

《技術報告》

地鶏や野鶏等の貴重家禽から分離した始原生殖細胞 (PGCs) の凍結保存の試み

伊藤なつき¹・川越雄太¹・斎藤靖史¹・佐藤直人²・斉藤美緒³・

力丸宗弘⁴・辻本恒徳⁵・齋藤文也⁶・松原和衛¹

¹岩手大学大学院農学研究科, 岩手県盛岡市上田 3-18-8 020-8550

²岩手県畜産研究所, 岩手県滝沢村砂込 737-1 029-0173

³福島県畜産研究所, 福島県福島市荒井 18 960-2156

⁴秋田県農林水産センター畜産試験場, 秋田県大仙市神宮寺字海草沼谷地 13-3 019-1701

⁵盛岡市動物公園, 岩手県盛岡市新庄 60-18 020-0803

⁶小岩井農牧株式会社小岩井農場技術研究センター, 岩手県雫石町丸谷地 36-1 020-0507

卵細胞の長期保存が困難なニワトリにおいて, 始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells; PGCs) は遺伝資源の保存のための有効な細胞である。本研究では, ニワトリで確立された PGCs 凍結保存技術とキメラ作出技術が, 東北地域で飼養されている地鶏や動物園で展示されている野鶏等の貴重種に対して有効か否かを検討した。凍結・融解した PGCs を含む各鶏種の細胞集団は生存率を解析した後, 培養を行って細胞の増殖の確認と PGCs の同定を行った。また, PGCs を採取した際に保存した体細胞から DNA による性別判別を実施した。さらに, 凍結した PGCs を含む細胞集団が生殖系キメラ作出のためにレシピエント胚に移植可能かを検討するため, PKH-26 で標識したドナー PGCs の追跡を試みた。

DNA による性別判別はすべての個体で正常に解析され, PGCs は当研究室の液体窒素に半永久的に保存するとともに, 性別データ等はコンピューターに記録保存した。凍結・融解における PGCs を含む懸濁液の細胞生存率は 65.6~80.9% であり, 培養後には細胞の増殖が観察された。培養された細胞は, PAS 染色, 抗 SSEA-1, 抗 PGC-IgG に陽性であり, PGCs を含むことを確認した。また, PKH-26 標識ドナー PGCs を移植した白色レグホン (WL) の生殖腺を凍結切片にして蛍光顕微鏡下で観察したところ, PKH-26 の蛍光を発する PGCs が確認された。

したがって, 本研究で凍結保存した PGCs は生殖巣への移動能を有しており, トリインフルエンザ等の有事には WL 等を用いて貴重な品種を復元することが可能であることが示唆された。また, PGCs の性別を明らかにして PGCs バンクのデータとして保存することにより, 同性キメラの作成が容易になり, キメラ作出の際にキメリズムの向上が期待できる。

キーワード: PGCs, 遺伝資源, 貴重家禽, PGCs バンク

緒 言

トリインフルエンザ, 口蹄疫等, 家畜の集団感染が危惧される現代において, 家畜はもちろん希少動物の保護や増殖, 遺伝資源の保存は重要な課題である。受精卵や精子, 卵子の凍結保存, 胚移植やクローン技術等のバイオテクノロジーは主に哺乳類で発達しており, 鳥類ではその発生学的特異性から遅れをとっている。鳥類では卵子が他の動物種と比較して大きく, 多量の卵黄を含みもろいこと, 発生のお大半が卵殻内で進行するなどの理由から, 哺乳類で確立された技術を応用することができず, 独自の技術が開発されてきた。

Perry (1988) は卵割の始まっていない 1 細胞期のニワトリ胚や, 卵管子宮部から採取した 16~64 細胞期のニワトリ胚の体外培養法を開発し, 人工的に孵化させることに成功した。その後, Naito *et al.* (1990) は Perry の手法を改良し, 孵化率を 7% から 34.4% まで向上させた。また, Naito and Perry (1978) は放卵直後の胚 (ステージ X) の培養法を確立し, 孵化率が 50.0~62.5% であったことを報告した。これらの技術の発達によって, ニワトリ受精卵の体外培養が可能となり, 細胞および遺伝子レベルの胚操作に応用されるようになった。一方, 哺乳類では精子や卵子, 受精卵の凍結保存技術が確立されているが, 鳥類では精子の凍結保存 (Hammerstedt, 2009; Lake and Stewart, 1978) 以外は確立されていない。近年, 生殖細胞の長期保存技術として始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells; PGCs) を凍結保存し, その PGCs を用いて生殖系キメラ個体を作出することが試みられている (Naito *et al.*, 1994; Naito, 2003; Tajima *et al.*, 1998; 吉田ら, 2006; Kuwana *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2010)。PGCs とは生殖細胞の前駆体であり, 鳥類では胚の発生とともに PGCs が形態を変えながら移動するという独自の性質を有する (Hamburg-

2010 年 12 月 9 日受付, 2010 年 12 月 27 日受理

連絡者: 松原和衛

〒020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8

岩手大学大学院農学研究科

Tel: 019-621-6160

Fax: 019-621-6160

E-mail: kazuei@iwate-u.ac.jp

er and Hamilton, 1957; Kuwana, 1993; Karagenc *et al.*, 1996; 菊地ら, 2000; Tsunekawa *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2007)。この性質を利用することで、PGCs に対して分離や移植、除去などの様々な操作を行うことができる (Aige-gil and Simkiss, 1991; Naito *et al.*, 1994; Naito *et al.*, 2004)。本研究では、PGCs が孵卵 6 日目において生殖隆起 (Germinal Ridge; GR) に定着する特性を利用し、GR から gonadal PGCs (gPGCs) を採取した。Naito *et al.* (1999) は、ドナーとレシピエントの性を一致させた場合、キメリズムが向上することを報告している。したがって、性判別のデータとともに PGCs を長期保存することは、希少鳥類はもちろん、飼育地域の限られる家禽の遺伝資源を集団感染等から守るために有効と考えられる。

以上のことから本研究では、主に東北地方に現存する地鶏 (岩手地鶏, 岩手大型ロード, 南部かしわ基礎鶏, 純系会津地鶏, 比内鶏) や動物園で展示されている野鶏 (赤色野鶏, 金鶏, 銀鶏) を用いて、(1)PGCs の凍結保存, (2)ドナー胚の性判別, (3)凍結 PGCs を用いた生殖系キメラ作出の可能性を検討した。

材料と方法

1. 希少鶏種の胚性生殖巣細胞の採取と凍結保存

ドナー PGCs は、岩手地鶏 (赤笹: JR, 白笹: JW), 岩手大型ロード (R), 南部かしわ基礎鶏 (CJ), 純系会津地鶏 (AJ), 比内鶏 (H), 赤色野鶏 (RJ), 金鶏 (GP), 銀鶏 (LAP) の 4 種から採取した。岩手地鶏 2 品種, 岩手大型ロード, 南部かしわ基礎鶏の種卵は岩手県畜産研究所から、純系会津地鶏は福島県畜産研究所から、比内鶏は秋田県農林水産センター畜産試験場から、野鶏 3 種は盛岡市動物公園から入手した。これらの種卵を 6 日間孵卵し、実体顕微鏡下で GR を採取した。それぞれ 1.5 ml チューブに移し、Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, 1 mM EDTA・4Na: GIBCO) を 100 μ l 加え、37°C で 2 分間インキュベートした。ピペティングにより細胞を解離し、ペニシリン・ストレプトマイシン (10,000 IU/ml, 10 mg/ml: SIGMA) 100 μ l を含む 10% ニワトリヒナ血清 (自家製) 添加 DMEM (SIGMA) 培地を 1 ml 加えて反応を停止させた。遠心して上清を取り除き、上記した培地で 2 回洗浄して Trypsin-EDTA を除去した。

Trypsin-EDTA 処理後、gPGCs を含む細胞懸濁液に血清入りのセルバンカー (日本全薬工業株式会社, Cat. No. 08-001-002) を 500 μ l 加え、1.2 ml セラムチューブに移した。セラムチューブは -80°C で一晩凍結した後、液体窒素に移し保存した。

7 日以上凍結保存した細胞懸濁液を 37°C のウォーターバスで 5 分間融解し、ただちに上述した培地を加えて遠心分離後上清を除去した後、上記の培地で 2 回洗浄することにより、セルバンカーを除去した。細胞懸濁液 30 μ l をエペンドルフチューブに移し、同量のトリパンプルー溶液と混合し、ノイバウエル血球計算盤で細胞生存率を計測した。なお、細胞数の計測は各鶏種 3 個体ずつ行った。残った懸濁液は 4 ウェル培養プレートに入れ、5% CO₂, 37°C に設定した CO₂ インキュベーターで 7 日間培養した。その後、PAS 染色 (アスカ純薬, Cat. No. 395B-1KT), 抗 SSEA-1 モノクローナル抗体 (MAB, Cat.No. 4301), FITC-Rabbit Anti-Mouse 12.5dpc PGCs IgG (Mayanagi *et al.*, 2003) によって

gPGCs の同定を行った。

2. PCR 法によるドナー胚の性判別

DNA の抽出は Walsh *et al.* (1991) の方法に従って、胚凍結組織片約 3 mm³ を 1.5 ml のマイクロチューブに入れ 5% (wt/vol) Polystyrene-divinylbenzene iminodiacetate (Chelex100: Bio-Rad)/MQ 懸濁液を混和して 8 分間煮沸した後、12,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を DNA サンプルとして用いた。PCR は Itoh *et al.* (2001) の方法に従って行った。PCR 反応液、プライマーおよび PCR 条件は表 1 の通りである。

PCR 産物は電気泳動によって確認した。0.5% TBE (1×TBE: 0.086 M Tris, 0.089 M ホウ酸, 0.002 M EDTA (pH 8.0)) をバッファーとし、1.5% アガロース (Sea Ag LE agarose: BMBio)/0.5% TBE ゲルで、電気泳動装置 Mupid-3 (コスモ・バイオ) を使用して 100 V で約 1 時間電気泳動を行った。泳動終了後、エチジウムブロマイド (EtBr) で染色し、紫外線下 (波長 312 nm) でバンドを確認し写真に記録した。

3. 凍結・融解 PGCs のレシピエント胚への移植

PKH-26 赤色蛍光リンカーキット (SIGMA, Cat. No. 58H0427) で凍結後融解した RJ, GP ならびに LAP の gPGCs を含む GR 細胞を標識した。この標識した細胞を培地に浮遊させ、顕微鏡下で gPGCs をマイクロピペットによって選択的に採取し、放卵直後の白色レグホン (WL) 胚 (ステージ X) の胚盤下腔へ 50~100 個ずつ移植した。なお、宿主胚の内在性 PGCs を除去するため、あらかじめ WL 胚に 1 cm の距離から 60 秒間 UV を照射した (Keyence 社 UV-400, 365 nm, 1600 mW/cm²)。Perry (1988) と Naito *et al.* (1990) の方法に従って種卵を操作した。レシピエントは 37.8°C, 湿度 55~60%, 転卵角度 90° (片面 45°), 転卵回数 3.75 分/回の条件にて、48~52 時間孵卵した (システム II)。続いて、胚を二黄卵殻に移して塩化ビニルラップで切断面を覆い、転卵角度 30°, 転卵回数 30 分/回に設定した転卵器 (P-008 (B) 型バイオ仕様, 昭和フランキ研究所) で 3~6 日間孵卵した (システム III)。

ドナー PGCs を移植したレシピエント胚から GR を採取して PBS で洗浄した後、ベースモールド (アズワン, M475-2) に移した。サンプルの上部から十分に TISSUE FREEZING MEDIUM (コンパウンド: Polysciences) をかぶせて包埋し、液体窒素中で凍結した。組織はクリオスタットで 4~6 μ m の厚さに薄切し、蛍光顕微鏡 (OLIMPAS, AX-80) で PKH-26 由来の蛍光を観察した。

なお、本研究は岩手大学動物実験委員会の許可 (A201091) を受け、倫理規定に従って実施した。

結 果

1. PGCs の凍結成績

PGCs を含む細胞懸濁液を凍結保存し、そのうち各鶏種 3 個体をランダムに融解してトリパンプルーにより生存率を計測した。凍結した各鶏種の gPGCs の生存率は 65.6~80.9% であった (表 2)。融解後に培養した gPGCs は、凍結せずに培養した場合と同様に繊維芽細胞上に確認された。これらの gPGCs はすべて PAS 陽性, 抗 SSEA-1 陽性, 抗 PGC-IgG 陽性であった (図 1)。

表 1. 本研究で行った DNA による性別判別のプライマー配列および PCR 条件

プライマー		配列 (5' to 3')	
性別判別プライマー	USP1	CTATGCCTACCACATTCCTATTTGC	
	USP3	AGCTGGACTTCAGACCATCTTCT	
コントロールプライマー	CPE15F	AAGCATAGAAACAATGTGGGAC	
	CPE15R	AACTCTGTCTGGAAGGACTT	

試薬名	プライマー No.	液量 (μ l)	最終濃度
DNA サンプル		5	
10×PCR Buffer (10 mM MgCl ₂)		2.5	1 mM
2.5 mM dNTPs		2	0.2 mM
性別判別プライマー (10 μ M)	USP1	1	0.4 μ M
	USP3	1	0.4 μ M
コントロールプライマー (10 μ M)	CPE15F	1	0.4 μ M
	CPE15R	1	0.4 μ M
0.5 units/ μ l Taq DNA polymerase MQ		2.5	
		9	
Total		25	

Pre denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycles	Post elongation
95°C, 3 min	95°C, 80 sec	59°C, 90 sec	72°C, 60 sec	35	72°C, 3 min

2. 性別判別結果

GR 採取後のドナー胚は、 -80°C で凍結保存し、その胚の組織を用いて DNA による性別判別を行った。エラーを防ぐため、性別判別はすべての胚において 2 回ずつ行い、明確な結果が出たものを判定に使用した。250 bp 付近のバンドが Z 染色体由来のバンドであり、このバンドのみ検出されたものを雄と判定した (図 2)。また、250 bp に加えて W 染色体由来の 370 bp のバンドが検出されたものを雌と判定した。ほとんどの個体で正常にバンドが検出され、性別判別が可能であった。

3. 凍結 gPGCs の移植試験

融解後培養したドナー gPGCs (RJ, GP, LAP) を PKH-26 で標識し、UV 照射した WL の胚盤に直接移植し、孵卵 6~9 日後にレシピエント胚の GR を採取して観察を行った。なお、宿主胚 40 個へドナー PGCs を移植した結果、14 個が 6~9 日齢まで生存した。その結果、PKH-26 標識 PGCs が確認された胚の割合は平均 75.2% と高確率であった (図 3, 表 3)。

なお、本研究では将来の復元に備えて、胚ごとにデータをまとめるとともに (表 2)、凍結した PGCs を含む GR 細胞は 1 胚ずつ保存番号をつけてセラムチューブに入れ、液体窒素保管器で保存した。

考 察

貴重種に危惧される問題点として、野生種では近親交配による近交退化、地鶏では飼育域が限られるため集団感染のリスクが高くなる点があげられる。ニワトリ精子の凍結保存技術 (Hummerstedt, 2009; Lake and Stewart, 1978) は既に開発されているが、雄性生殖細胞の保存だけでは品種や系統を保存することはでき

ず、雌性生殖細胞の長期保存技術の確立が必要である。しかし、鳥類の卵細胞の特性から、現在の技術では卵子をそのまま凍結保存することはできないため、精子および卵子の前駆細胞である PGCs を保存する試みが行われている (Naito, 2003)。本研究は、東北地方に生存する貴重家禽; 地鶏や野鶏等の gPGCs を凍結・融解し、その生存率と機能性を明らかにした。

GR 細胞の凍結保存試験では、液体窒素中で 7 日以上凍結保存し、融解後における生存率はいずれの種においても 7 割程度であった。また、これらの細胞を試験管内で培養した結果、各種 PGCs マーカーに対して陽性の細胞が観察されたことから、PGCs としての特性を保持しているものと推察された。当研究室では、本研究と同様の手順にて凍結・融解した gPGCs をドナー細胞として用いて生殖系キメラの作出に成功したことから (未発表)、今回凍結した gPGCs も生殖系キメラの作出に利用可能と考察される。

また、GR を採取した胎児の組織から抽出した DNA による性別判別を行った。その結果、地鶏と野鶏においても、WL などの商業鶏の性別判別と同様の手法を用いて PCR による DNA の増幅が可能であり、すべての胚の性を判別することができた。Naito *et al.* (1999) は、ドナーとレシピエントの性別を一致させることで生殖系キメリズムが向上することを報告している。したがって、本実験のように凍結保存した PGCs の性別を明らかにしておくことは、生殖系キメラ作出、あるいは種の復元において有効と思われる。

PKH-26 で標識した RJ, GP ならびに LAP の gPGCs を UV 照射した WL の胚盤へ直接移植し、孵卵 6~9 日目まで GR を採取した。凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡下で観察した結果、培養 6~

伊藤ら：貴重家禽の PGCs の凍結保存

表 2. 本研究で凍結保存した貴重鶏種の PGCs バンクデータ

JR (75.8%)	070130-No. 03	♀	021113-No. 05	♂	081219-No. 05	♀	
070130-No. 01	♂	070130-No. 04	♀	021113-No. 06	♀	081219-No. 06	♂
070130-No. 02	♂	070130-No. 05	♀	081114-No. 01	♂	081219-No. 07	♀
070130-No. 03	♀	070130-No. 06	♀	081114-No. 02	♀	081219-No. 08	♀
070130-No. 04	♀	070130-No. 07	♂	081114-No. 03	♂	081219-No. 09	♀
070130-No. 05	♀	070130-No. 09	♀	081114-No. 04	♀	081219-No. 10	♂
070130-No. 06	♀	070130-No. 10	♂	081114-No. 05	♀	081219-No. 11	♀
070130-No. 08	♀	070202-No. 01	♂	081114-No. 06	♀	081219-No. 12	♀
070130-No. 09	♂	070202-No. 02	♀	081114-No. 07	♂	081219-No. 13	♀
070130-No. 10	♀	070202-No. 03	♂	081114-No. 08	♀	081219-No. 14	♀
070130-No. 11	♀	070202-No. 04	♀	081114-No. 09	♀	081219-No. 15	♂
070206-No. 02	♂	070202-No. 05	♂	081114-No. 10	♂	081219-No. 16	♀
070206-No. 03	♂	070202-No. 06	♀	081222-No. 01	♂	081219-No. 17	♀
070206-No. 04	♂	070202-No. 07	♂	081222-No. 02	♀	081218-No. 01	♀
JW (70.3%)	070202-No. 08	♀	081222-No. 03	♀	081218-No. 02	♂	
071226-No. 01	♀	070202-No. 09	♂	081222-No. 04	♀	081218-No. 03	♀
071226-No. 02	♂	070202-No. 10	♂	AJ (67.1%)		081218-No. 04	♀
071226-No. 03	♂	070202-No. 11	♂	080221-No. 01	♂	081218-No. 05	♂
071226-No. 04	♂	R (75.0%)		080221-No. 02	♂	081218-No. 07	♂
071226-No. 06	♀	070131-No. 01	♂	080221-No. 03	♀	081218-No. 08	♂
071226-No. 09	♂	070131-No. 03	♀	080221-No. 04	♀	081218-No. 11	♂
071226-No. 10	♂	070131-No. 04	♀	080221-No. 05	♂	081218-No. 12	♂
071226-No. 11	♀	070131-No. 05	♀	080221-No. 06	♂	081218-No. 13	♂
071226-No. 12	♂	070131-No. 06	♀	080221-No. 07	♂	081218-No. 14	♀
080722-No. 01	♀	081112-No. 01	♂	080221-No. 08	♀	081218-No. 15	♂
080722-No. 02	♂	081112-No. 02	♂	080221-No. 09	♂	081218-No. 16	♂
080722-No. 03	♀	081112-No. 03	♂	080221-No. 10	♀	081218-No. 17	♂
080722-No. 04	♀	081112-No. 04	♂	080221-No. 11	♂	081218-No. 18	♂
080722-No. 05	♀	081112-No. 05	♂	080221-No. 12	♀	081218-No. 19	♀
080722-No. 06	♂	081112-No. 06	♀	080221-No. 13	♂	RJ (75.2%)	
080722-No. 07	♂	081112-No. 07	♀	080221-No. 14	♂	6-18-RJ	♂
080722-No. 08	♂	081112-No. 08	♂	080221-No. 15	♂	6-19-RJ	♀
080723-No. 02	♀	021113-No. 01	♂	080221-No. 16	♀	6-20-RJa	♂
080723-No. 03	♀	021113-No. 02	♂	080221-No. 17	♂	6-20-RJb	♀
080723-No. 04	♂	021113-No. 03	♂	080221-No. 18	♀	6-21-RJ	♂
080723-No. 05	♂	021113-No. 04	♂	080221-No. 19	♀	GP (65.6%)	
080723-No. 06	♂	021113-No. 05	♂	080228-No. 01	♂	6-20-GP	♂
080723-No. 07	♀	021113-No. 06	♀	H (70.1%)		6-22-GP	♂
080723-No. 08	♂	081114-No. 01	♂	081219-No. 01	♀	LAP (80.9%)	
CJ (70.3%)	081114-No. 02	♀	081219-No. 02	♂	6-18-LAPa	♀	
070130-No. 01	♀	081114-No. 03	♂	081219-No. 03	♂	6-18-LAPb	♂
070130-No. 02	♂	081114-No. 04	♀	081219-No. 04	♀	6-23-LAP	♀

JR：岩手地鶏赤笹，JW：岩手地鶏白笹，CJ：南部かしわ基礎鶏，R：岩手大型ロード

AJ：純系会津地鶏，H：比内鶏，RJ：赤色野鶏，GP：金鶏，LAP：銀鶏

各鶏種の略号の横の（ ）内は細胞生存率を示す

9日目のいずれの胚においても PKH-26 標識細胞が観察された。しかし、本研究で凍結した gPGCs が WL の生殖巣内において機能的な配偶子へ分化することができるか否かは、今後検討する必要がある。本研究で観察された PKH-26 のシグナルはやや微弱であったが、これはドナーとレシピエントの種の違いによる拒絶があったためか、あるいは PGCs の分裂とともに PKH-26 のシグナル強度が減退したためかは定かではない。今後、レシピエントの生殖巣における異種由来の PGCs の発生分化を明らかにするため、持続性の高い蛍光標識を用いた異種由来 PGCs の追跡試験を行う必要がある。

今後さらにキメラ作製技術が向上して、科や目の異なる鳥類間

の生殖系キメラの作出が可能になれば、将来的にあらゆる鳥類を産卵能力が高い家禽から再生することが期待できる。Nakamura *et al.* (2010) はブスルファンを用いてレシピエント胚の内在性 PGCs を除去することにより、ドナー由来の配偶子を高確率で生産するキメラニワトリの作出に成功しており、希少種のより効率的な再生法が着実に発達している。しかし、このような技術の確立を待つことなく絶滅の危機に脅かされる鳥類にとって、遺伝資源を半永久的に保存することが可能な PGCs バンクの設定 (図4) は技術確立までの一時的な保存という面からも有効と考えられる。さらに、絶滅危惧種であるアホウドリやイヌワシなどの PGCs が保存できれば、PGCs バンクは野生動物保護の観点からも重要となる。本研究で試みた PGCs バンクは家禽産業のみならず、野生動物保護の観点からも重要性が増すものと思われる。

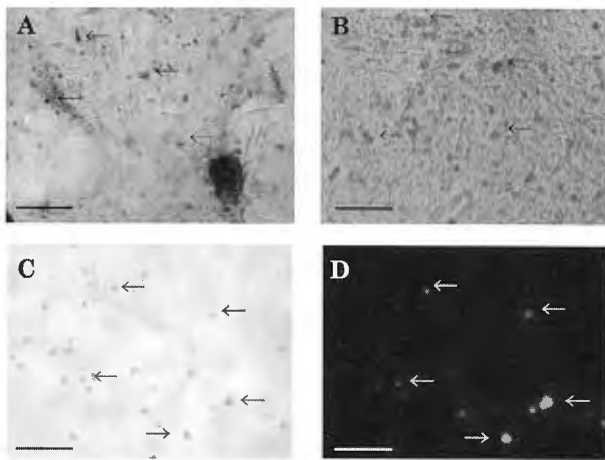


図 1. 試験管内で7日間培養したGR細胞中におけるPGCsの同定

A: PAS および SSEA-1 による二重染色で確認された PGCs, B: PAS 染色陽性の PGCs, C, D: FITC-PGC IgG による反応 (C: 光学顕微鏡, D: 蛍光像), スケールバーは 100 μ m である。

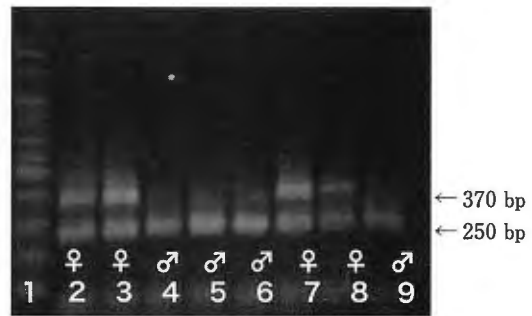


図 2. DNA による凍結個体の性判別

1: マーカー, 2-9: 個体 No. R081112-1~8 の DNA バンドパターン, 250 bp: Z 染色体特異的バンド (雌雄共通), 370 bp: W 染色体特異的バンド (雌のみ)

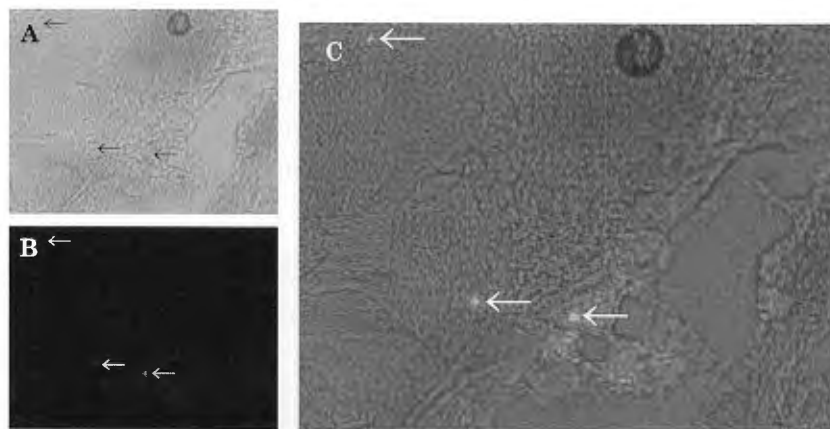


図 3. レシピエント胚の生殖腺へ移住した異種由来 gPGCs

A: 光学顕微鏡, B: 蛍光顕微鏡 (A と同視野), C: A と B を合成した写真, 矢印は PKH-26 標識陽性細胞

表 3. キメラ発生成績

ドナー種名	レシピエント 品種名	操作胚数	発生胚数 ¹⁾	発生率 (%)	PKH-26 陽性胚数	陽性胚割合 ²⁾ (%)
RJ	WL	20	7	35	6	85.7
GP	WL	10	5	50	2	40
LAP	WL	10	2	20	2	100
Total		40	14	—	10	—
Average		—	—	33.3	—	75.2

¹⁾発生胚数は剖検（孵卵 6～9 日）時点で発生していた胚数、²⁾発生胚数に対して陽性細胞を持っていた胚の割合

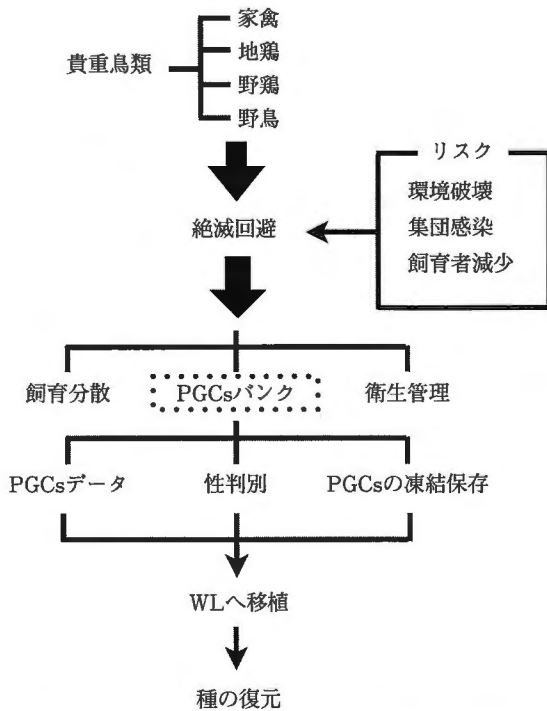


図 4. 鳥類 PGCs バンク利用による種の復元概念図

引用文献

Aige-gil V and Simkiss K. Sterilising embryos for transgenic chimeras. *British Poultry Science*, 32 : 427-438. 1991.
 Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 8 : 49-92. 1957.
 Hammerstedt RH. Cryopreservation of Poultry semen-current status and economics. In : *Proceedings of the First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry* (Bakst MR and Wishart GJ eds.) Poultry Science Association, Savoy. : 229-250. 2009.
 Itoh Y, Suzuki M, Ogawa A, Munechika I, Murata K and Mizuno S. Identification of the sex of a wide range of carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. *Journal of heredi-*

ty, 92 : 315-321. 2001.
 Karagenc L, Cinnamon Y, Ginsburg M and Petite JN. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Developmental Genetics*, 19 : 290-301. 1996.
 菊地あや子, 松原和衛, 高橋壽太郎, 川畑亨子, 後藤太一. ニワトリ始原生殖細胞の同定と観察. *東北畜産学会報*, 50 : 24-30. 2000.
 Kuwana T. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal angle. *Development, growth & differentiation*, 35 : 237-243. 1993.
 Kuwana T, Kawashima T, Naito M, Yamashita H, Matsuzaki M and Takano T. Conservation of a threatened indigenous fowl (Kureko Dori) using the germline chimeras transplanted from primordial germ cells. *Journal of Poultry Science*, 43 : 60-66. 2006.
 Lake PE and Stewart JM. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen—an improved method. *British Poultry Science*, 19 : 187-194. 1978.
 Mayanagi T, Kurosawa R, Ohnuma K, Ueyama A, Ito K and Takahashi J. Purification of mouse primordial germ cells by Nycodenz. *Reproduction*, 125 : 667-675. 2003.
 Naito M and Perry MM. Development in culture of chick embryo from cleavage hatch. *British Poultry Science*, 36 : 161-164. 1978.
 Naito M, Nirasawa K and Oishi T. Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *Journal of Experimental Zoology*, 254 : 322-326. 1990.
 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. 1994.
 Naito M, Matsubara Y, 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 & Fertility*, 117 : 291-298. 1999.
 Naito M. Cryopreservation of avian germline cells and subsequent production of viable offspring. *Journal of Poultry Science*, 40 : 1-12. 2003.
 Naito M, Sano A, Harumi T, Matsubara Y and Kuwana T. Migration of primordial germ cell isolated from embryonic blood into the gonads after transfer to stage X blastoderms

- and detection of chimaerism by PCR. *British Poultry Science*, 45 : 762-768. 2004.
- 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. *Journal of Poultry Science*, 86 : 2182-2193. 2007.
- 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. 2010.
- 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. 2010.
- Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T and Noce T. Isolation of chickens vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 127 : 2741-2750. 2000.
- Perry MM. A Complete culture system for the chick embryo. *Nature*, 331 : 70-72. 1988.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y and Kuwana T. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *Journal of experimental zoology*, 280 : 265-267. 1998.
- Walsh PS, Metzger DA and Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10 : 506-513. 1991.
- 吉田 登, 岩本 渉, 吉田啓記, 松原和衛, 斎藤靖史, 御領政信, 小松繁樹, 高橋壽太郎, 萱野裕是. 岩手地鶏の始原生殖細胞移植による生殖系キメラ個体作出の可能性. *東北畜産学会報*, 56 : 21-26. 2006.

Attempt of Cryopreservation of Primordial Germ Cells (PGCs) Isolated from Valuable Chickens; Native Chicken and Jungle Fowl *etc.*

Natsuki Ito¹, Yuta Kawagoe¹, Yasushi Saitoh¹, Naoto Sato², Mio Saito³, Kazuhiro Rikimaru⁴, Tsunenori Tsujimoto⁵, Fumiya Saito⁶ and Kazuei Matsubara¹

¹ Graduate school of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550

² Iwate Animal Research Institute, Takizawa, Iwate 029-0173

³ Fukushima Agricultural Technology Centre Livestock Industry Research Centre, Fukushima, Fukushima 960-2156

⁴ Livestock Experimental Station Akita Prefectural Agriculture Forestry and Fisheries Research Center, Daisen, Akita 019-1701

⁵ Morioka Zoological Park, Morioka, Iwate 020-0803

⁶ Technical Research Center, Koiwai farm Co. Ltd., Shizukuishi, Iwate 020-0507

Technique for freezing ova is not enable in birds ; however, cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) may offer an effective alternative. The present study was initiated to determine whether the cryopreservation is applicable to domesticated chicken strains and to wild chicken species. PGCs collected from Domestic fowl, Jungle fowl, Golden Pheasant and Lady Amherst's Pheasant were cryopreserved in liquid nitrogen. After a few days, the cells were thawed and stained with trypan blue to analyze their viability. The PGCs were cultured in DMEM supplemented with chick serum to check their retention of growth ability, and their sex was determined by a DNA analysis. Then, the cells were stained with PKH-26 and transferred into the embryonic disk of fertilized eggs (White Leghorn strain) in order to investigate whether the cells had the ability to migrate to the host gonads.

Sex determination was done completely in all samples. These PGCs were preserved in our laboratory's liquid nitrogen and sex informations kept records as the data of PGCs Bank. We found that 65.6-80.9% of the cells recovered after cryopreservation were viable, and could proliferate *in vivo*. The cultured cells showed positive staining with PAS, anti-SSEA-1 and anti-PGC IgG.

Furthermore, the cells that were marked with PKH-26 and transferred into recipient embryos were able to migrate to the host's gonads. Thus, the present study has confirmed that it is feasible to cryopreserve PGCs and that these cell retain the ability to migrate into recipient gonads. These cryopreserved cells therefore have the potential to be used in generating germ line chimeras. Our results suggest that PGCs could be used to restore valuable avian populations and species following their loss in a pandemic. The information on the sex of the PGCs will make it simpler to produce same-sex chimeras, which should expect to improve germline transmission rate. In conclusion, the preservation of PGCs in a properly constructed PGCs Bank will be an effective means of conserving genetic resources in the chicken.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 48 : J6-J13, 2011)

Key words : gametic resources, PGCs, PGCs Bank, precious chicken