＜研究ノート＞

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

傍島英雄¹・松原悠子²・鏡味 裕^{2*}・田上貴寛²・春海 隆²・内藤 充²

¹ 岐阜県養鶏試験場, 501-3924, 岐阜県関市迫間 2672-1

² 農林水産省畜産試験場, 305-0901, 茨城県筑波農林研究団地内局私書箱 5 号

ニワトリ胚の体外培養で、通常ニワトリの二黄卵の卵殻を培養器として用いるシステムⅢにおいて、アイガモ卵殻の利用を試みた。体外培養システムⅡにより 3 日間培養したニワトリ胚をアイガモ卵殻とニワトリ二黄卵の卵殻に移植して培養した結果、アイガモ卵殻を用いた場合 18% (2/11)、ニワトリ二黄卵の卵殻を用いた場合 30% (3/10) が孵化した。孵化した個体については正常な発育、繁殖能力を示した。アイガモ卵殻はニワトリ二黄卵の卵殻に比べ、卵殻厚はほぼ同じであったものの、卵殻膜では約 3 倍の厚さがあり、また気孔は卵殻表面まで筒状でその数は 70% 程度の分布数であったが、ニワトリ胚の培養に十分利用できることが示された。

(家禽会誌, 37: 175-179, 2000)

キーワード: アイガモ卵, 体外培養, ニワトリ二黄卵, ニワトリ胚, 孵化

緒 言

1 細胞期から孵化までのニワトリ受精卵 (胚) の体外培養法は PERRY (1988) によって開発され、その後 NAITO *et al.* (1990) によって、より孵化率の高い方法へと改良が図られた。この体外培養法では、1 細胞期から胚盤葉の形成までの 1 日間 (システムⅠ)、その後の胚の形成までの 3 日間 (システムⅡ)、さらに胚の成長の過程から孵化までの 18 日間 (システムⅢ) と、発生段階に応じて胚を適切な培養容器に移し換えることを特色としている。この体外培養法の確立により、1 細胞期から孵化までのあらゆるステージの胚操作が可能となり、キメラニワトリの作出や形質転換ニワトリの作出等の多くの研究がなされてきている (NAITO, 1997, 1998)。この体外培養法のシステムⅢにおいてはニワトリの二黄卵の卵殻が主として用いられているが、この他にも七面鳥卵殻 (ROWLETT and SIMKISS, 1987) やアヒル卵殻 (三浦ら, 1991) の利用が試みられ、七面鳥卵殻では 20%、アヒル卵殻では 9% の孵化率が報告されている。システムⅢでは転卵の際に、鶏胚が殻の開口部を覆うポリエチレンフィルムに接触するのを避けるために、ドナー卵より 10～15 g 大きな卵殻を用いる。七面鳥やアヒルもその条件

に適する卵重である。今回の実験では、最近有機農法への利用が盛んに行われ、それにともない産出される卵や肉の有効な利用が求められるアイガモの卵殻を用いて、ニワトリ胚の培養を試みた。

材料および方法

実験に使用したアイガモ卵は、カモ×アヒルの雑種固定種 (椎名孵化場, 千葉県) の卵である。アイガモ卵およびニワトリ二黄卵は、卵殻の表面を 70% エチルアルコールで消毒し、鈍端部を直径 40 mm に切り取り、内容物を出して容器とした。卵殻の準備はニワトリ胚の移植当日に行った。培養したニワトリ胚は、体外培養システムⅡにより 3 日間培養した後、発育の正常なものを実験に使用した。ニワトリ胚を移植したアイガモ卵殻およびニワトリ卵殻の切り口はポリエチレンフィルムで密封し、転卵しながら 38℃, 相対湿度 60% で 14 日間、さらに転卵を止めて 37.6℃, 相対湿度 70% で 4 日間培養した。10 ケ月齢の成雌より採取したアイガモ卵、ニワトリ二黄卵およびニワトリ正常卵それぞれ 20 個ずつについて、卵重、長径、短径、卵形係数、卵殻厚、卵殻膜厚を測定した。卵殻厚と卵殻膜厚については、ダイヤルゲージ (PEACOCK DG-205 尾崎製作所 東京) を用いて各卵ごとに赤道部付近を 5 カ所測定しその平均値を個体の値とした。また、卵殻の気孔数は、卵殻膜をはがし乾燥させた卵殻に内側からインクを塗布し、外側からしみ出た

1999 年 11 月 18 日受付 2000 年 1 月 4 日受理

* 現所属: 麻布大学獣医学部, 229-8501, 神奈川県相模原市

インクを観察する方法により測定した。測定した卵重等については、アイガモ卵とニワトリ二黄卵を比較する一元配置による分散分析を行った。

結 果

図 1 にアイガモ卵殻およびニワトリ二黄卵の卵殻を用いて行ったニワトリ胚の培養実験における生存率を示し

図 1. アイガモ卵殻とニワトリ二黄卵の卵殻を利用した体外培養システムⅢでのニワトリ胚生存率の推移。
放卵直後，0 日目。システムⅢ開始，3 日目。孵化，21 日目。

Fig. 1. Time course of survival rate of chick embryos cultured in Aigamo duck eggshells or chicken double-yolked eggshells.
Laid egg, day 0. System III started, day 3. Hatched, day 21.

表 1. アイガモ卵，ニワトリ二黄卵，
Table 1. Egg quality traits of Aigamo duck eggs,

	卵重 (g) Egg weight	長径 (mm) Length	短径 (mm) Breadth	卵形係数 Egg shape index
アイガモ卵 Aigamo duck eggs	74.4±3.7 ^b	63.7±2.3 ^b	45.6±0.7 ^a	71.7±2.8 ^a
ニワトリ二黄卵 Chichen double-yolked eggs	94.1±8.1 ^a	70.3±4.1 ^a	49.0±1.4 ^a	69.9±4.2 ^a
ニワトリ正常卵 Chicken normal eggs	64.0±2.7	58.6±1.8	44.0±0.9	75.2±2.8

平均値±標準偏差，n=20
Mean±SD, n=20.
卵は 10 ヶ月齢の成雌より採卵。
Eggs were obtained from 10-month old hens.
各測定形質において，アイガモ卵とニワトリ二黄卵の比較で，異符号間に 5% 水準で有意差あり。
Values in each trait having different superscripts are significantrly different (P<0.05) between Aigamo duck eggs and chicken double-yolked eggs.

た。いずれの卵殻を用いた場合にも、移植後 3～4 日の間に著しく生存率が低下したが、その後孵化までの 10 日間は生存率の変化は見られず、孵化直前にやや低下した。孵化率はアイガモ卵殻では 18% (2/11)、ニワトリ二黄卵の卵殻では 30% (3/10) であった。孵化した個体はすべて性成熟に達し、正常な繁殖能力を示した。

表 1 はアイガモ卵、ニワトリ二黄卵およびニワトリ正常卵を比較したものである。アイガモ卵は卵重ではニワトリ二黄卵より 20 g 程度小さかったものの、卵形係数はやや大きかった。また、卵殻厚には両者に大きな差は認められなかったが、卵殻膜厚についてはアイガモ卵の方がニワトリ卵に比べ約 3 倍の厚さを示した。卵殻の気孔の分布については、卵によるばらつきが大きかったものの、いずれの卵においても鋭端部から鈍端部にかけて増加する傾向が認められた。アイガモ卵はニワトリ卵に比べ全体的に気孔数が少なく、赤道部の平均値で約 70% の値を示した。また図 2 に示すように、ニワトリ卵の気孔の形状は表面に向け漏斗状に広がっているのに対し、アイガモ卵では内側から表面近くまで、その形状に大きな変化は認められなかった。

考 察

ニワトリ胚の体外培養は、古くはポリエチレンフィルム等を用いて行われ、主に初期胚の発生の観察に用いられてきた (DUNN, 1974; DUNN and BOONE, 1977; 後藤

ら, 1988)。この方法では、胚の初期発生は正常に行われるものの、それ以降発生の進行がしだいに遅れ、孵化することはなかった。ニワトリ胚が培養下において正常に発生するためには、胚における酸素の取り込みと炭酸ガスの放出、すなわち呼吸作用と、胚が利用するカルシウムの供給が正常に行われる必要がある。ニワトリ胚では、孵卵の 19～20 日目頃までは漿尿膜が卵殻膜と接触し、気孔を通じて呼吸作用を行うとともに、胚が利用するカルシウムの約 80% を卵殻から吸収することになる (FREEMAN and VINCE, 1974)。ニワトリや七面鳥、アヒル、アイガモ等の卵殻を用いた場合、程度の差はあっても、これら呼吸作用やカルシウムの供給が行われたため、ニワトリ胚を孵化させることができたものと考えられる。

最近、ウズラ胚を空気透過性のテフロン膜を用いて培養し、孵化させることに成功しており (KAMIHIRA *et al.*, 1998)、鳥類胚の培養に必ずしも卵殻を用いる必要がなくなってきた。このような完全なインビトロにおける培養系を用いることにより、ニワトリ胚の発生過程における卵殻の役割を、より詳しく解析できる可能性がでてきた。

本実験により、アイガモ卵殻を用いてニワトリ胚を孵化させることは十分可能であることが証明された。アイガモ卵殻はニワトリの卵殻に比べ卵殻の厚さはほぼ同じであるのに対して、卵殻膜が約 3 倍の厚さをもつとも

ニワトリ正常卵における卵形質の比較
chicken double-yolked eggs and chicken normal eggs

卵殻厚 (μm) Egg shell thickness	卵殻膜厚 (μm) Thickness of eggshell membranes	気孔数 (/cm ²) Number of pores		
		赤道部 Equatorial region	鈍端部 Blunt end	鋭端部 Pointed end
341 ± 26 ^a	46 ± 7 ^a	79 ± 18 ^a	93 ± 21 ^a	68 ± 32 ^a
350 ± 25 ^a	15 ± 4 ^b	113 ± 20 ^a	114 ± 29 ^a	76 ± 41 ^a
363 ± 23	14 ± 4	109 ± 21	131 ± 31	85 ± 43

図 2. アイガモ卵（左）とニワトリ二黄卵（右）の気孔の形状。
どちらも上側が卵殻表面。

* 図中の最小目盛のスケールは9マイクロメートル。

Fig. 2. Pore shape of Aigamo duck eggshell (left) and chicken double-yolked eggshell (right).

Egg surface lies upper side in both figures.

* Minimum scale = 9 μm .

に気孔の形状が異なり、さらにその分布が少ないことが特徴となっている。これらの卵殻の特徴は、アイガモが水禽類であり水辺の湿ったところに巣を作るため、泥や雑菌などの汚染から卵内容物（胚）を保護するのに適していると考えられる。これらのことがニワトリ二黄卵の卵殻を利用した場合とくらべて、孵化率の差に影響しているのかどうか、今後例数を増やしてさらに検討することが必要である。

謝 辞

アイガモ飼養等でご協力いただいた岐阜県養鶏試験場の同僚諸氏に感謝申し上げます。

引 用 文 献

- DUNN, B.E. (1974) Technique for shell-less culture of the 72-hour avian embryo. *Poultry Science*, **53**: 409-412.
- DUNN, B.E. and BOONE M.A. (1977) Growth and mineral content of cultured chick embryos. *Poultry Science*, **56**: 662-672.
- FREEMAN, B.M. and VINCE M.A. (1974) Development of the Avian Embryo, pp. 237-248. Chapman and Hall, London.
- 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.
- 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.
- 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.
- NAITO, M. (1997) The microinjection of DNA into early chicken embryo. In 'Transgenic Animals: Generation and Use (HOUDEBINE, L.M. ed.)', pp. 69-73. Harwood Academic Publishers, Netherlands.
- NAITO, M. (1998) Manipulation of primordial germ cells for avian transgenesis. *AgBiotech News and Information*, **10**: 397-404.
- 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.
- PERRY, M.M. (1988) A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, **331**: 70-72.
- ROWLETT, K. and SIMKISS K. (1987) Explanted embryo culture: *in vitro* and *in ovo* techniques for domestic fowl. *British Poultry Science*, **28**: 91-101.

Culture of Chicken Embryos Using Aigamo Duck Eggshells

Hideo SOBAJIMA¹, Yuko MATSUBARA², Hiroshi KAGAMI^{2*}, Takahiro TAGAMI²,
Takashi HARUMI² and Mitsuru NAITO²

¹ Gifu Prefectural Poultry Experimental Station, Seki, Gifu 501-3924

² National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norindanchi P.O. Box 5, Ibaraki 305-0901

Chicken embryos incubated for 3 days were cultured using Aigamo duck eggshells or chicken double-yolked eggshells. The hatching rates were 18% (2/11) for Aigamo duck eggshells and 30% (3/10) for chicken double-yolked eggshells. The hatched chicks reached sexual maturity and showed normal reproductive performance. The thickness of the Aigamo duck eggshell was almost the same as that of the chicken eggshell, but the eggshell membranes were about three times thicker. The number of pores per cm² eggshell was about 30% less in the Aigamo duck eggshell compared with those in the chicken double-yolked eggshell. The results show that Aigamo duck eggshells could be used for culturing chicken embryos as a surrogate eggshell.

(*Jpn. Poult. Sci.*, **37** : 175-179, 2000)

Key words : Aigamo duck egg, embryo culture, chicken double-yolked egg, chick embryo, hatch

---

* Present address : School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara, Kanagawa 229-8501