〔総説〕

ニワトリ受精卵（胚）の体外培養と初期胚操作

内 藤 充

農林水産省畜産試験場

茨城県筑波農林研究団地内局私書箱 5 号, 305

Chick Embryo Culture and its Application to
Embryo Manipulation

Mitsuru Naito

National Institute of Animal Industry,
Tsukuba Norindanchi P.O.Box 5, Ibaraki 305

は じ め に

最近のバイオテクノロジー関係の研究は、基礎研究が比較的応用に結びつきやすいこともあり、極めて盛んに行われるようになってきた。畜産の分野ではこれまで主として哺乳動物について研究されてきたが、鳥類であるニワトリについてはその発生学的な特性から、この分野においてはやや遅れをとっていた感がある。それは、胚が多量の卵黄を含み、また、発生の大半が卵殻内で行われるため、体外に取り出して操作をされた胚の発生を正常に行わせることが困難であったことによる。しかし、最近になっていくつかの基礎技術の開発が行われ、ニワトリにおいてもバイオテクノロジー関係の研究が可能となってきた。本稿では、ニワトリ胚操作研究の基礎技術となる受精卵（胚）の培養法と、最近における胚操作研究について概説する。

1. ニワトリ受精卵（胚）の初期発生過程

ニワトリ胚の初期発生については水野（1989）により詳しく解説されているが、その概要は次のとおりである。ニワトリの卵巣には12,000個以上の卵母細胞が存在している。卵母細胞は顆粒層によって取り囲まれ、卵胞を形成している。産卵中のニワトリでは、卵胞は順次栄養物質である卵黄を蓄積して急速に大きくなる。卵母細胞は成熟すると細胞核の分裂（減数分裂）が進行し、第1極体を放出して卵娘細胞となり排卵される。排卵された卵娘細胞（卵子）は卵管に取り込まれ、卵管漏斗部で排卵

後約15分以内に精子の侵入を受け受精する（Olsen & Neher, 1948）。ニワトリでは多精子受精となる（Perry, 1987）。排卵されたときには卵子の卵黄膜は内層のみよりなっているが、受精後、連続膜と外層が形成され3層より構成されるようになり、卵黄膜が完成する。受精後、卵子は第2極体を放出し、雌性前核を形成する。侵入した精子はそれぞれ雄性前核を形成し、そのうちの1つが雌性前核と融合して受精は完了する。

最初の細胞の分割は、排卵後約4時間30分の、卵が卵管峡部にあるときに起こる（Perry, 1987）。ニワトリでは盤割となり、胚盤の中心に狭い溝ができることにより細胞の分割が行われる。胚は卵が卵管峡部にある間に4～8細胞期に達し、卵管子宮部に入り4時間以内に256細胞期にまで発生が進む。そして、放卵されるときには細胞数は約60,000に達する（Spratt & Haas, 1961a; McMaster & Modak, 1977; Stepinska & Olszanska, 1983）。この頃の様子は胚盤葉期とよばれ、肉眼的には中央部の明域と周辺部の暗域とにより構成されるリングが観察される。無精卵ではこのリングが観察されず全体に白く見える。胚盤の細胞は多層で、卵黄との間に胚盤下腔とよばれる空間ができる。この後、胚は胚盤葉上層と胚盤葉下層に分離し、両者の間に割腔を形成する（Romanoff, 1960）。放卵は胚盤葉下層が形成され始める頃に起こり、その後、原条が形成され、さらに胚盤葉は上中下の三重構造をとり三胚葉が形成される。そして、胚の形成、成長の過程を経て、排卵から22日目に孵化する。

2. ニワトリ受精卵（胚）の体外での培養

ニワトリ受精卵（胚）の体外培養法は、これまで主として卵殻外培養法について研究されてきた（Corner & Richter, 1973; Auerbach *et al.*, 1974; Dunn, 1974; Dunn & Boone, 1976, 1977; Dunn & Fitzharris, 1979; Tuan, 1980; Slavkin *et al.*, 1980; 渡辺と井村, 1983; Rowlett & Simkiss, 1987, 1989; Rowlett, 1991）。この方法では3日間孵卵した受精卵（胚）をシャーレや台所用ラップなどに移して培養するもので、初期の胚発生の観察に用いられてきた。しかし、培養の中期以降は明らかな発生の遅延と生存率の急速な低下が起り、孵化させることは不可能であった。このことは、これらの卵殻外培養では正常な胚発生が行われていないことになり、発生の中期以降の観察には必ずしも適していないといえる。その理由は大きく2つ考えられる。1つは呼吸の問題である。胚は発生の19日目頃までは漿膜と尿膜の融合した、いわゆる漿尿膜と、そこに分布する毛細血管を通して酸素の取り込みと二酸化炭素の放出を行う（Rowlett & Simkiss, 1985）。そして、それ以降、少しずつ肺呼吸に移っていく。しかし、これまで行われてきた卵殻外培養法では漿尿膜の発達が不十分なため、呼吸作用が十分に行われないことが考えられる。もう1つはカルシウムの取り込みの問題である。胚が利用するカルシウムは胚の栄養分としての卵黄や卵白中に含まれているが、これだけでは不十分で、約80%は卵殻のカルシウムを利用することになる（Rowlett & Simkiss, 1985）。卵殻のカルシウムの取り込みもまた漿尿膜を通して行われ、血液を介して胚に運ばれるが、卵殻外培養法ではカルシウム不足による胚発生の遅延がみられるようになる。外からカルシウムを補っても十分な発育促進効果は得られない（Dunn *et al.*, 1987; 後藤ら, 1988）ことから、卵殻外培養法で孵化させることは極めて困難であると考えられる。

最近になって Ono & Wakasugi (1984) は、2.5日間孵卵したウズラ受精卵（胚）をニワトリ卵殻内で培養し孵化させることに成功した。また、Rowlett & Simkiss (1987) は3日間孵卵したニワトリ受精卵（胚）を七面鳥やニワトリ卵殻に移して培養することにより孵化させることに成功した。この2つの成功例ではいずれも胚形成が完了したステージから培養を開始したものであるが、卵殻を培養器として用いたことにより漿尿膜が正常に発達し、呼吸作用や卵殻からのカルシウムの取り込みが十分に行われた結果、胚を培養下で孵化させることに成功したものと考えられる。Perry (1988) は分割の始まっていない1細胞期の受精卵（胚）をニワトリの

体内（卵管膨大部）から取り出し、体外培養法と卵殻を用いた培養法を組み合わせることにより孵化させることに世界で初めて成功した。これによりニワトリにおいて1細胞期からの胚操作が可能になった。また、この方法は卵管子宮部から取り出した16～64細胞期のニワトリ受精卵（胚）の体外培養にも応用できることが示された（Naito & Perry, 1989）。

最近 Naito *et al.* (1990b) は孵化率が7%と低かった Perry (1988) の体外培養法を改良し、1細胞期からのニワトリ受精卵（胚）の体外での培養で34.4%の高い孵化率を得ることに成功した。この方法の開発により、ニワトリ受精卵（胚）の体外での培養法は実用段階に達することとなり、細胞レベルや遺伝子レベルにおける胚操作研究に応用されている。特に、胚の操作を正確に行い、また操作胚を高率に孵化させるためには、この体外培養法は必須の手法となっている。

3. ニワトリ受精卵（胚）の1細胞期から孵化までの体外での培養法

ここでは改良されたニワトリ受精卵（胚）の体外での培養法（Naito *et al.*, 1990b）について述べる。あらかじめ人工授精しておいた雌ニワトリを、放卵後2時間45分（排卵後約2時間15分）に屠殺し、卵管膨大部より濃厚卵白形成途中の未分割の受精卵（胚）を取り出す。受精卵（胚）の培養法は図1に示した3つのシステムにより構成される（Pery, 1988; Naito *et al.*, 1990b; Perry & Mather, 1991）。取り出した受精卵（胚）を卵黄と卵白が分離しないように注意しながらガラス瓶に移し、培養液（水様性卵白と塩類溶液を3:2に混合したもの、Perry, 1988）を入れ、ラップでガラス瓶の口を密封する。これを41.5℃で24時間静置して培養する。このとき胚盤が卵黄の真上に位置するようにし、また胚盤が培養液に沈まないようにする（システムI, Perry, 1988）。通常の産卵後のステージ（胚盤葉期）まで発生が進んだ段階で受精卵（胚）より濃厚卵白と培養液を除去し（Naito *et al.*, 1990b）卵黄部分のみを卵殻に移す。そして卵殻に水様性卵白を満たし、卵殻の口をラップで密封し、保定リングで固定する。この状態で、38℃、湿度60%で90度の角度で転卵（15分に1回）しながら3日間培養する（システムII）。このステージの培養では、胚が直接空気に接触するのを避ける必要がある。そのため卵殻の鈍端部に形成される気室を残すことにより、培養中の水分の減少による内容量の減少分を気室が大きくなって吸収し、空気の侵入を防ぐことができる。これにより胚が空気と直接接触することがなくなり、正常な胚

図1. ニワトリ受精卵(胚)の体外培養システム

形成が行われる。Hamburger & Hamilton (1951)のステージで18に達した頃に、システムⅡの卵内容物をラップにくるんで別の大きな卵殻に移す (Rowlett & Simkiss, 1987)。そして、卵殻の口をラップで密封した後、38℃、湿度60%で30度の角度で転卵(1時間に1回)しながら14日間培養する(システムⅢ)。その後は発生座に移し、37.6℃、湿度70%で、静置して孵化までの4日間培養する。培養の21日目頃より胚は嘴を上に向け胚呼吸を始めるので、ラップに針で小さな穴をいくつか開け呼吸を助ける。漿尿膜に分布している血管から血液がなくなると孵化するので、その少し前にラップを取り除き、乾燥を防ぐためペトリ皿をかぶせる。培養の22日目に孵化する。

上記の方法を用いて32個の受精卵(胚)を処理した結果、システムⅠの培養終了後約85%は胚盤葉期への発生が認められた。生存率は培養の4日目81.3%、8日目65.6%、15日目65.6%、19日目59.4%、21日目40.6%となり、孵化率は34.4%(11羽孵化)であった。比較のためにシステムⅡの培養に移す際に濃厚卵白を除去しない方法(Perry, 1988)を用いて同様に処理したところ、生存率は培養の4日目56.8%、8日目37.8%、15日目37.8%、19日目35.1%、21日目21.6%となり、孵化率は

16.2%であった。このことは、システムⅡの培養で濃厚卵白を除去し水様性卵白と入れ替えることにより、培養4日目の生存率を約25%高めることができたと同時に、その後の胚の生存性には濃厚卵白除去の影響は全くみられていないことを示している。システムⅠの培養を終了したときの濃厚卵白は非常に柔らかく、また静置した培養であるためカラザが正常に形成されておらず、濃厚卵白の付いた状態でシステムⅡの卵殻内に卵内容物を移すと濃厚卵白の一部が壊れて卵黄と分離するもの多くみられるようになる。そのため本来ならば比重の関係で卵黄の真上に位置する胚盤が斜め方向や横方向に向いてしまい、胚盤が培養液に沈んだ状態で培養することになってしまう。このような状態では、おそらく呼吸が妨げられるためと思われるが、正常な胚形成が行われず、発生の初期に死ぬもの多くみられるようになる。しかし、濃厚卵白を除去し卵黄部分のみを卵殻に移して水様性卵白中で培養することにより胚盤は確実に卵黄の真上に位置するようになり、胚形成が正常に行われるようになった。このことが Naito *et al.* (1990b)の方法を用いることにより、生存率と孵化率が大幅に向上した大きな理由と思われる。胚の形成、成長や孵化にとって濃厚卵白が必須のものでないことは、産卵後の受精卵(胚)を用いた培養実験からも同様に確かめられた。この体外培養法によって孵化した雛は、その後正常に成長し、通常のニワトリと全く変わらない繁殖成績を示した (Naito *et al.*, 1990b)。

ニワトリ受精卵(胚)の培養において、転卵は孵化率に大きく影響する要因となる。特に転卵の4～8日の転卵は高い孵化率を得るためには必須であると考えられている (New, 1957; Deeming, 1989)。転卵は漿膜が卵殻膜と早期に付着するのを防ぎ (New, 1957)、卵黄タンパク質の吸収を促進し (Deeming, *et al.*, 1987)、卵殻内における胚の位置を正しく保ち (Robertson, 1961; Lundy, 1969)、漿尿膜の発達を促進する (Tullett & Deeming, 1987) ことにより卵白 (Tullett & Deeming, 1987; Deeming, 1989) や酸素 (Tazawa, 1980) の吸収、卵殻からのカルシウムの取り込み (Rowlett & Simkiss, 1985) を促進するなど多くの作用を有している。台所用ラップを用いた卵殻外培養においても転卵を行うことにより胚の発育が明らかに促進されたことが報告されている (Rowlett and Simkiss, 1987)。このように、一見単純にみえる転卵という操作は胚の発生にとって極めて重要な作用をしており、1時間に1回程度の転卵を行うことは培養条件下においても必要である。

卵白は胚の発生に最適な環境を与えると同時に、水分

とタンパク質の供給源となっている (Freeman, 1974)。特に、オボトランスフェリンやカルシウム結合タンパク質のような特殊なタンパク質の供給を行っている。また、細菌が卵殻内に侵入しても卵白中のリゾチームの殺菌作用により、胚への影響がないように巧みな機構を備えている。培養条件下では、これらの作用はすべて水様性卵白によって行われることになる。

この体外培養法の成功を別の面からとらえると、濃厚卵白は胚盤葉期以降の胚の発生と孵化には必須のものではなく、上に述べた作用はすべて水様性卵白で代用可能であることを示している。また、培養に用いる水様性卵白は他のニワトリが産卵したものでよく、卵白を完全に交換しても、免疫的な拒絶反応は認められないことが示された。

4. 細胞レベルにおける胚操作

ニワトリの産卵後の受精卵 (胚) (ステージ X; Eyal-Giladi & Kochav, 1976) の胚盤葉細胞は多分化能を有していると考えられ (Eyal-Giladi, 1984), 容易に入手でき、取扱いが簡単であることもあり、細胞レベルでの胚操作には適した材料である。卵黄から分離された胚盤葉細胞を別の受精卵 (胚) の胚盤葉に注入することにより、細胞レベルの雑種であるキメラを作出することができる。この時、両者が羽色の異なる品種のものをを用いれば羽毛に現れたキメラ性を容易に識別でき (Marzullo, 1970; Petitte *et al.*, 1990), またニワトリとウズラを用いれば、羽色のみならず、細胞内の核の形態の違いから細胞レベルで両者を識別することが可能となる (Le Douarin, 1973)。ニワトリとウズラの胚盤葉キメラを例にとってその作成法 (Naito *et al.*, 1991a) について簡単に触れてみる。まず、ウズラの受精卵 (胚) から胚盤葉を分離する。胚盤葉は1枚の薄い円盤状のものととして卵黄から分離することができる。いくつかの胚盤葉を集めた後、トリプシン処理により細胞を解離させ、培養液に胚盤葉細胞を浮遊させる。そして、この細胞浮遊液を先端の外径が50-100 μm のマイクロピペットに入れ、ニワトリ受精卵 (胚) の胚盤葉の中央付近から胚盤下腔に1 μl (細胞数約 1,000) 程度注入する。産卵直後のニワトリ受精卵 (胚) の胚盤葉は厚さ約30 μm (Kochav *et al.*, 1980) と極めて薄いため、なるべく表面付近に注入するようにする。注入処理されたニワトリ受精卵 (胚) は、前述の体外培養法により発生を進め、孵化させる。孵化した雛がキメラであるかどうかは、外見からは羽毛の色から判定することになる。羽色に何の変化がなくても羽毛以外の部分でキメラになっ

ている可能性は十分ある (Watanabe *et al.*, 1992)。その場合には、組織切片の観察などによりキメラであるかどうか判定することができる。凍結・融解処理されたウズラ胚盤葉細胞を用いても、同様に羽毛キメラを作製することができる (Naito *et al.*, 1992)。

ニワトリ受精卵 (胚) の胚盤葉へ細胞浮遊液を注入処理する際、偶然に将来の胚の軸になる部分を切断することがあり、このような場合、双子あるいは三つ子の胚が生じる (Spratt & Haas, 1960, 1961a, b; Slack, 1983)。これらの胚は通常1週間以内に発生中止となるが、孵化直前まで発生が進んだ双子の胚が観察されている (Naito *et al.*, 1991c)。もし、これらの胚が孵化すれば一卵性の双子となるが、孵化の可能性については明らかではない。

ニワトリとウズラでは分類学上の属が異なり、キメラにした場合、免疫的な拒絶反応が起こることが考えられる。実際、脊髄移植によって作成したニワトリとウズラのキメラでは、明らかな拒絶反応が起きることが報告されている (Kinutani & Le Douarin, 1985; Kinutani *et al.*, 1986, 1989)。しかし、脊髄と同時に胸腺も移植した場合には免疫寛容が得られたことから、自己と非自己の認識には胸腺が重要な役割を果たしていると考えられている (Ohki *et al.*, 1987, 1988)。胚盤葉キメラの場合は脊髄キメラより早いステージで処理されており、自己と非自己の認識ができる以前である可能性が高く、また非常に多くの種類の細胞を注入していることから、免疫寛容が得られる可能性がある。

キメラは異種細胞の集合体であり、個々の細胞はもとの品種なり系統なりに由来したものである。したがってキメラから得られる子孫はもとの品種なり系統、あるいはそれらの雑種が得られることになる。しかし、実際には胚盤葉キメラで生殖系列がキメラになる率は1%前後と極めて低いのが実状である (Petitte *et al.* 1990; 大塚ら, 1991)。胚盤葉細胞の注入では、ホストの胚の発生ステージや注入部位により、ドナー細胞の分布位置に局限がみられる (Watanabe *et al.*, 1992) が、ある特定の組織なり器官なりを確実に高い割合でキメラにすることは容易ではない。もし、胚盤葉細胞の注入で高率に生殖系列をキメラにできる方法が開発されれば、胚盤葉キメラの用途は大きく広がるであろう。

ニワトリの生殖細胞は、胚の始原生殖細胞が起源となって形成される。始原生殖細胞は胚盤葉上層の中央付近が起源 (Eyal-Giladi *et al.*, 1981; Ginsburg & Eyal-Giladi, 1987) で、発生に伴い胚盤葉下層に移動し、胚発生の初期の原始線条期に将来の胚の前方および前側方の明域と暗域にあたる生殖弦に現れる (Swift, 1914;

Fujimoto *et al.*, 1976b; Ginsburg & Eyal-giladi, 1986)。その後、発生、の進行とともに、主に血管系を通じて運ばれ、胚内の生殖巣原基へ移住する (Singh & Meyer, 1967; Swartz & Domm, 1972)。始原生殖細胞は体細胞と比べ、細胞がやや大きく (直径 15-20 μm)、核が大きくて (直径 8-10 μm)、片寄っており、またグリコーゲンを多量に含むなどの特徴がある (Fujimoto *et al.*, 1976a)。さらに細胞自身がアメーバ状の運動をし、何らかの化学物質に向かって移動する性質を有しており、この走化性が始原生殖細胞の生殖巣原基への移住と関係しているのではないかと考えられている (Kuwana & Fujimoto, 1984; Kuwana *et al.*, 1986, 1987)。始原生殖細胞を取り出し、これを別の胚に移植することができれば生殖細胞を確実に操作できるようになる。生殖巣あるいは血流中に現れた始原生殖細胞を別の胚の生殖巣の部分あるいは血管中に注入処理したところ、生殖系列に取り込まれたことが報告されている (Simkiss *et al.*, 1989, 1990; Simkiss, 1991)。そして、この方法で移植処理した胚を孵化させ、その個体から後代をとり、移植された始原生殖細胞由来の個体が得られるかどうかを調べた結果、成功例はウズラと七面鳥のみで、ニワトリでは現在のところ成功例は報告されていない (Reynaud, 1976; Shuman & Shoffner, 1982; Wentworth *et al.*, 1989; Petite *et al.*, 1991)。この方法は、始原生殖細胞の集め方や胚への注入方法などの改良の余地はあるものの、生殖細胞を確実に操作できるという点で、今後注目を集めることとなるであろう。

最近、核移植によるクローン動物の作出 (McGrath & Solter, 1983; Willadsen, 1986; Prather *et al.*, 1987) が話題となっているが、ニワトリにおいては今のところ明らかな成功例は報告されていない。クローンニワトリができれば、育種分野だけでなく栄養学や生理学などの他の研究分野においても実験用動物としての用途が広がり、学問的に新たな進展が期待される。クローンニワトリの作出法として将来的に有望なのはES細胞 (胚性幹細胞) (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Axelrod, 1984; Robertson, 1986) を用いる方法である。ES細胞とは、胚発生初期の時点で分化が足踏み状態にある多分化能を有する継代可能な細胞である。ES細胞は今のところマウスなど一部の動物でしか樹立されていないのが現状である (Wilmut *et al.*, 1991)。もし、ニワトリでES細胞が樹立できれば、シャーレの中で培養されている細胞から核を取り出し、これを除核した受精卵 (胚) に移植することにより、培養細胞由来の個体を多数作出できることになる。しかし、その

ためにはニワトリでES細胞を樹立することが必須条件であり、さらに核移植法の開発など、多くの技術開発が必要である。

5. 形質転換ニワトリの作製技術

交配によらないで遺伝子を導入することができれば、選抜と交配を繰り返す現在のニワトリの育種法に新たな手法を導入できることになる (Bulfield, 1985; Freeman & Messer, 1985; Freeman & Bumstead, 1987b; Shuman, 1990)。これまでニワトリへの外来遺伝子の導入法としていくつかの方法が試みられてきた。それは次のような方法である。

(1) レトロウイルスベクター法: レトロウイルスは遺伝子としてRNAをもち、自身の逆転写酵素によりDNAを合成する。このウイルスDNAは、宿主の細胞のDNAに組み込まれる性質を有している (Freeman & Bumstead, 1987b)。レトロウイルスのこのような性質を利用して、あらかじめ外来遺伝子を組み込んだレトロウイルスをニワトリ受精卵 (胚) に感染させ、孵化させると、モザイク状ではあるが、外来遺伝子をもつニワトリ、すなわち形質転換ニワトリが作出される (Souza *et al.*, 1984; Shuman & Shoffner, 1986; Salter *et al.*, 1986, 1987; Hughes *et al.*, 1986; Hippenmeyer *et al.*, 1988; Bosselman *et al.*, 1989a,b, 1990a,b; Crittenden *et al.*, 1989; Salter & Crittenden, 1989; Crittenden & Salter, 1988, 1990a,b; Chen *et al.*, 1990)。この方法で生殖系列にも外来遺伝子を導入できることが証明されており、ニワトリのように前核に遺伝子を直接注入することが困難な動物種における外来遺伝子導入法として注目されている。特に、この方法では遺伝子1コピーを染色体に組み込めることに特色がある。この方法の難点は、レトロウイルスの感染によりニワトリ自身に影響がでる恐れのあること、サイズの大きな遺伝子を導入することができないことなどである (Freeman & Bumstead, 1987b)。

(2) 胚盤葉細胞の移植による方法: これは、卵黄から分離した胚盤葉細胞にトランスフェクションなどにより遺伝子を導入し、この細胞を別の受精卵 (胚) の胚盤葉に注入し、キメラ個体を作成し、その後代をとって形質転換ニワトリを作出しようとする方法である (Gibbins *et al.*, 1990; Brazolot *et al.*, 1991)。細胞への遺伝子導入法としては、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などがあるが、導入効率はいずれも数%程度で、さらに染色体への組み込みはその約1/10の効率になる

と考えられる。胚盤葉細胞の移植による方法は、産卵後の受精卵（胚）を扱うという点では、実験操作を行いやすいが、胚盤葉細胞への遺伝子の導入効率が低い（4%、Gibbins *et al.*, 1990; Brazolot *et al.*, 1991）こと、前述したように、注入された細胞が生殖系列に取り込まれる率が低いことなどから、現時点では改良すべき点を多く残している。しかし、ES細胞が樹立されれば新たな進展が期待される方法である。

（3）始原生殖細胞の移植による方法：発生に伴い生殖細胞に分化する始原生殖細胞に遺伝子を導入し、これを胚に注入して生殖細胞に外来遺伝子を取り込ませる方法で、確実に生殖細胞に遺伝子を導入できる利点がある。レトロウイルスを用いて始原生殖細胞に外来遺伝子を導入し、これを別の胚に移植して生殖系列キメラを作製し、その後代をとって形質転換ニワトリを作出しようとする試みも行われている（Simkiss *et al.*, 1990）。しかし、注入処理された胚はそれ自身の生殖細胞をもっているため、注入した始原生殖細胞由来の個体をいかに効率よく生産するかが今後の検討課題である（Aige-Gil & Simkiss, 1991; Hallett & Wentworth, 1991）。

（4）マイクロインジェクション法：ニワトリ胚の体外培養法の開発により可能になった方法で、未分割の受精卵（胚）をニワトリの卵管膨大部から取り出し、胚盤の細胞質に直接遺伝子を注入し、培養によって孵化させ、形質転換ニワトリを作出する方法である。ニワトリの場合、細胞質が不透明なため、マウスなどのように前核に直接遺伝子を注入することができない。しかし、マウスで示されているように、前核注入に比べ細胞質注入の場合の遺伝子の導入効率は約10分の1となるものの、遺伝子導入は可能である（Brinster *et al.*, 1985）ことから、ニワトリにおいてもこの方法が応用されている。この方法を用いた結果、モザイク状ではあるものの、外来遺伝子の胚への導入と発現には成功している（Sang & Perry, 1989; Perry & Sang, 1990; Naito *et al.*, 1990a, 1991b; Perry *et al.*, 1991）ものの、染色体への組み込みについては明らかにされていない。

（5）精子をベクターとする方法：精子は受精の過程で確実に卵子の中に取り込まれ、雄性前核を形成し、卵子由来の雌性前核と融合することから、精子をベクターとすることにより外来遺伝子の導入をはかることが可能であると考えられる。遺伝子は精子表面に付着しやすい性質があり、これを利用して外来遺伝子を付着させた精子を人工授精することにより、遺伝子導入が試みられた。遺伝子はいったんは受精卵（胚）に取り込まれるようであるが、残念ながら染色体には組み込まれることなく、胚発生の過程で消失してしまうことが報告されている

（Freeman & Bumstead, 1987b）。一方では、特殊な培養液を用いることにより、この方法で遺伝子の導入に成功し、子孫へも外来遺伝子が伝達されたとの報告（Gruenbaum *et al.*, 1991）があり、マウスやブタでの例（Lavitrano *et al.*, 1989; Gandolfi *et al.*, 1989）と同様、論議的となっているところであるが、これらのデータを明らかに否定する報告も出されている（Brinster *et al.*, 1989; Gavora *et al.*, 1991）。また、精子を用いる遺伝子導入法として、偽受精による方法が報告されている（Pandey & Patchell, 1982）。これはガンマー線などで精子のDNAを分断した後、卵子と受精させ、その後正常な精子で再度受精させることにより、先に受精した精子のDNAの一部が、その後の正常な受精の過程で染色体に取り込まれることによるものとされている。この方法により、卵殻色の遺伝子（Pandey & Patchell, 1982; Tomita *et al.*, 1988）、羽毛の遺伝子（Baumgartner *et al.*, 1986）、マーカー遺伝子（Bumstead *et al.*, 1987a,b）の導入に成功したとの報告がある。しかし、一方ではこれらの結果を否定する報告（Shoffner *et al.*, 1990）も出されている。もしこの方法で遺伝子導入が可能であるとしても、目的とする遺伝子のみを導入することは不可能であるため、実用化される見通しは乏しいものと思われる。

すべての細胞は同じセットの遺伝子をもっているにもかかわらず、個々の遺伝子は巧みな制御のもとにおいて、特定の組織で、特定の時期に発現するよう調節されており、これによって個体としての統制がはかられている。形質転換マウスで示されているように、たとえ外来遺伝子を導入できたとしても発現の時期特異性や組織特異性を制御できないため、外来遺伝子が生涯を通じて発現しており、育種の観点からは現在のところあまり利用性が期待できないのが実状である。したがって、今後は遺伝子導入法の開発と同時に、遺伝子発現の制御が可能となるような方法を開発することが、形質転換ニワトリを育種に応用する場合の必須条件となるであろう。

さらに重要なことは、どんな遺伝子进行操作するかという問題である。ニワトリの重要な経済形質はほとんどが多くの遺伝子によってコントロールされる量的形質であることを考えると、単に外来遺伝子の導入というだけでは育種へ応用することは困難である。また、ニワトリにおける遺伝子地図の作成がほとんど進んでおらず、明らかな主働遺伝子のみがそのリンケージマップとして示されている程度である（Somes, 1978; Bitgood & Somes, 1990）。これらのことから、アメリカでニワトリの遺伝子地図を作成するプロジェクトが計画されている（Crittenden, 1991）。

遺伝子レベルでニワトリの胚を操作する研究はまだ始まったばかりであり、その基礎となる情報が明らかに不足している状態である。しかし、最近の分子生物学の進歩はめざましく、近い将来、通常の選抜過程では考慮しにくい抗病性 (Freeman & Bumstead, 1987a) などについてその応用がはかられるようになることが予想される。また、ニワトリを用いて、医薬品などの有用物質を例えば卵の中に生産することが可能となるかもしれない。

お わ り に

以上、ニワトリ受精卵 (胚) の体外培養と胚操作研究について簡単に述べてきた。ニワトリにおいては体外培養法の開発により、卵管から取り出した未分割の受精卵 (胚) を孵卵器の中で個体にまで発生を進めさせることが可能となった。これは、哺乳動物の胚操作において、操作胚を必ず子宮に移植しなければ個体にまで発生を進めさせることができない点に比べ、大きなメリットとなる。これによって、発生のあらゆるステージの胚操作が可能となり、また、操作胚を高率に孵化させることができるようになった。このことからすれば、ニワトリは胚操作研究に適した実験材料であると考えられる。ニワトリ胚はその大半が体外発生のため、古くから発生学の実験材料として広く用いられてきており、1細胞期からの胚操作が可能となったことを考えると、新しい動物実験系の開発の面からもその重要性は今後ますます大きくなることが予想される。

文 献

- Aige-Gil, V. & K. Simkiss, 1991. Sterilising embryos for transgenic chimaeras. *Brit. Poult. Sci.*, 32: 427-438.
- Auerbach, R., L. Kubai, D. Knighton & J. Folkman, 1974. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev. Biol.*, 41: 391-394.
- Axelrod, H.R., 1984. Embryonic stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique. *Dev. Biol.*, 101: 225-228.
- Baumgartner, J., I.E. Ezzat & Z. Konckva, 1986. An attempt at genetic transformation in chickens through cock sperm irradiation. *Theor. Appl. Genet.*, 72: 264-268.
- Bitgood, J.J. & R.G. Somes, Jr., 1990. Linkage relationships and gene mapping. in: *Poultry Breeding and Genetics*. Ed. R.D. Crawford, pp. 469-495. Elsevier, New York.
- Bosselman, R.A., R.-Y. Hsu, T. Boggs, S. Hu, J. Bruszewski, S. Ou, L. Kozar, F. Martin, C. Green, F. Jacobsen, M. Nicolson, J.A. Schultz, K.M. Semon, W. Rishell & R.G. Stewart, 1989b. Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science*, 243: 533-535.
- Bosselman, R.A., R.-Y. Hsu, T. Boggs, S. Hu, J. Bruszewski, S. Ou, L. Souza, L. Kozar, F. Martin, M. Nicolson, W. Rishell, J.A. Schultz, K.M. Semon & R.G. Stewart, 1989a. Replication-defective vectors of reticuloendotheliosis virus transduce exogenous genes into somatic stem cells of the unincubated chicken embryo. *J. Virol.*, 63: 2680-2689.
- Bosselman, R.A., R.-Y. Hsu, T. Boggs, S. Hu, M. Nicolson & M.J. Briskin, 1990a. Insertion and expression of model genes in the chicken germline. *Proc. 4th World Cong. Genet. Appl. Livestock Prod. (Edinburgh)*, XVI: 94-96.
- Bosselman, R.A., R.-Y. Hsu, M.J. Briskin, T. Boggs, S. Hu, M. Nicolson, L. M. Souza, J.A. Schultz, W. Rishell & R.G. Stewart, 1990b. Transmission of exogenous genes into the chicken. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 41: 183-195.
- Brazolot, C.L., J.N. Petite, R.J. Etches & A.M.V. Gibbins, 1991. Efficient transfection of chicken cells by lipofection, and introduction of transfected blastodermal cells into the embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 30: 304-312.
- Brinster, R.L., H.Y. Chen, M.E. Trumbauer, M.K. Yagle & R.D. Palmiter, 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4438-4442.
- Brinster, R.L., E.P. Sandgren, R.R. Behringer & R.D. Palmiter, 1989. No simple solution for making transgenic mice. *Cell*, 59: 239-241.
- Bulfield, G., 1985. The potential for improvement of commercial poultry by genetic engineering techniques. in: *Poultry Genetics*

- and Breeding. Ed. W. G. Hill, J.M. Manson & D. Hewitt, pp. 37-46. Longman group, Harlow.
- Bumstead, N., B.M. Freeman, A.C.C. Manning & K. Howes, 1987b. Genetic transformation of chickens using irradiated sperm: Cotransfer of undesirable genes. *Avian Pathol.*, 16: 417-424.
- Bumstead, N., L.I. Messer, B.M. Freeman & A.C.C. Manning 1987a. Genetic transformation of chickens using irradiated male gametes. *Heredity*, 58: 25-30.
- Chen, H.Y., E.A. Garber, E. Mills, J. Smith, J.J. Kopchick, A.G. DiLella & R.G. Smith, 1990. Vectors, promoters, and expression of genes in chick embryos. *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 41: 173-182.
- Corner, M.A. & A.Ph.J. Richter, 1973. Extended survival of the chick embryo *in vitro*. *Experientia*, 29: 467-468.
- Crittenden, L.B., 1991. USDA ARS—Michigan State University chicken genome mapping project. *MAGazine*, 1: 6-7.
- Crittenden, L.B. & D.W. Salter, 1988. Insertion of retroviruses into the avian germ line. *Proc. 2nd Int. Conf. Quant. Genet. (Sunderland)*, pp. 207-214.
- Crittenden, L.B. & D.W. Salter, 1990a. Expression of retroviral genes in transgenic chickens. *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 41: 163-171.
- Crittenden, L.B. & D.W. Salter, 1990b. Transgenic chickens resistant to avian leukosis virus. *Proc. 4th World Cong. Genet. Appl. Livestock Prod. (Edinburgh)*, XVI: 453-456.
- Crittenden, L.B., D.W. Salter & M.J. Federspiel, 1989. Segregation, viral phenotype, and proviral structure of 23 avian leukosis virus inserts in the germ line of chickens. *Thoe. Appl. Genet.*, 77: 505-515.
- Deeming, D.C., 1989. Characteristics of unturned eggs: critical period, retarded embryonic growth and poor albumen utilisation. *Brit. Poult. Sci.*, 30: 239-249.
- Deeming, D.C., K. Rowlett & K. Simkiss, 1987. Physical influences on embryo development. *J. Exp. Zool.*, Suppl. 1: 341-345.
- Dunn, B.E., 1974. Technique for shell-less culture of the 72-hour avian embryo. *Poult. Sci.*, 53: 409-412.
- Dunn, B.E. & M.A. Boone, 1976. Growth of the chick embryos *in vitro*. *Poult. Sci.*, 55: 1067-1071.
- Dunn, B.E. & M.A. Boone, 1977. Growth and mineral content of cultured chick embryos. *Poult. Sci.*, 56: 662-672.
- Dunn, B.E., N.B. Clark & K.E. Scharf, 1987. Effect of calcium supplementation on growth of shell-less cultured chick embryos. *J. Exp. Zool.*, Suppl. 1: 33-37.
- Dunn, B.E., T.P. Fitzharris, 1979. Differentiation of the chorionic epithelium of chick embryos maintained in shell-less culture. *Dev. Biol.*, 71: 216-227.
- Evans, M.J. & M.H. Kaufman, 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.
- Eyal-Giladi, H., 1984. The gradual establishment of cell commitments during the early stages of the chick development. *Cell Differ.*, 14: 245-255.
- Eyal-Giladi, H., M. Ginsburg & M. Farbarov, 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J. Embryol. exp. Morph.*, 65: 139-147.
- Eyal-Giladi, H. & S. Kochav, 1976. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of development of the chick. I. General morphology. *Dev. Biol.*, 49: 321-337.
- Freeman, B.M., 1974. Development of the Avian Embryo. Chapman and Hall, London.
- Freeman, B.M. & N. Bumstead, 1987a. Breeding for disease resistance—The perspective role of genetic manipulation. *Avian Pathology*, 16: 353-365.
- Freeman, B.M. & N. Bumstead, 1987b. Transgenic poultry: Theorey and practice. *World's Poult. Sci. J.*, 43: 180-189.
- Freeman, B.M. & L.I. Messer, 1985. Genetic manipulation of the domestic fowl—a review. *World's Poult. Sci. J.*, 41: 124-132.

- Fujimoto, T., T. Ninomiya & A. Ukesima, 1976a. Observations of the primordial germ cells in blood samples from the chick embryo. *Dev. Biol.*, 49: 278-282.
- Fujimoto, T., A. Ukeshima & R. Kiyofuji, 1976b. The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *Anat. Rec.*, 185: 139-154.
- Gandolfi, F., M. Lavitrano, A. Camaioni, C. Spadfora, G. Siracusa & A. Lauria, 1989. The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *J. Reprod. Fert. Abstr. Series No. 4*: 10.
- Gavora, J.S., B. Benkel, H. Sasada, W.J. Cantwell, P. Fiser, R.M. Teather, J. Nagai & M.P. Sabour, 1991. An attempt at sperm-mediated gene transfer in mice and chickens. *Can J. Anim. Sci.*, 71: 287-291.
- Gibbins, A.M.V., C.L. Brazolot, J.N. Petite, G. Liu & R.J. Etches, 1990. Efficient transfection of chicken blastodermal cells and their incorporation into recipient embryos to produce chimeric chicks. *Proc. 4th World Cong. Genet. Appl. Livestock Prod. (Edinburgh)*, XVI: 119-122.
- Ginsburg, M. & H. Eyal-Giladi, 1986. Temporal and spatial aspects of gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J. Embryol. exp. Morph.*, 95: 53-71.
- Ginsburg, M. & H. Eyal-Giladi, 1987. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development*, 101: 209-219.
- 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. *家禽会誌*, 25: 27-33.
- Gruenbaum, Y., E. Revel, S. Yarus & A. Fainsod, 1991. Sperm cells as vectors for the generation of transgenic chickens. *J. Cell. Biochem., Suppl.* 15E: 194.
- Hallett, J.S. & B.C. Wentworth, 1991. The effects of busulfan on gonadal differentiation and development in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Poult. Sci.*, 70: 1619-1623.
- Hamburger, V. & H.L. Hamilton, 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92.
- Hippenmeyer, P.J., G.G. Krivi & M.K. Highkin, 1988. Transfer and expression of the bacterial NPT-II gene in chicken embryos using a Schmidt-Ruppin retrovirus vector. *Nucleic Acids Res.*, 16: 7619-7631.
- Hughes, S.H., E. Kosik, A.M. Fadly, D.W. Salter & L.B. Crittenden, 1986. Design of retroviral vectors for the insertion of foreign deoxyribonucleic acid sequences into the avian germ line. *Poult. Sci.*, 65: 1459-1467.
- Kinutani, M., M. Coltey & N.M. Le Douarin, 1986. Postnatal development of demyelinating disease in avian spinal cord chimeras. *Cell*, 45: 307-314.
- Kinutani, M., N.M. Le Douarin, 1985. Avian spinal cord chimeras. 1. Hatching ability and post hatching survival in homo- and heterospecific chimeras. *Dev. Biol.*, 111: 243-255.
- Kinutani, M., K. Tan, J. Desaki, M. Coltey, K. Kitaoka, Y. Nagano, Y. Takashima & N.M. Le Douarin, 1989. Avian spinal cord chimeras. Further studies on the neurological syndrome affecting the chimeras after birth. *Cell Differ. Dev.*, 26: 145-162.
- Kochav, S., M. Ginsburg & H. Eyal-Giladi, 1980. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. II. Microscopic anatomy and cell population dynamics. *Dev. Biol.*, 79: 296-308.
- Kuwana, T. & T. Fujimoto, 1984. Locomotion and scanning electron microscopic observations of primordial germ cells from the embryonic chick blood *in vitro*. *Anat. Rec.*, 209: 337-343.
- Kuwana, T., H. Maeda-Suga & T. Fujimoto, 1986. Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage *in vitro*. *Anat. Rec.*, 215: 403-406.
- Kuwana, T., Y. Miyayama, Y. Kajiwara & T. Fujimoto, 1987. Behavior of chick primordial germ cells moving toward gonadal primor-

- dium *in vitro*: Scanning electrom microscopic study. *Anat. Rec.*, 219: 164-170.
- Lavitrano, M., A. Camioni, V.M. Fazio, S. Dolic, M.G. Farace & C. Spadafora, 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs. Genetic transformation of mice. *Cell*, 57: 717-723.
- Le Douarin, N.M., 1973. A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev. Biol.*, 30: 217-222.
- Lundy, H., 1969. A review of the effects of temperature, humidity, turning and gaseous environment in the incubator on the hatchability of the hen's egg. in: *The Fertility and Hatchability of the Hen's Egg*. Ed. T.C. Carter & B.M. Freeman. pp. 143-176. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Martin, G., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7634-7638.
- Marzullo, G., 1970. Production of chick chimeras. *Nature*, 225: 72-73.
- McGrath, J. & D. Solter, 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220: 1300-1302.
- McMaster, G. & S.P. Modak, 1977. Cellular and biochemical parameters of growth of chick blastoderms during early morphogenesis. *Differentiation*, 8: 145-152.
- 水野丈夫, 1989. 鳥類. 「脊椎動物の発生」上, 岡田節人編, pp. 391-424, 培風館, 東京.
- Naito M., K. Agata, K. Otsuka, K. Kino, M. Ohta, K. Hirose, G. Eguchi, M. Watanabe, M. Kinutani, K. Nirasawa & T. Oishi, 1990a. Culture of the chick embryo and manipulation of the early avian embryo. *Proc. 4th World Cong. Genet. Appl. Livestock Prod.* (Edinburgh), XVI: 135-138.
- Naito, M., K. Agata, K. Otsuka, K. Kino, M. Ohta, K. Hirose, M.M. Perry & G. Eguchi, 1991b. Embryonic expression of β -actin-lacZ hybrid gene injected into the fertilized ovum of the domestic fowl. *Int. J. Dev. Biol.*, 35: 69-75.
- Naito, M., K. Nirasawa & T. Oishi, 1990b. Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *J. Exp. Zool.*, 254: 322-326.
- Naito M., K. Nirasawa & T. Oishi, 1992. Preservation of quail blastoderm cells in liquid nitrogen. *Brit. Poult. Sci.*, 33: in press.
- Naito M. & M.M. Perry, 1989. Development in culture of the chick embryo from cleavage to hatch. *Brit. Poult. Sci.*, 30: 251-256.
- Naito M., M. Watanabe, M. Kinutani, K. Nirasawa & T. Oishi, 1991a. Production of quail-chick chimeras by blastoderm cell transfer. *Brit. Poult. Sci.* 32: 79-86.
- Naito M., M. Watanabe, K. Nirasawa & T. Oishi, 1991c. Developmental ability of twin embryos produced by microinjection treatment into chick blastoderm. *Poult. Sci.*, 70: 1261-1264.
- New, D.A.T., 1957. A critical period for the turning of hen's egg. *J. Embryol. exp. Morphol.*, 5: 293-299.
- Ohki, H., C. Martin, M. Coltey & N.M. Le Douarin, 1988. Implants of quail thymic epithelium generate permanent tolerance in embryonically constructed quail/chick chimeras. *Development*, 104: 619-630.
- Ohki, H., C. Martin, C. Corbel, M. Coltey & N.M. Le Douarin, 1987. Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds. *Science*, 237: 1032-1035.
- Olsen, N.W. & B.H. Neher, 1948. The site of fertilization in the domestic fowl. *J. Exp. Zool.*, 109: 355-366.
- Ono, T. & N. Wakasugi, 1984. Mineral content of quail embryos cultured in mineral-rich and mineral-free conditions. *Poult. Sci.*, 63: 159-166.
- 大塚勝正・木野勝敏・本田元好・餅井真・阿形清和・江口吾朗, 1991. ニフトリキメラの作成, 細胞工学, 10: 513-518.
- Pandey, K.K. & M.R. Patchell, 1982. Genetic transformation in chickens by the use of irradiated male gametes. *Mol. Gen. Genet.*,

- 186: 305-308.
- Perry, M.M., 1987. Nuclear events from fertilisation to the early cleavage stages in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). J. Anat., 150: 99-109.
- Perry, M.M., 1988. A complete culture system for the chick embryo. Nature, 331: 70-72.
- Perry, M.M. & C.M. Mather, 1991. Satisfying the needs of the chick embryo in culture, with emphasis on the first week of development. in: Avian Incubation. Ed. S.G. Tullett, pp. 91-106, Butterworth-Heinemann, London.
- Perry, M., D. Morris, S. Hettle & H. Sang, 1991. Expression of exogenous DNA during the early development of the chick embryo. Roux's Arch. Dev. Biol., in press.
- Perry, M.M. & H.M. Sang, 1990. *In vitro* culture and approaches for DNA transfer in the chick embryo. Proc. 4th World Cong. Genet. Appl. Livestock Prod. (Edinburgh), XVI: 115-118.
- Petitte, J.N., M.E. Clark & R.J. Etches, 1991. Assessment of functional gametes in chickens after transfer of primordial germ cells. J. Reprod. Fert., 92: 225-229.
- Petitte, J.N., M.E. Clark, G. Liu, A.M.V. Gibbins & R.J. Etches, 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chickens by transfer of early blastodermal cells. Developmant., 108: 185-189.
- Prather, R.S., F.L. Barnes, M.M. Sims, J.M. Robl, W.H. Eyestone & N.L. First, 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod., 37: 859-866.
- Reynaud, G., 1976. Reproductive capacity and offspring of chickens submitted to a transfer of primordial germ cells during embryonic life. Roux's. Arch. Dev. Biol., 179: 85-110.
- Robertson, E.J., 1986. Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line. Trends in Genetics, 2: 9-13.
- Robertson, I.S., 1961. The influence of turning on the hatchability of hen's eggs. II. The effect of turning frequency on the pattern of mortality, the incidence of malpositions, malformations and dead embryos with no somatic abnormality. J. Agri. Sci., 57: 57-69.
- Romanoff, A.L., 1960. The Avian Embryo. Macmillan, New York.
- Rowlett, K., 1991. Embryo growth and development in culture. in: Avian Incubation. Ed. S.G. Tullett, pp.107-124. Butterworth-Heinemann, London.
- Rowlett, K. & K. Simkiss, 1985. The surrogate egg. New Scientist, 1469: 42-44.
- Rowlett, K. & K. Simkiss, 1987. Explanted embryo culture: *in vitro* and *in ovo* techniques for domestic fowl. Brit. Poult. Sci., 28: 91-101.
- Rowlett, K. & K. Simkiss, 1989. Respiratory gases and acid-base balance in shell-less avian embryos. J. Exp. Biol., 143: 529-536.
- Salter, D.W. & L.B. Crittenden, 1989. Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germ line of the chicken. Theor. Appl. Genet., 77: 457-461.
- Salter, D.W., E.J. Smith, S.H. Hughes, S.E. Wright & L.B. Crittenden, 1987. Transgenic chickens: Insertion of retroviral genes into the chicken germ line. Virology, 157: 236-240.
- Salter, D.W., E.J. Smith, S.H. Hughes, S.E. Wright, A.M. Fradly, R.L. Witter & L.B. Crittenden, 1986. Gene insertion into the chicken germ line by retroviruses. Poult. Sci., 65: 1445-1458.
- Sang, H. & M.M. Perry, 1989. Episomal replication of cloned DNA injected into the fertilised ovum of the hen, *Gallus domesticus*. Mol. Reprod. Dev., 1: 98-106.
- Shoffner, R.N., J.S. Otis, L.A. Snyder & K.S. Guise, 1990. The improbability of irradiated spermatozoa as gene transfer vectors in chickens. Theor. Appl. Genet., 80: 228-233.
- Shuman, R.M., 1990. Genetic engineering. in: Poultry Breeding and Genetics. Ed. R.D. Crawford, pp. 585-598. Elsevier, New York.
- Shuman, R.M. & R.N. Shoffner, 1982. Potential genetic modification in the chicken, *Gallus*

- domestcs*. Proc. 2nd. World Cong. Genet. Appl. Livestock Prod. (Madrid), VI: 157-163.
- Shuman, R.M. & R.N. Shoffner, 1986. Gene transfer by avian retroviruses. Poult. Sci., 65: 1437-1444.
- Simkiss, K., 1991. Primordial germ cells and the scope for genetic manipulation using embryos. in: Avian Incubation. Ed. S.G. Tullett. pp. 125-136. Butterworth-Heinemann, London.
- Simkiss, K., K. Rowlett, N. Bumstead & B.M. Freeman, 1989. Transfer of primordial germ cell DNA between embryos. Proto-plasma. 151: 164-166.
- Simkiss, K., L. Vick, G. Luke, N. Page & D. Savva, 1990. Infection of primordial germ cells with defective retrovirus and their transfer to the developing embryo. Proc. 4th World Cong. Genet. Appl. Livestock Prod. (Edinburgh), XVI: 111-114.
- Singh, R.P. & D.B. Meyer, 1967. Primordial germ cells in blood smears from chick embryos. Science, 156: 1503-1504.
- Slack, J.M.W., 1983. From Egg to Embryo. Cambridge University Press. Cambridge, England.
- Slavkin, H.C., M.D. Slavkin & P.B. Bringas, Jr., 1980. Mineralization during long-term cultivation of chick embryos *in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 163: 249-257.
- Somes, R.G., Jr., 1978. New Linkage groups and revised chromosome map of the domestic fowl. J. Hered. 69: 401-403.
- Souza, L.M., T.C. Boone, D. Murdock, K. Langley, J. Wypych, D. Fenton, S. Johnson, P.H. Lai, R. Evertt, R-Y. Hsu & R. Bossleman, 1984. Application of recombinant DNA technologies to study on chicken growth hormone. J. Exp. Zool., 232: 465-473.
- Spratt, N.T., Jr., & H. Haas, 1960. Integrative mechanisms in development of the early chick blastoderm. I. Regulative potentiality of separated parts. J. Exp. Zool., 145: 97-137.
- Spratt, N.T., Jr. & H. Haas, 1961a. Integrative mechanisms in development of the early chick blastoderm. II. Role of morphogenetic movements and regenerative growth in systematic and topographically disarranged blastoderm. J. Exp. Zool., 147: 57-93.
- Spratt, N.T., Jr. & H. Haas, 1961b. Integrative mechanisms in development of the early chick blastoderm. III. Role of cell population size and growth potentiality in synthetic systems larger than normal. J. Exp. Zool., 147: 271-293.
- Stepinska, U. & B. Olszanska, 1983. Cell multiplication and blastoderm development in relation to egg envelope formation during uterine development of quail (*Coturnix coturnix japonica*) embryos. J. Exp. Zool., 228: 505-510.
- Swartz, W.J. & L.V. Domm. 1972. A study on the division of primordial germ cells in the early chick embryo. Am. J. Anat., 135: 51-70.
- Swift, C.H., 1914. Origin and early history of the primordial germ-cells in the chick. Am. J. Anat., 15: 483-516.
- Tazawa, H., 1980. Adverse effect of failure to turn the avian egg on the embryo oxygen exchange. Respir. Physiol., 41: 137-142.
- Tomita, T., N. Yamamoto, K. Otsuka, M. Ohta & K. Hirose, 1988. Genetic transformation of egg shell colour in chicken by the use of irradiated sperm. Proc. 18th World's Poult. Cong. (Nagoya), pp. 515-516.
- Tuan, R.S., 1980. Calcium transport and related functions in the chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick embryos. Dev. Biol. 74: 196-204.
- Tullett, S.G. & D.C. Deeming, 1987. Failure to turn during incubation: Effects on embryo weight, development of the chorioallantois and absorption of albumen. Brit. Poult. Sci., 28: 239-243.
- 渡辺一雄・井村加奈代, 1983. 卵殻外培養によるニトリ胚の発生—生存率, 形態, 成長速度, 化骨に対する卵殻の意義. 動物学雑誌, 92: 64-72.
- Watanabe, M., M. Kinutani, M. Naito, O. Ochi & Y. Takashima, 1992. Distribution analysis

- of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. *Development*, 114: in press.
- Wentworth, B.C., H. Tsai, J.H. Hallett, D.S. Gonzales & G. Rajcic-Spasojevic, 1989. Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differentiation. *Poult. Sci.*, 68: 999-1010.
- Wiladsen, S.M., 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320: 63-65.
- Wilmut, I., M.L. Hooper & J.P. Simons, 1991. Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. *J. Reprod. Fert.*, 92: 245-279.