple comparison test を用いて統計処理を行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

結 果

(1) 発生ステージ

胚の発生ステージを図2(A)に示した。同一培養実験区内ではいずれの区分においても60から120時間、120から240時間及び240から360時間にかけて有意な成長が認められた ($p < 0.05$)。同一培養時間内では60時間と120時間において各実験区間に差は認められなかったが、240時間と360時間では、通常孵卵した胚に比べ人工容器で培養した胚は発生段階が遅れていた ($p < 0.05$)。また、240時間と360時間において孵卵60時間後から培養した胚に比べ、胚盤葉期から培養した胚は発生段階が遅れていた ($p < 0.05$)。一方で、乳酸カルシウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

(2) 胚乾重量

胚の乾燥重量を図2(B)に示した。同一培養実験区内ではいずれの区分においても60から120時間にかけて増加は認められなかった。しかし、120から240時間及び240から360時間にかけては有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。同一培養時間内では60時間と120時間において各実験区

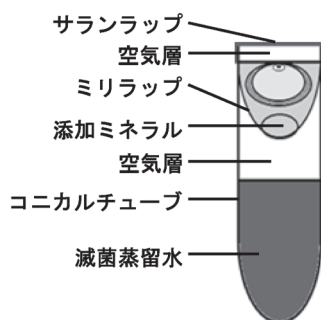


図1 培養に用いた人工容器

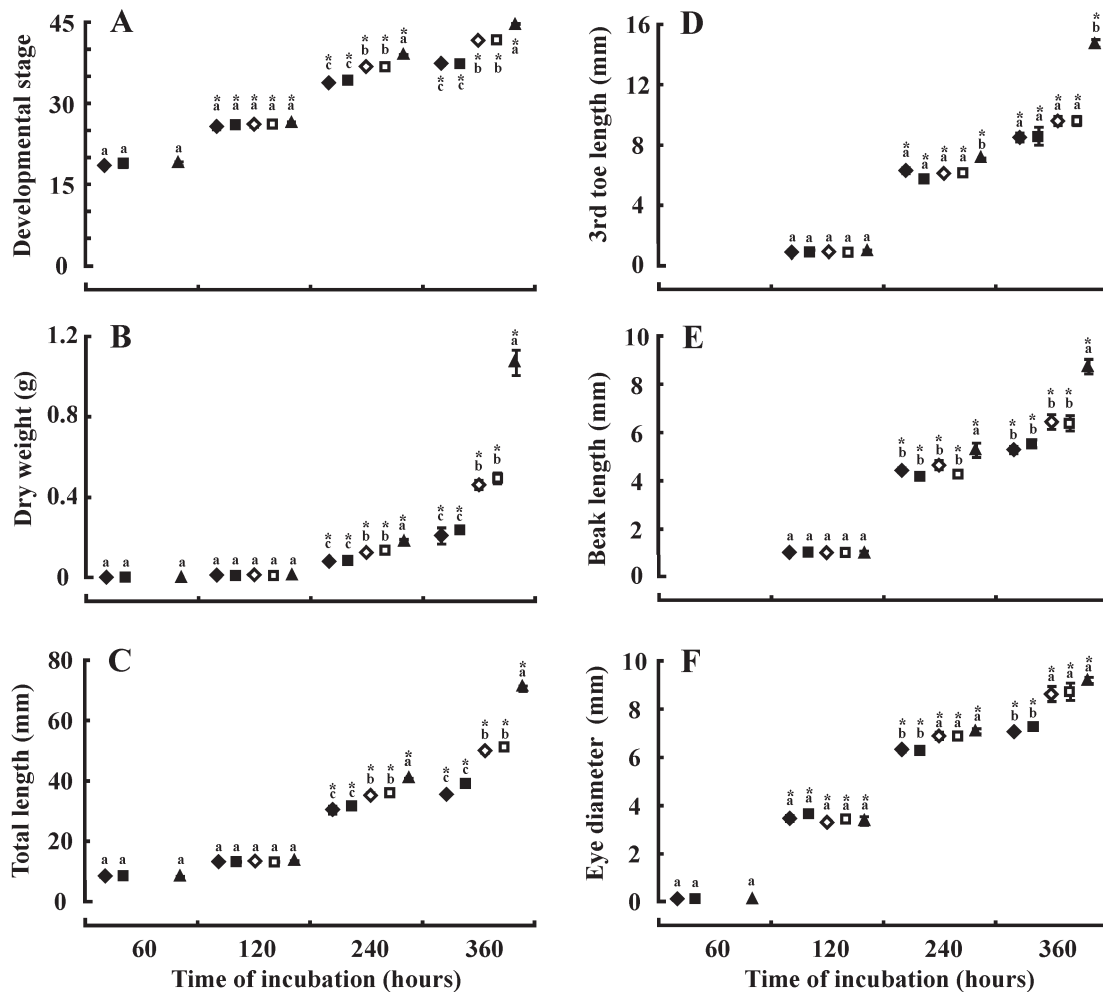


図2 ニホンウズラ胚の (A) 発生ステージ, (B) 乾燥重量, (C) 全長, (D) 第3趾長, (E) 嘴峯長及び (F) 眼直径
 ◆: 胚盤葉期, 乳酸カルシウム 35mg (n=5); ■: 胚盤葉期, 乳酸カルシウム 25mg+卵殻粉末 10mg (n=5); ◇: 孵卵 60 時間後, 乳酸カルシウム 35mg (n=5); □: 孵卵 60 時間後, 乳酸カルシウム 25mg+卵殻粉末 10mg (n=5); ▲: 通常孵卵した胚 (n=5). 各点及びバーは平均値±標準誤差. 同一時間内において異文字間 (a-b-c-d) に有意差あり ($p < 0.05$). *: 同一実験区の前測定値に対して有意差あり ($p < 0.05$).

間に差は認められなかったが, 240 時間と 360 時間では, 通常孵卵した胚に比べ人工容器で培養した胚は有意に軽かった ($p < 0.05$). また, 240 時間及び 360 時間においては孵卵 60 時間後から培養した胚に比べ, 胚盤葉期から培養した胚は有意に軽かった ($p < 0.05$). 一方で, 乳酸カルシウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

(3) 全長

胚の全長を図 2 (C) に示した。同一培養実験区内ではいずれの区分においても 60 から 120 時間, 120 から 240 時間及び 240 から 360 時間にかけて有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。同一培養時間内では 60 時間と 120 時間において各実験区間に差は認められなかったが, 240 時間と 360 時間では, 通常孵卵した胚に比べ人工容器で培養した胚は有意に短かった ($p < 0.05$)。また, 240 時間と 360 時間においては孵卵 60 時間後から培養した胚に比べ, 胚盤葉期から培養した胚は有意に短かった ($p < 0.05$)。一方で, 乳

酸カルシウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

(4) 第3趾長

胚の第3趾長を図 2 (D) に示した。第3趾長については 60 での計測が出来なかったため 120 時間以降の測定とした。同一培養実験区内ではいずれの区分においても 120 から 240 時間及び 240 から 360 時間にかけて有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。同一培養時間内では 120 時間において各実験区間に差は認められなかったが, 240 時間と 360 時間では, 通常孵卵した胚に比べ人工容器で培養した胚は有意に短かった ($p < 0.05$)。また, 全ての時間において人工容器での培養開始時期による差は認められなかった。一方で, 乳酸カルシウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

(5) 嘴峯長

胚の嘴峯長を図 2 (E) に示した。嘴峯長については 60

時間での計測が出来なかったため 120 時間以降の測定とした。同一培養実験区内ではいずれの区分においても 120 から 240 時間及び 240 から 360 時間にかけて有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。同一培養時間内では 120 時間において各実験区間に差は認められなかったが、240 時間と 360 時間において通常孵卵した胚に比べ人工容器で培養した胚は有意に短かった ($p < 0.05$)。また、全ての時間において人工容器での培養開始時期による差は認められなかった。一方で、乳酸カルシウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

(6) 眼直径

胚の眼直径を図 2 (F) に示した。同一培養実験区内ではいずれの区分においても 60 から 120 時間、120 から 240 時間及び 240 から 360 時間にかけて有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。同一培養時間内では 60 時間と 120 時間において各実験区間に差は認められなかったが、240 時間と 360 時間では、通常孵卵した胚や孵卵 60 時間後から人工容器で培養した胚に比べ胚盤葉期から人工容器で培養した胚は有意に小さかった ($p < 0.05$)。一方で、乳酸カルシウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

(7) カルシウム濃度・含有量

胚のカルシウム濃度を図 3 (A) に示した。同一培養実験区内ではいずれの区分においても 60 から 120 時間にかけて増加は認められなかった。しかし、120 から 240 時間

及び 240 から 360 時間にかけて有意な濃度の上昇が認められた ($p < 0.05$)。同一培養時間内では 60、120 及び 240 時間において各実験区間に差は認められなかったが、360 時間では通常孵卵した胚に比べ人工容器で培養した胚は有意に低かった ($p < 0.05$)。また、全ての時間において人工容器での培養開始時期による濃度の差は認められなかった。一方で、乳酸カルシウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

胚のカルシウム含有量を図 3 (B) に示した。同一培養実験区内ではいずれの区分においても 60 から 120 時間にかけて増加は認められなかった。しかし、120 から 240 時間及び 240 から 360 時間にかけて含有量の上昇が認められた ($p < 0.05$)。同一培養時間内では 60、120 及び 240 時間において各実験区間に差は認められなかったが、360 時間では通常孵卵した胚に比べ人工容器で培養した胚は有意に低かった ($p < 0.05$)。また、全ての時間において人工容器での培養開始時期による差は認められなかった。一方で、乳酸カルシウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

(8) マグネシウム濃度・含有量

胚のマグネシウム濃度を図 3 (C) に示した。同一培養実験区内ではいずれの区分においても 60 から 120 時間及び 240 から 360 時間にかけて濃度の減少は認められなかったが、120 から 240 時間にかけて有意な濃度の減少が認められた ($p < 0.05$)。同一培養時間内では全ての時間において各実験区間に差は認められなかった。一方で、乳酸カルシ

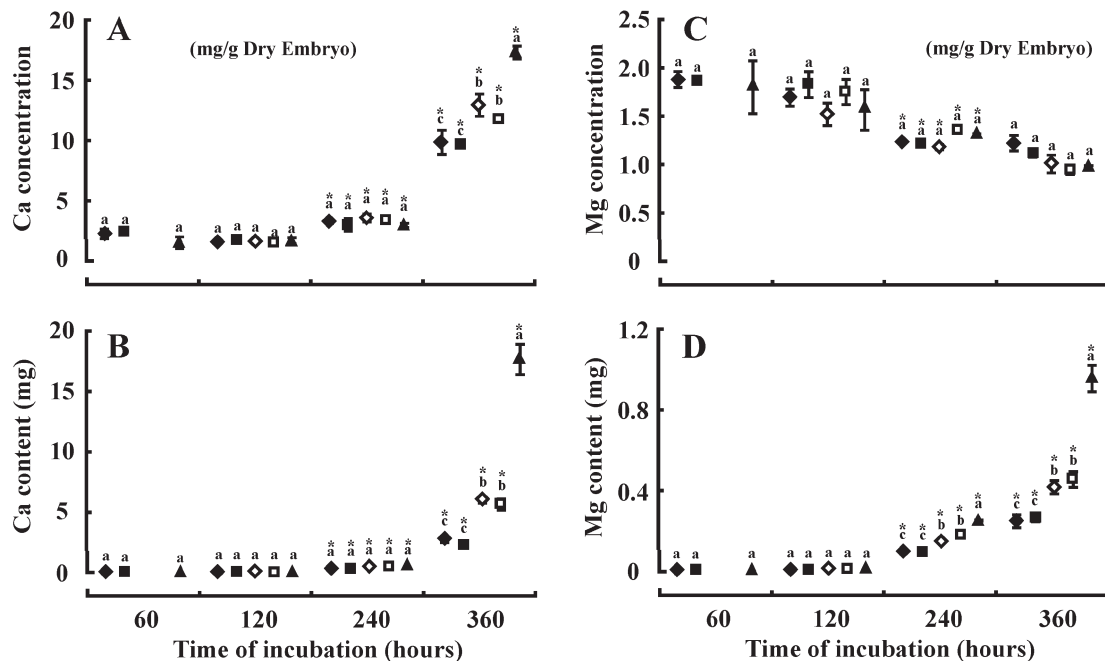


図 3 ニホンウズラ胚の (A) カルシウム濃度, (B) カルシウム含有量, (C) マグネシウム濃度及び (D) マグネシウム含有量
 ◆: 胚盤葉期, 乳酸カルシウム 35mg (n=5); ■: 胚盤葉期, 乳酸カルシウム 25mg + 卵殻粉末 10mg (n=5); ◇: 孵卵 60 時間後, 乳酸カルシウム 35mg (n=5); □: 孵卵 60 時間後, 乳酸カルシウム 25mg + 卵殻粉末 10mg (n=5); ▲: 通常孵卵した胚 (n=5). 各点及びバーは平均値 ± 標準誤差. 同一時間内において異文字間 (a-b-c-d) に有意差あり ($p < 0.05$). *: 同一実験区の前測定値に対して有意差あり ($p < 0.05$).

ウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

胚のマグネシウム含有量を図3(D)に示した。同一培養実験区内ではいずれの区分においても60から120時間にかけて増加は認められなかったが、120から240時間及び240から360時間にかけて有意な増加が認められた($p < 0.05$)。同一培養時間内では60時間と120時間において各実験区間に差は認められなかったが、240時間と360時間では、通常孵卵した胚に比べ人工容器で培養した胚は有意に含有量が低かった($p < 0.05$)。また、240時間において孵卵60時間後から培養した胚に比べ、胚盤葉期から培養した胚は有意に低かった($p < 0.05$)。しかし、120時間と360時間においては人工容器での培養開始時期による差は認められなかった。一方で、乳酸カルシウムや卵殻粉末の添加量の違いによる実験区間での差は認められなかった。

考 察

ニワトリ胚の卵殻外培養法としてPERRYによって開発された代理卵殻法¹¹⁾は、受精直後から孵化までをSystem I(受精直後-放卵直前)、System II(放卵直後-孵卵72時間)、System III(孵卵72時間-孵化)の3段階に分け培養する方法である。この代理卵殻法を発展させた方法として人工容器による培養法が検討されている。

ウズラ⁷⁾やニワトリ⁸⁾において、PERRY¹¹⁾の代理卵殻法におけるSystem IIIに相当する段階から人工容器で培養すると乳酸カルシウムや炭酸カルシウムを添加した場合でも通常孵卵した胚に比べて胚の重量が軽いことが報告されている。本研究では乳酸カルシウムと卵殻粉末の添加を行い、時間毎に培養胚の外部計測を行った。その結果(図2A~F)、人工容器での培養開始時期に関係なく、発生開始120から360時間にかけて胚の急激な成長が認められた。この胚の急激な成長は、通常孵卵した胚、人工容器や代理卵殻で培養されたウズラ胚⁶⁾における体重や第3趾長の急激な成長と同様の推移であった。一方、眼直径を除く全ての計測部位において、120時間までは人工容器培養胚と通常孵卵した胚の間に差は認められなかったが、発生開始240時間以降では人工容器培養胚は通常孵卵した胚よりも小さく発生が遅れていた。また、胚盤葉期から人工容器で培養した胚は、発生開始240時間以降に乾燥重量、全長、眼直径及び発生ステージの値が孵卵60時間後から培養した胚よりも有意に低い値を示した。

低酸素中で培養した胚は体重及び内臓重量が低いことが報告されている¹²⁾。本研究では、穴のない人工容器を用いてウズラ胚の培養を行ったことから空気の供給やガス交換ができておらず、その結果、人工容器中の二酸化炭素濃度の上昇または、酸素濃度が低下した可能性が考えられた。しかしながら、代理卵殻を用いた培養においても通常孵卵した胚に比べ培養胚は重量が軽いことが報告されており^{6,7,13)}、酸素の供給不足以外にも胚重量に影響を及ぼす要因があるものと考えられる。

一方で、眼直径については孵卵60時間後から人工容器で培養した胚と通常孵卵した胚との間に差が認められな

かったのに対し、胚盤葉期から培養した胚は通常孵卵した胚や孵卵60時間後から培養した胚よりも有意に小さかった。眼は外胚葉から分化し¹⁴⁾その形成を6日目ではほぼ完了すること¹⁵⁾、ウズラにおいて胚(外胚葉)を保護する羊膜の形成が発生開始約60時間後に完了する^{16,17)}ことから、培養開始時期の違いによる眼直径の差については、培養初期に気層やミリラップが羊膜に保護されていない胚(外胚葉)に接触しダメージを与えるのに対し、孵卵60時間後から培養した場合には胚が羊膜により保護されていることが原因ではないかと考えられた。

鳥類における発生中のCaやMg等のミネラル動態については、ニホンウズラ⁸⁾やニワトリ³⁾において調べられており、10日目(120時間)から15日目(360時間)、14日目から21日目にかけてそれぞれ胚のCaやMg含有量の急激な増加が認められている。またこの時期は、ウズラ¹⁸⁾やニワトリ^{19,20)}の骨組織形成において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や軟骨に石灰化が認められるようになる時期と一致している²¹⁾。以上のように、ウズラの発生過程において発生開始120時間以降は軟骨組織へのカルシウム沈着に伴うミネラルの必要性が増す時期であると考えられる。また、卵殻は鳥類の胚発生において重要なミネラル源であり孵化に必要なミネラルの約80%を供給している^{2,3)}。このため、卵殻を用いない人工容器培養においては発生に必要なカルシウムを供給し、孵化率を向上させる目的で乳酸カルシウムや炭酸カルシウムを添加している^{7,8)}。また、KAMIHIRA *et al*は、ウズラ胚の人工容器培養において乳酸カルシウムの添加量(0, 25, 35, 45 mg)が孵化率に与える効果を調べ、25 mgと35 mg添加した場合に高い孵化率が得られることを報告⁷⁾している。本研究では、KAMIHIRA *et al*の報告⁷⁾において孵化率が高かった乳酸カルシウムと卵殻粉末の添加量を参考にして乳酸カルシウムと卵殻粉末を添加し培養を行ったが、胚のCa濃度、Ca含有量及びMg含有量は、人工容器での培養開始時期に関係なく、発生開始120から360時間にかけての増加が認められ、この推移は人工容器や代理卵殻でウズラ胚を培養し、培養が進むにつれ胚のCa含有量やMg含有量が増加するという報告⁶⁾と同様の傾向であった。しかし、120時間以降のCaやMg含有量の増加は認められたものの、通常孵卵した胚と比較するといずれも低い値を示した。また、卵殻粉末の添加、無添加にかかわらず胚のMg含有量に差は認められず、通常孵卵した胚よりも低い値を示した。このことから、人工容器による培養では120時間以降の骨形成に必要なミネラルを胚が十分に吸収できていない可能性が示された。

本研究の結果から、穴のない人工容器を用いた培養ではガス交換ができていない可能性が示され、このことから空気穴を培養容器に開けることで培養環境が改善される可能性が考えられた。また、胚が尿漿膜で保護されていない胚盤葉期からの培養において、外胚葉が気層やミリラップからダメージを受け胚の成長に影響を与えている可能性も示されたことから、胚盤葉期からの培養における胚へのダメージを軽減することが必要であると考えられた。

今後は、添加した乳酸カルシウムや卵殻粉末がなぜ胚に吸収されないのか、その原因の究明が望まれる。

引用文献

- 1) ROMANOFF A L, ROMANOFF A J. 1949. Chapter six CHEMICAL COMPOSITION. In : The Avian Egg. New York : JOHN WILEY & SONS, INC. p 311-364.
- 2) JOHNSTON P M, COMAR C L. 1955. Distribution of calcium from the albumen, yolk and shell to the developing chick embryo. *Am J Physiol.* **183** : 365-370.
- 3) 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. *日畜会報.* **78** : 155-160.
- 4) ROMANOFF A L, ROMANOFF A J. 1949. Chapter seven PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES. In : The Avian Egg. New York : JOHN WILEY & SONS, INC. p 367-490.
- 5) ONO T, WAKASUGI N. 1983. Development of cultured quail embryos. *Poult Sci.* **62** : 532-536.
- 6) ONO T, WAKASUGI N. 1984. Mineral content of quail embryos cultured in mineral-rich and mineral-free conditions. *Poult Sci.* **63** : 159-166.
- 7) KAMIHARA M, OGUCHI S, TACHIBANA A, KITAGAWA Y, IJIMA S. 1998. Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Dev Growth Differ.* **40** : 449-455.
- 8) 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. 2007. 代用卵殻環境が培養ニワトリ胚の発生に及ぼす影響. *東京農大農学集報.* **52** : 115-119.
- 9) 福永一郎, 橋本光一郎, 安藤元一, 天野 卓, 小川 博. 2008. 人工卵殻環境下におけるウズラ胚の奇形発生について. *日本家禽学会秋季大会発表.*
- 10) HAMBURGER V, HAMILTON H L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* **88** : 49-92.
- 11) PERRY M M. 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature.* **331** : 70-72.
- 12) RUIJTENBEEK K, LE NOBLE F A C, JANSSEN G M J, KESSELS C G A, FAZZI G E, BLANCO C E, DE MEY J G R. 2000. Chronic hypoxia stimulates periarterial sympathetic nerve development in chicken embryo. *Circulation.* **102** : 2892-2897.
- 13) 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. 2007. ウコッケイ胚の対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. *東京農大農学集報.* **52** : 120-124.
- 14) ROMANOFF A L. 1960. Organ-forming potencies in the avian blastoderm. In : The Avian Embryo. New York : The Macmillan Company. p 179-184.
- 15) 蕪澤圭二郎, 内藤 充, 大石孝雄. 1992. ウズラ初期胚のニワトリ卵殻を用いた培養. *家禽会誌.* **29** : 139-144.
- 16) ZACCHCI A M. 1961. Lo sviluppo embrionale della quagliac-giapponese (*Coturnix coturnix japonica T. e S.*). *Arch Ital Anat Embriol.* **66** : 36-62 (in Italian).
- 17) KAWASHIMA T, ISHIGURO S, AIKAWA R, TAMAKI Y, OGAWA H, HASHIMOTO K. 2002. Factors affecting successful hatching in avian embryo culture system. *J Reprod Dev.* **48** : 137-142.
- 18) NAKANE Y, TSUDZUKI M. 1999. Development of the skeleton in Japanese quail embryos. *Dev Growth Differ.* **41** : 523-534.
- 19) 河南保幸, 米沢 勉, 菊田 敦. 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.
- 20) 河南保幸, 菊田 敦. 1988. ニワトリの孵化期にみられる骨組織形成の特徴. *日畜会報.* **59** : 311-318.
- 21) 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. 鶏胚脛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.

The Different Starts and Effects of Embryo Culture System Using an Artificial Vessel on the Quail Embryo's External Measurement, Magnesium and Calcium Contents

By

Ichiro FUKUNAGA*, Takeshi SASAKI**, Motokazu ANDO**, Yoshifumi KIMIRA***,
Mariko UEHARA****, Koichiro HASHIMOTO***** and Hiroshi OGAWA***

(Received November 22, 2012/ Accepted March 11, 2013)

Summary : Avian embryos rely on the eggshell as their source of calcium, and the eggshell supplies about 80% of the calcium required for development and hatching. Therefore, the supply of calcium is a necessary condition for development and hatching in shell-less culture using an artificial vessel. In this study, we measured external measurements, calcium and magnesium contents of Japanese quail embryos cultured *in vitro* using an artificial vessel. Embryo culture was started from the blastoderm stage and 60 hours after incubation in the intact eggshell. The culture medium was chicken thin albumen supplemented with 35 mg calcium lactate or 25 mg calcium lactate +10 mg quail eggshell powder. Intact eggs incubated in an incubator were used as control. The embryos were measured, as well as dry body weight, total length, third toe length, eye diameter, beak length, and mineral content at 60, 120, 240, and 360 hours after culture from the blastoderm stage. Calcium and magnesium contents were measured by atomic spectrophotometry. The physical dimension values showed no differences among the groups until 120 hours. At 360 hours of culture, the *in vitro* culture group showed lower values ($p < 0.05$) compared with the control group for all dimensions except eye diameter. Moreover, in dry weight, total length, and developmental stage, the embryo was the smallest when cultured *in vitro* at the blastoderm stage, followed by the embryo cultured *in vitro* at 60 h, and control group ($p < 0.05$). It was shown that the longer the embryo was cultured *in vitro*, the smaller was the embryo size. Eye diameter was the smallest ($p < 0.05$) in embryos cultured *in vitro* from the blastoderm stage. Calcium and magnesium contents did not differ significantly between the groups until 120 hours of culturing. Rapid increase in calcium and magnesium was observed from 240 to 360 hours, and embryos cultured *in vitro* had lower content than control embryos ($p < 0.05$). However, no significant difference was observed in the external measurement for the calcium lactate and eggshell powder addition group. The above results revealed that in spite of calcium lactate and eggshell powder addition to the *in vitro* culture using non air vent artificial vessel, calcium and magnesium were not sufficiently absorbed for embryonic development.

Key words : artificial vessel, Japanese quail, embryo culture, external measurement, Calcium and Magnesium content

* Department of Animal Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Human and Animal-Plant Relationships, Tokyo University of Agriculture

*** Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition

**** Department of Nutritional Science, Tokyo University of Agriculture

***** Affiliate professor, Department of Animal Science, Tokyo University of Agriculture