

遠距離輸送した凍結始原生殖細胞の移植による比内鶏の機能的な配偶子の生産 —高病原性鳥インフルエンザ発生時のリスク分散を想定して—

中村隼明^{1,2*}・力丸宗弘^{3*}・高橋大希³・小松 恵⁴・高橋利清³・田上貴寛⁵

¹ 大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所, 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1 444-8787

² 独立行政法人 日本学術振興会 特別研究員 (PD)

³ 秋田県畜産試験場, 秋田県大仙市字神宮寺字海草沼谷地 13-3 019-1701

⁴ 秋田県南部家畜保健衛生所, 秋田県大仙市富士見町 6-55 014-0011

⁵ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門, 茨城県つくば市池の台 2 305-0901

本研究では、高病原性鳥インフルエンザ発生時のリスク分散を想定し、茨城県つくば市のサブバンクで保管した比内鶏の凍結始原生殖細胞 (PGCs) を秋田県大仙市まで輸送した後、融解・移植による個体復元を試みた。東日本大震災の影響により凍結融解した比内鶏 PGCs の大部分を失ったものの、残りを 33 個の白色レグホーン胚へ移植することができ、このうち 19 個 (雄 12 個, 雌 7 個) がふ化し、8 羽 (雄 7 羽, 雌 1 羽) が生殖系列キメラニワトリであることを確認した。検定交雑の結果から、凍結 PGCs 由来の後代産出率が高かった雄の生殖系列キメラニワトリ 2 羽と、雌の生殖系列キメラニワトリ 1 羽を交配したが、これらの組み合わせからは比内鶏を復元できなかった。代わりに、これら雄の生殖系列キメラニワトリ 2 羽と、Rikimaru *et al.* (2014) において比内鶏の非凍結 PGCs の移植により作出した雌の生殖系列キメラニワトリ 2 羽と交配した結果、14 羽の比内鶏を復元することができた。性成熟に達した比内鶏 11 羽 (雄 6 羽, 雌 5 羽) のうち、ふ化日が比較的近い 7 羽 (雄 3 羽, 雌 4 羽) についてそれぞれ精液性状および産卵率を検査した結果、通常の比内鶏と同等の成績であった。以上より、本研究は遠距離輸送したニワトリ凍結 PGCs が機能的な配偶子へ分化することを初めて証明した。このことから、ニワトリ凍結 PGCs の保管とその遠距離輸送は、産業有用品種や希少品種の高病原性鳥インフルエンザ発生時のリスク分散になることはもちろん、近年増えつつある遺伝子改変ニワトリの維持コスト削減や系統断絶事故のバックアップに加えて配布にも資するものと期待される。

キーワード: 遠距離輸送, 生殖系列キメラニワトリ, 凍結 PGCs, 比内鶏, 復元

緒 言

ニワトリは、肉および卵を継続的に生産するための家禽として極めて重要であるのみならず、実験動物としての利用価値も非常に高い。特に我が国の畜産業では、全国各地の地鶏や銘柄鶏の作出に様々な在来鶏 (明治時代までに国内で成立、又は導入され定着したニワトリ 38 品種) が利用されており (社団法人日本食鳥協会の, 2007)、それらを利用した肉用鶏の生産羽数は年間 841 万羽にのぼる (農林水産省, 2014)。また、食卵の差別化を図るため、卵用としても在来鶏が多く利用されている。このことから在来鶏やそれらを利用した商業用の系統は、地域の養鶏産業には欠かせない貴重な遺伝資源となっている。

現在、家禽の遺伝資源は生体による系統維持が主流であるが、

これには広大な施設と多額の費用を必要とするうえ、感染症の流行や自然災害の脅威に常に曝されている。特に高病原性鳥インフルエンザについては、アジア各国で頻繁に発生しており、国内においても多くの肉用および卵用鶏が殺処分されている。地鶏や銘柄鶏の原原種鶏が絶滅した場合、復活ができない、あるいは復活に長い年月を要することになる。また、原原種鶏の損失により地域の肉および卵の生産が停滞するため、一次産業から六次産業を含めると生産地域に及ぼす経済的損失は計り知れない。このため、原原種鶏や在来鶏を有する種鶏場では、生体のみならず細胞レベルでのリスク分散が必要とされている。

ニワトリでは、精液の凍結保存は可能になっているものの、卵の凍結保存は技術的に不可能である。これに対して、胚発生過程に出現する配偶子の前駆細胞である始原生殖細胞 (PGCs) は凍結保存することが可能であり、他のニワトリ胚へ移植することにより受精能を持つ配偶子へ分化することから (Naito *et al.*, 1994a; Nakamura *et al.*, 2010a)、雌雄両方に由来する遺伝資源を安全に長期間保存することができる。秋田県畜産試験場 (以下、秋田畜試) では、日本三大地鶏の一つである比内地鶏を生産するための比内鶏の原原種鶏を有しているため、将来的には秋田県のメインバンクおよび県外のサブバンクにて凍結 PGCs を保管することに

2015 年 8 月 10 日受付, 2015 年 10 月 14 日受理

連絡者: 田上貴寛

〒305-0901 茨城県つくば市池の台 2 農研機構畜産研究部門

Tel: 029-838-8624

Fax: 029-838-8624

E-mail: tagami@affrc.go.jp

*中村隼明と力丸宗弘は筆頭著者として同等の貢献をした。

より、高病原性鳥インフルエンザ発生時のリスク分散を目指している。しかし、これまでにニワトリ凍結 PGCs を遠距離輸送し、融解・移植によって個体が復元された事例はない。そこで本研究では、高病原性鳥インフルエンザ発生時のリスク分散を想定して、県外のサブバンクとして茨城県に所在する国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所を設定し、同所で採取・保管した比内鶏の凍結 PGCs を秋田県まで輸送した後融解・移植によって比内鶏を復元することができるか検討することを目的とした。

材料と方法

1. 種卵および供試動物

秋田畜試において維持している比内鶏および家畜改良センター岡崎牧場より導入した白色レグホーンの種卵を供試した。なお、比内鶏の種卵は、秋田畜試（大仙市）から農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所（茨城県つくば市；以下、「畜草研」）まで輸送した。本研究における動物の取り扱いおよび飼養は、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議、2006）および秋田県畜産試験場動物実験規定に則りおこなった。

2. 比内鶏の PGCs の分離および凍結保存

本作業は、畜草研においておこなった。比内鶏の種卵のふ卵は、ふ卵器（P-008B Biotype；昭和フランキ、埼玉）を用いて 39.0℃、相対湿度 50~60%、転卵 1 時間あたり 1 回（転卵角度 90°）の条件でおこなった。発生段階 14~15（Hamburger and Hamilton, 1951）の胚を用いるために、輸送された種卵 118 個を 50~54 時間ふ卵した。実体顕微鏡（MZ75；Leica Microsystems, 東京）下にてマイクロガラスピペット（内径 0.69 mm；外径 1.19 mm；先端角 20°；Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA）を用いて比内鶏胚の背側大動脈より採血し、Ca²⁺ および Mg²⁺ を含まない PBS（PBS(-)）中に回収した。なお、回収した血液の性別別はおこなわず、PGCs の分離・凍結保存・移植については雌雄混在の状態でおこなった。血液からの PGCs の分離は、Nycodenz 密度勾配遠心分離（Zhao and Kuwana, 2003）を一部改変した方法（Nakamura *et al.*, 2010b）によりおこなった。ニワトリ PGCs は位相差顕微鏡下で観察することにより、細胞の大きさや細胞質に非常に多くの顆粒を含有するといった形態学的特徴の違いから赤血球と識別することができる（Fujimoto *et al.*, 1976）。位相差顕微鏡（IX71；OLYMPUS, 東京）下にて濃縮した細胞中から、マイクロガラスピペット（内径 0.69 mm；外径 1.19 mm；先端角 20°；Drummond Scientific Co.）を用いて形態的に異常のみられなかった PGCs のみを回収した。回収した比内鶏 PGCs は、1.2 mL の凍結チューブ（Nalgene, Rochester, NY, USA）内に準備した細胞凍結保存液（セルバンカー 1；十慈フィールド株式会社, 東京）200 μ L 中に懸濁した。凍結チューブはクライオ 1℃凍結容器（Nalgene™ Cryo 1℃ Freezing Container；Nalgene, Rochester, NY, USA）を用いて -80℃ まで 1 分あたり 1℃ ずつ冷却した後、畜草研の液体窒素タンク中にて 1~2 ヶ月間凍結保存した（-196℃）。

3. 凍結 PGCs の輸送および生殖系列キメラニワトリの作出

秋田畜試にて凍結 PGCs から比内鶏を復元するために、畜草研にて凍結チューブを凍結試料搬送容器ドライシッパー（DR-2DS；

クライオワン、大阪）に移して専用ハードケース内に梱包後、鉄道ならびに乗用車を利用して搬送した。具体的には、JR 常磐線ひたち野うしく駅から上野経由で秋田新幹線大曲（秋田）駅まで鉄道を利用し、研究機関と駅間の移動には乗用車を利用した。搬送に要した時間は約 6 時間であった。秋田畜試では白色レグホーンの種卵をふ卵器（P-008(B)型；昭和フランキ）を用いて前述と同様の条件で 52 時間ふ卵した。卵殻の鈍端に極小の穴を開けた後、鋭端に直径 1.0-1.5 cm の窓を開けた。実体顕微鏡（SZK12；オリンパス）下にて、マイクロガラスピペット（内径 0.69 mm；外径 1.19 mm；先端角 20°；Drummond Scientific Co.）を用いて白色レグホーン胚の背側大動脈から血液（3.5~6 μ L）を除去した。この操作により、宿主胚の内在性 PGCs 数の減少が期待される（Naito *et al.*, 1994b）。比内鶏凍結 PGCs の融解は、液体窒素中から取り出した凍結チューブを 39.0℃ の恒温槽へ浸漬して急速におこなった。凍結保護液を除去するため、10% ウシ胎児血清（Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA）を含む PBS(-) にて凍結融解した PGCs を洗浄し、5 分間遠沈した後（200 g, 室温）、上清を除去した。細胞懸濁液約 20 μ L をプラスチックディッシュ上に滴下し、位相差顕微鏡（IX71；オリンパス）下にて、凍結融解した比内鶏 PGCs をマイクロガラスピペット内に回収した。回収した比内鶏 PGCs を約 100~200 個ずつ、実体顕微鏡（SZK12；オリンパス）下にて、白色レグホーン胚の背側大動脈より血液中へ移植した。卵白を 2~3 mL 除去した後、卵殻鋭端部の窓をラップで覆い、38.5℃、相対湿度 50~60%、転卵 1 時間あたり 2 回（転卵角度 30°）の条件にてふ化までふ卵した。

4. 検定交雑

性成熟した操作個体は、人工授精により通常の比内鶏と交配し、それぞれ約 100 羽の後代の羽色を鑑別した。ドナーに用いた比内鶏は、優性白色遺伝子座を劣性ホモ (*i/i*) で保有するために羽色が茶色である。これに対して、宿主に用いた白色レグホーンは、優性白色遺伝子座を優性ホモ (*I/I*) で保有するために羽色が白色である。したがって、検定交雑によって得られる羽色が茶色のヒヨコ (*i/i*) は比内鶏の PGCs に由来する後代であり、羽色が白色で小さな黒色の斑点があるヒヨコ (*I/i*) は宿主の内在性 PGCs に由来する後代である（Rikimaru *et al.*, 2014）。本研究では、羽色が茶色の後代を産出した操作個体を生殖系列キメラニワトリと判定した。

5. 比内鶏の復元

検定交雑の結果から比内鶏の凍結 PGCs 由来の後代産出率が高かった雄の生殖系列キメラニワトリ 2 羽（Z703 と Z718）と、雌の生殖系列キメラニワトリ 1 羽（Z707）を人工授精により交配し、後代を可能な限り得てその羽色を鑑別した。

続いて、前述の雄の生殖系列キメラニワトリ 2 羽（Z703 と Z718）と、Rikimaru *et al.* (2014) において報告した凍結保存していない新鮮な PGCs を移植した雌の生殖系列キメラニワトリ 2 羽（B892 と B899；比内鶏 PGCs 由来の後代産出率はそれぞれ 37.7% と 71.7%）を人工授精により交配し、後代を可能な限り得てその羽色を鑑別した。

なお、羽色が茶色の後代については、比内鶏 DNA 識別マーカー（Rikimaru *et al.*, 2014）を用いて DNA レベルでの鑑別もお

こなった。

6. 復元した比内鶏の飼養管理

生殖系列キメラニワトリ同士の交配により復元した比内鶏の幼雛は、4 段式バタリーケージ (78.5 cm×73.0 cm×48.3 cm) で 4 週齢まで飼育した。その後、育雛用ケージ (90.6 cm×60.5 cm×60.5 cm) に移して 17 週齢まで飼育した。18 週齢以降、雄は平飼い舎、雌は採卵用ケージ (22.7 cm×39.5 cm×45.5 cm) へ移して 60 週齢まで飼育した。

飼料は、0~4 週齢まで幼雛用 (ME, 3,000 kcal/kg; CP, 24%), 5~10 週齢まで中雛用 (ME, 2,850 kcal/kg; CP, 18%), 11~17 週齢まで大雛用 (ME, 2,800 kcal/kg; CP, 15%), 18 週齢以降成鶏用 (ME, 2,850 kcal/kg; CP, 18%) を給与した。なお、18~60 週齢の期間では、明期を 16 時間に設定した。飼料と飲水は、試験期間を通して自由摂取とした。

7. 復元した比内鶏の精液性状および産卵率

生殖系列キメラニワトリ同士の交配により復元した比内鶏のうちふ化日が比較的近い個体について、雄では腹部マッサージ法により採取した精液中の精子濃度 (百万個/mL) および精子運動率を調査し、雌では 21~60 週齢におけるヘンディ産卵率および 4 週間ごとの産卵率を算出した。なお、精子濃度と精子運動率につ

いては、精液を希釈液で 100 倍に薄めた後、37℃に加温した測定専用のスライドグラスチャンバーに移し、精子運動解析装置 (SMAS; 株式会社ディテクト, 東京) を用いて評価した。

結 果

1. 生殖系列キメラニワトリにおける比内鶏 PGCs 由来の後代産出率

畜草研にて採取した合計 9,446 個の比内鶏 PGCs (合計 10 バイアル) を 1~2ヶ月凍結保存した後、試験を実施するために秋田畜試へ搬送した。凍結融解後における比内鶏 PGCs の回収率は、65.5±4.1% (4 バイアル) であった。なお、移植当日東日本大震災の激しい揺れによって凍結融解した比内鶏 PGCs の大部分を失ったため、残る 6 バイアルの回収率は計測できなかった。不特定数 (約 100~200 個) の PGCs を 33 個の白色レグホーン胚へ移植した結果、19 羽 (雄 12 羽, 雌 7 羽) がふ化し、性成熟に達した。検定交雑の結果、比内鶏の凍結 PGCs を移植した操作個体 8 羽 (雄 7 羽, 雌 1 羽) より茶色の後代が得られたことから、生殖系列キメラニワトリであると判定した (表 1 および 2)。これら生殖系列キメラニワトリにおける比内鶏の凍結 PGCs 由来の後代産出率は 8.7±4.4% (最高 38.7%, 最低 1.7%) であった。

表 1. 比内鶏の凍結 PGCs を移植した雄の操作個体と通常の雌の比内鶏の交配による検定交雑

キメラ ID	後代数	ドナー由来の後代数 (茶色のヒヨコ)	宿主由来の後代数 (黒斑のある白色のヒヨコ)	ドナー由来後代の割合 (%)
Z703	111	43	68	38.7
Z708	89	0	89	0.0
Z709	109	0	109	0.0
Z710	106	4	102	3.8
Z711	136	0	136	0.0
Z712	103	5	98	4.9
Z713	114	0	114	0.0
Z714	107	2	105	1.9
Z715	110	0	110	0.0
Z717	102	4	98	3.9
Z718	112	6	106	5.4
Z719*	83	8	75	9.6

*, Z719 は途中へい死

表 2. 比内鶏の凍結 PGCs を移植した雌の操作個体と通常の雄の比内鶏の交配による検定交雑

キメラ ID	後代数	ドナー由来の後代数 (茶色のヒヨコ)	宿主由来の後代数 (黒斑のある白色のヒヨコ)	ドナー由来後代の割合 (%)
Z701	108	0	108	0.0
Z702	116	0	116	0.0
Z704	118	0	118	0.0
Z705	121	0	121	0.0
Z706	106	0	106	0.0
Z707	121	2	119	1.7
Z716	105	0	105	0.0

表 3. PGCs を移植した生殖系列キメラニワトリ同士の交配結果

雄	キメラ ID		後代数	ドナー由来の後代数 (茶色のヒヨコ)	雑種と白色レグホーンの 後代数	ドナー由来の割合 (%)
	雄	雌				
Z703 (凍結)	Z707 (凍結)		17	0	17	0.0
	B892 (非凍結)*		3	1	2	33.3
	B899 (非凍結)*		41	12	29	29.3
Z718 (凍結)	Z707 (凍結)		54	0	54	0.0
	B892 (非凍結)*		3	0	3	0.0
	B899 (非凍結)*		43	1	42	2.3

* B892, B899 は Rikimaru *et al.*, (2014) において作出した雌の生殖系列キメラニワトリ

表 4. PGCs から復元した雄の比内鶏の精液性状

	精子濃度 (百万/mL)	精子運動率 (%)
生殖系列キメラニワトリ から得られた比内鶏 (n=3)	2,213±2,164	69±26
比内鶏* (n=4)	2,262±1,004	77±16

* 2013 年生まれの比内鶏種鶏

表 5. PGCs から復元した雌の比内鶏の産卵成績

比内鶏 ID	週 齢										平均
	21~24	25~28	29~32	33~36	37~40	41~44	45~48	49~52	53~56	57~60	
C960	0.0	25.0	28.6	53.6	28.6	0.0	0.0	0.0	7.1	17.9	16.1
C990	0.0	25.0	64.3	57.1	64.3	50.0	0.0	0.0	39.3	32.1	33.2
C998	0.0	10.7	53.6	57.1	7.1	0.0	0.0	0.0	57.1	64.3	25.0
C919	14.3	71.4	64.3	60.7	35.7	39.3	53.6	14.3	57.1	3.6	41.4
平均	3.6	33.0	52.7	57.1	33.9	22.3	13.4	3.6	40.2	29.5	28.9
比内鶏*	4.4	20.5	34.1	40.0	37.5	25.9	38.1	32.1	27.6	25.4	28.5

* 群飼ケージにおける比内鶏種鶏の平均産卵成績 (2011 年~2013 年)

2. 生殖系列キメラニワトリ同士の交配による比内鶏の復元

前述の検定交雑の結果から、比内鶏の凍結 PGCs 由来の後代産出率が高かった雄の生殖系列キメラニワトリ 2 羽 (Z703 と Z718; 比内鶏 PGCs 由来の後代産出率はそれぞれ 38.7% と 5.4%) と、本研究において 1 羽のみ得られた雌の生殖系列キメラニワトリ (Z707; 比内鶏 PGCs 由来の後代産出率は 1.7%) を交配したが、これらの掛け合わせでは比内鶏を復元できなかった (表 3)。代わりに、前述の雄の生殖系列キメラニワトリ 2 羽 (Z703 と Z718) と、Rikimaru *et al.* (2014) において報告した比内鶏の非凍結 PGCs を移植した雌の生殖系列キメラニワトリ 2 羽 (B892 と B899; 比内鶏 PGCs 由来の後代産出率はそれぞれ 37.7% と 71.7%) を交配した結果、3 通りの掛け合わせ (Z703 と B892, Z703 と B899, Z718 と B899) から比内鶏を復元できた。比内鶏の復元率は、それぞれ 33.3% (1/3), 29.3% (12/41), 2.3% (1/43) であった。比内鶏 DNA 識別マーカーによる解析の結果、これら復元個体の遺伝子型はすべて比内鶏のもの一致したことから、DNA レベルにおいても比内鶏であることが確認された (データ非表示)。

3. 復元した比内鶏の精液性状と産卵率

生殖系列キメラニワトリ同士の交配により復元された比内鶏 14 羽のうち、3 羽は育成過程でへい死し、11 羽 (雄 6 羽, 雌 5 羽) が性成熟に達した。復元した比内鶏のうちふ化日が比較的近かった 7 羽 (雄 3 羽, 雌 4 羽) について、それぞれ精液性状および産卵率を検査した。本研究において復元した雄の比内鶏の精液性状を表 4 に示した。復元した雄の比内鶏の精子濃度および精子運動率はそれぞれ 2,213±2,164 (百万個/mL) および 69±26% であり、通常の雄の比内鶏 (精子濃度 2,262±1,004 (百万個/mL), 精子運動率: 77±16%) と同等の成績であった。また、復元した雌の比内鶏における 21~60 週齢のヘンディ産卵率は 28.9±5.4% であり、通常の雌の比内鶏 (28.5%) と同等の成績であった (表 5)。

考 察

本研究は、比内鶏を地鶏の原原種鶏のモデルとして用いて、遠距離輸送したニワトリ凍結 PGCs が融解・移植によって受精能を持つ配偶子へ分化することを初めて証明した。本研究では、茨城

県つくば市（サブバンク）で保管した凍結 PGCs を秋田県大仙市（メインバンク）まで搬送した後、雌雄両方の生殖系列キメラニワトリを作出することに成功した。この結果から、サブバンクにおける凍結 PGCs の保管は、高病原性鳥インフルエンザ等の感染症発生時のリスク分散対策として現在最も有効な手段であると考えられる。

本研究では、遠距離輸送した凍結 PGCs を移植して作出した生殖系列キメラニワトリ同士の交配によって比内鶏を復元することができなかった。これは、作出された生殖系列キメラニワトリ 8羽のうち雌は 1羽のみであり、そのドナー PGCs 由来の後代産出率が 1.7% と低かったためと考えられる。主な原因として、凍結・融解した PGCs を計数している最中に東日本大震災が発生したため、PGCs の大部分を損失したことに加えて、作業を中断したことにより適切な発生段階で PGCs を移植できなかったことが挙げられる。また、作業再開後も停電等による非常に困難な状況下で移植したことも一因として挙げられる。一方で、Rikimaru *et al.* (2014) において作出したドナー PGCs 由来の後代産出率が比較的高い (37.7% と 71.7%) 雌の生殖系列キメラニワトリとの交配では、比内鶏を復元することができた。これらの結果から、凍結 PGCs から効率的に個体復元するためには、ドナー PGCs 由来の後代産出率の高い生殖系列キメラニワトリを作出することが重要となる。ドナー PGCs 由来の後代産出率の高い生殖系列キメラニワトリを作出するには、ドナー PGCs と宿主胚の性を一致する方法、および宿主胚の内在性 PGCs を除去する方法が効果的である (Nakamura *et al.*, 2013a)。前者に関しては、異性の宿主胚へ移植したドナー PGCs は機能的な配偶子へ分化しない (Naito *et al.*, 1999; Tagami *et al.*, 1997, 2007) ことから、雌雄の PGCs をそれぞれ凍結保存することが望ましい。後者に関しては、PGCs が一過的に血中を循環する鳥類特有の特徴 (Nakamura *et al.*, 2007) を利用して宿主胚の血液を除去することにより PGCs を除去する方法 (Naito *et al.*, 1994b; Nakamura *et al.*, 2010a) や、 γ 線や X 線を宿主胚に照射することにより PGCs を除去する方法 (Carsience *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 2012) により、ドナー PGCs 由来の後代産出率が向上した。また、アルキル化剤であるブスルファン (1, 4-butanediol dimethanesulfonate) を宿主胚に投与することにより PGCs を除去する方法では、ドナー PGCs 由来の後代のみを産出する生殖系列キメラニワトリがコンスタントに作出された (Nakamura *et al.*, 2010b)。これらの方法を利用して生殖系列キメラニワトリを作出することにより、凍結 PGCs からの効率的な個体復元が期待される。

今後、凍結 PGCs の保管によるニワトリ遺伝資源のリスク分散を実施していくうえで、PGCs の凍結保存法の改善は重要な課題である。現在使用している凍結プロトコルは、手順が非常にシンプルであり、様々なニワトリ品種やウズラにおいても融解後の回収率および生存率が安定している (Nakamura *et al.*, 2011, 2013b)。一方で、本法では PGCs の凍結・融解操作に伴うダメージにより、生殖巣への移住能や分裂能が低下する (Nakamura *et al.*, 2011)。冷却速度や凍結保護剤等の条件を最適化することにより、細胞内外の氷晶形成と高濃度の凍結保護剤によるダメージの低減が期待される。また、耐凍性が低いヒトを含む霊長類の

ES 細胞では、ガラス化法を用いることにより有意に生存率が向上する (Fujioka *et al.*, 2004)。最近の研究において、ガラス化法はゼブラフィッシュやコイの PGCs の超低温保存に有効であることが示された (Higaki *et al.*, 2013; Kawakami *et al.*, 2015)。また、ガラス化法はニワトリ 7 日胚生殖巣由来の生殖細胞の超低温保存にも利用可能であり (Kohara *et al.*, 2008)、凍結溶液や凍結容器等の条件を最適化することにより生存率の向上が期待される。

生殖系列キメラニワトリ同士の交配により復元した比内鶏の精液性状および産卵率は、通常の比内鶏と同等の成績であった。復元した雌の比内鶏の一部には卵を産まない休産期間が確認されたが、これは比内鶏が他の品種や商業鶏と比較してクラッチ間の休産期間が長い (Robinson *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2007) ことや、他の日本鶏と同様に季節繁殖性が強い (河野ら, 1982) ため、ふ化時期の違いによる影響を受けた可能性が考えられる。復元した雄の比内鶏の精子濃度および精子運動率は、正常な比内鶏と同等の成績であった。復元した雄の比内鶏の精子濃度 (約 20 億/mL) は一般的なニワトリ (30~50 億/mL; 家畜改良センター岡崎牧場, 2006) と比較して低かったが、品種によって前述の濃度よりも低いことが報告されている (Lin *et al.*, 2005) ことから、品種間差によるものと考えられる。

ニワトリ遺伝資源を安全に長期間保存するためには、精液の凍結保存も重要である。精液と PGCs の両方を凍結保存することにより、雌の生殖系列キメラニワトリに凍結精液を人工授精することが可能になる。これにより、生殖系列キメラニワトリ同士の交配よりも効率的な個体復元が可能になる。生体と凍結細胞を同じ施設に保管した場合、有事の際にこれらを利用できない可能性がある。リスク分散のためには、凍結 PGCs と凍結精液をメインバンクと、遠隔地のサブバンクの両方で保管する必要がある。このため、サブバンクとなる機関と連携を取り、凍結細胞を保管するための体制を整備することも重要である。現在、農業生物資源ゾーンバンク (NIAS ゼーンバンク, つくば) や大学連携バイオバックアッププロジェクトセンター (IBBP センター, 岡崎) 等の機関にて所定の手続きを行うことにより凍結細胞や凍結精液の保管が可能である。

ニワトリにおいて雄の PGCs の *in vitro* 培養法が樹立された (van de Lavoie *et al.*, 2006; Macdonald *et al.*, 2010; Miyahara *et al.*, 2014, 2016) ことにより、ニワトリにおいてもマウス同様の遺伝子改変が可能になり、これまでに様々な遺伝子改変ニワトリが作製されてきた (van de Lavoie *et al.*, 2006; Macdonald *et al.*, 2012; Park and Han 2012; Glover *et al.*, 2013)。このため、実験動物としてのニワトリの価値は一層高くなり、遺伝子改変ニワトリを用いた基礎および応用研究が世界規模で展開されることが予想される。これに伴って、遺伝子改変ニワトリの維持コスト削減や系統断絶事故のバックアップ、他研究機関への配布が重要になると考えられる。ニワトリ凍結 PGCs の保管とその遠距離輸送は、産業有用種や希少品種の高病原性鳥インフルエンザ等の感染症発症時のリスク分散になることはもちろん、遺伝子改変ニワトリの維持コスト削減やバックアップに加えて配布にも資するものと期待される。

謝 辞

供試鶏の飼養管理を担当していただいた秋田県畜産試験場比内地鶏エリアの皆様へ厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Carsience RS, Clark ME, Verrinder Gibbins AM and Etches RJ. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development*, 117 : 669-675. 1993.
- Chen CF, Shiue YL, Yen CJ, Tang PC, Chang HC and Lee YP. Laying traits and underlying transcripts, expressed in the hypothalamus and pituitary gland, that were associated with egg production variability in chickens. *Theriogenology*, 68 : 1305-1315. 2007.
- Fujimoto T, Ukeshima A and Kiyofuji R. The origin, migration and morphology of primordial germ cells in the chicken embryo. *Anatomical Record*, 185 : 139-145. 1976.
- Fujioka T, Yasuchika K, Nakamura Y, Nakatsuji N and Suemori H. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *International Journal of Developmental Biology*, 48 : 1149-1154. 2004.
- Glover J, Taylor L, Sherman A, Zeiger-Poli Caroline, Sang HM and McGrew M. A novel piggybac transposon inducible expression system identifies a role for akt signalling in primordial germ cell migration. *PLoS ONE*, 8 : e77222. 2013.
- Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88 : 49-92. 1951.
- Higaki S, Kawakami Y, Eto Y, Yamaha E, Nagano M, Katagiri S, Takada T and Takahashi Y. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. *Cryobiology*, 67 : 374-382. 2013.
- 家畜改良センター岡崎牧場. 鶏の繁殖技術マニュアル. 精液と精子, 7頁. 2006.
- Kawakami Y, Saito T, Fujimoto T, Goto-Kazeto R, Takahashi E, Adachi S, Arai K and Yamaha E. Viability and motility of vitrified/thawed primordial germ cell isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) somite embryos. *Journal of Animal Science*, 90 : 495-500. 2015.
- Kohara Y, Kanai Y and Tajima A. Cryopreservation of gonadal germ cells (GGCs) from the domestic chicken using vitrification. *Journal of Poultry Science*, 45 : 57-61. 2008.
- 河野友宏・伊藤 博・一戸健司. 岐阜地鶏における血中プロゲステロン, エストラジオールおよびテストステロン濃度の季節的変動. *日本家禽学会誌*, 19 : 292-299. 1982.
- Lin YF, Chang SJ, Yang JR, Lee YP and Hsu AL. Effects of supplemental vitamin E during the mature period on the reproduction performance of Taiwan native chicken cockerels. *British Poultry Science*, 46 : 366-373. 2005.
- Macdonald J, Glover JD, Taylor L, Sang HM and McGrew MJ. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS ONE*, 5 : e15518. 2010.
- Macdonald J, Taylor L, Sherman A, Kawakami K, Takahashi Y, Sang HM and McGrew MJ. Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 : E1466-1472. 2012.
- Miyahara D, Mori T, Makino R, Nakamura Y, Oishi I, Ono T, Nirasawa K, Tagami T and Kagami H. Culture conditions for maintain propagation, long-term survival and germline transmission of chicken primordial germ cell-like cells. *Journal of Poultry Science*, 51 : 87-95. 2014.
- Miyahara D, Oishi I, Makino R, Kurumisawa N, Nakaya R, Ono T, Kagami H and Tagami T. Chicken stem cell factor enhances primordial germ cell proliferation cooperative with fibroblast growth factor 2. *Journal of Reproduction and Development*, (in press) https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/advpub/0/advpub_2015-128/_pdf
- Naito M, Tajima A, Tagami T, Yasuda Y and Kuwana T. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102 : 321-325. 1994a.
- Naito M, Tajima A, Yasuda Y and Kuwana T. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, 39 : 153-161. 1994b.
- Naito M, Matsubara Y, Harumi T, Tagami T, Kagami H, Sakurai M and Kuwana T. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117 : 291-298. 1999.
- Nakamura Y, Kagami K and Tagami T. Development, differentiation and manipulation of germ cells in chicken. *Development, Growth & Differentiation*, 55 : 20-40. 2013a.
- Nakamura Y, Tasai M, Takeda K, Nirasawa K and Tagami T. Production of functional gametes from cryopreserved primordial germ cells of Japanese quail. *Journal of Reproduction and Development*, 59 : 432-437. 2013b.
- Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Ono T, Kagami H, Takeda K, Nirasawa K and Tagami T. X-irradiation removes endogenous primordial germ cells (PGCs) and increases germline transmission of donor PGCs in chimeric chickens. *Journal of Reproduction and Development*, 58 : 432-437. 2012.
- Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H and Tagami T. Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken : concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujidori). *Reproduction, Fertility and Development*, 22 : 1237-1246. 2010a.
- Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Watanabe H, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H and Tagami T. 2011. Viability and functionality of primordial germ cells after freeze-thaw in chickens. *Journal of Poultry Science*, 48 : 57-63. 2011.
- Nakamura Y, Usui F, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H and Tagami T. Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biology of Reproduction*, 83 : 130-137. 2010b.
- Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H and Tagami T. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poultry Science*, 86 : 2182-2193. 2007.
- 日本学術会議. 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン. 東京. 2006.

- 農林水産省. 農林水産統計. 食鳥流通統計調査 (平成 25 年). 2014.
- Park TS and Han JY. piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 : 9337-9341. 2012.
- Rikimaru K, Nakamura Y, Takahashi D, Komatsu M, Ito N, Matsubara K and Tagami T. Production of pure Hinai-dori with normal reproductive capability from transferred primordial germ cells. *Journal of Poultry Science*, 51 : 297-306. 2014.
- Robinson FE, Hardin RT and Robblee AR. Reproductive senescence in domestic fowl : effects on egg production, sequence length and inter-sequence pause length. *British Poultry Science*, 31 : 871-879. 1990.
- 社団法人日本食鳥協会. 国産銘柄鶏ガイドブック 2007. 2007.
- Tagami T, Matsubara Y, Hananda H and Naito M. Differentiation of chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Development Growth & Differentiation*, 39 : 267-271. 1997.
- Tagami T, Kagami H, Matsubara Y, Harumi T, Naito M, Takeda K, Hanada H and Nirasawa K. Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Molecular Reproduction and Development*, 74 : 68-75. 2007.
- van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME and Etches RJ. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 441 : 766-769. 2006.
- Zhao DF and Kuwana T. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *British Poultry Science*, 44 : 30-35. 2003.

Production of Functional Gametes Following Transfer of Frozen-thawed Primordial Germ Cells of Hinai-dori Fowl after Long Distance Transportation —For Diversification of the Risk to Outbreaks of Highly Pathogenic Avian Influenza—

Yoshiaki Nakamura^{1,2*}, Kazuhiro Rikimaru^{3*}, Daiki Takahashi³, Megumi Komatsu⁴,
Toshikiyo Takahashi³ and Takahiro Tagami⁵

¹National Institute of Natural Sciences, National Institute for Basic Biology,
5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan

²Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science (PD)

³Akita Prefectural Livestock Experiment Station, 13-3 Kaisonumayachi, Jinguji, Daisen, Akita 019-1701, Japan

⁴Akita Prefectural Nanbu Livestock Hygiene Service Center, 6-55 Fujimi, Daisen, Akita 019-0011, Japan

⁵Naro Institute of Livestock and Grassland Science, 2 Ikenodai, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan

* Y.N. and K.R. contributed equally to this work.

This is the first successful report to produce functional gametes from cryopreserved chicken primordial germ cells (PGCs) after long distance transportation. PGCs of Hinai-dori fowl, a chicken breed that native to Hinai area in Akita, Japan, were transported from Tsukuba (Ibaraki, Japan : subbank) to Daisen (Akita, Japan : main bank), then demonstrated whether frozen PGCs could give rise to functional gametes after long distance transportation. Though a major part of frozen-thawed Hinai-dori PGCs had been lost due to the Great East Japan earthquake (March 11, 2011), the remaining could be transplanted intravascularly into recipient White Leghorn chicken embryos. Among 33 manipulated embryos, 19 (twelve males and seven females) hatched, and eight (seven males and one female) were confirmed as germline chimeras by test-cross analysis. Two male chickens with highest germline chimerism (Z703 and Z718) were mated with one female germline chimeric chickens but no Hinai-dori offspring were obtained from this combination. Alternatively, 14 Hinai-dori offspring were regenerated by crossing these two male germline chimeras with two female germline chimeras that had been received unfrozen Hinai-dori PGCs (B892 and B899 ; Rikimaru *et al.*, 2014). Among them, 11 Hinai-dori offspring reached sexual maturity, tested seven birds (three males and four females) had normal semen property or hen-day egg production, respectively. In conclusion, storage of frozen PGCs in subbank and subsequent transportation will be a powerful tool not only for diversification of the risk to outbreaks of highly pathogenic avian influenza in poultry industry but also for cost reduction, backup and distribution of genetically modified chickens.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 53 : J7-J14, 2016)

Key words : frozen PGCs, germline chimeras, Hinai-dori fowl, long distance transportation, regeneration