

鳥類胚卵殻外培養とその応用

田原 豊^{1,*}・小原勝也^{2,*}

¹千葉県立生浜高等学校, 千葉県千葉市中央区塩田町 260-0823

²たかね動物病院, 千葉県船橋市習志野台 274-0063

鳥類胚の卵殻外培養は、発生学のみならず、胚操作や毒性学、再生医療の基礎研究など様々な分野に応用可能である。従来から、卵殻の一部に穴を開けて、様々な操作や観察を可能とする窓開け法や、代替卵殻を用いた培養が一般に広く用いられてきた。一方で、高等学校などの生物の授業では、発生を学ぶ授業として、代替卵殻を用いない茶碗などの人工容器でニワトリ胚を発生させる無卵殻培養が取り上げられてきた。しかし、この方法では、胚発生の初期に胚の発育が停止するため、継続して胚の発生を観察することは不可能であった。そこで代替卵殻を用いない完全な人工培養容器を用いた胚培養方法の開発が試みられ、Kamihira *et al.* (1998) はポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 膜を用いた人工培養容器によるウズラ胚の孵化に成功した。さらに、田原は、ポリメチルペンテン製の食品用ラップを用いた人工培養容器によりニワトリ胚を孵化させることに成功し、その詳細な方法について報告した (Tahara and Obara, 2014)。これらの技術は、学校教育の現場のみならず、様々な分野への応用が進みつつある。

キーワード: 鳥類胚, ニワトリ, 孵化, ポリメチルペンテン, 無卵殻培養, 卵殻外培養

※この記事は The Journal of Poultry Science 58 巻 1 号に掲載された総説「*Ex Ovo Culture System for Avian Embryos and its Application*」(Tahara and Obara, J. Poult. Sci., 58: 1-4, 2021) を翻訳したものです。doi:10.2141/jpsa.0200016

緒 言

鳥類胚の卵殻外培養^{*1}は、発生学分野における基礎研究に広く貢献してきた。近年、これらの技術は、胚操作実験や、毒性試験、再生医療への応用を目指した基礎研究など、様々な分野への応用が期待されるようになってきている。一方で、高等学校における生物の授業でも、発生の過程をより理解するために、卵殻外培養が実践されている。

鳥類胚の卵殻外培養は以前より様々な研究が行われてきたが、ニワトリ胚を孵化させる事が可能な卵殻外培養技術の確立は非常に困難とされ、長い間試行錯誤が続けられてきた。Rowlett and Simkiss (1987) が初めて代替卵殻を用いた培養容器での孵化を報告して以降、様々な改良が重ねられている。一方で、代替卵殻を用いた方法では、培養するニワトリ胚に適した代替卵殻を用意しなければならず、ニワトリ胚の観察や胚操作をする際には、卵殻により可視化領域が制限される事が課題の1つであった。そこで、代替卵殻を用いず、完全な人工容器で孵化させる無卵殻培養^{*2}の研究が平行して行われ、Kamihira *et al.* (1998) が、ウズラ

胚をポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 膜を用いた培養容器で孵化させることに成功した。その後、田原がニワトリ胚をポリメチルペンテン製食品用ラップを用いた完全な人工培養容器にて孵化させることに成功し、最適な条件などの検討を加え、詳細な方法について報告した (Tahara and Obara, 2014)。

このレビューでは、これまでの卵殻外培養および無卵殻培養の技術の変遷、それぞれの利点や欠点、および技術の応用について紹介する。

卵 殻 外 培 養

鳥類胚は、ほ乳類と異なり、放卵後の胚発生が体外で進むため、発生学の研究や毒性試験、胚操作など、様々な分野で用いられてきた。特に、殻の一部に穴を開けて様々な操作ができる窓開け法は、多くの分野で広く普及している (Fisher and Schoenwolf, 1983; Andacht *et al.*, 2004)。

ニワトリ胚の卵殻外培養では、Rowlett and Simkiss (1987) が、孵卵3日目の受精卵の卵殻を除去した後、卵内容物を、七面鳥やニワトリの卵殻を代替卵殻として用いた培養容器に移し替えて孵化させることに成功した。一方で、食品用ラップ (Cling-film) を用いた無卵殻培養も試みられていたが、孵化させることはできなかった。

Perry (1988) は、1細胞期の受精卵から、卵殻外培養によるニワトリ胚の孵化に初めて成功した。この方法は、母体内から取り出した前核期の受精卵を、3つのシステムを経ることで孵化させるものであった。まず、母体内から取り出された受精卵は、ガラ

2019年11月14日受付, 2019年12月23日受理

連絡者: 田原 豊

〒260-0823 千葉県千葉市中央区塩田町 372

Tel: 043-266-4591

Fax: 043-264-8636

E-mail: tahara@umihotarujp

*両著者はこの論文において同程度の貢献をした。

ス容器に、培養液とともに移されて 24 時間、胚盤葉期まで培養され (System1)、代替卵殻を用いた容器に水溶性卵白と共に移し替え、容器を横に固定して、胚が空気に触れないように培養された (System2)。次いで、3 日目胚を二黄卵のような大型の代替卵殻に移し替え、空気層を取って孵化まで培養を行った (System3)。この方法を用いた際の孵化率は、System1 から System3 まで通じた場合、およそ 7% ほどであった。

その後、System1 から System2 へ胚を移し替える際、濃厚卵白を除去し水溶性卵白で満たすなどの改良が加えられ、孵化率は 30-50% にまで上昇した (Naito and Perry, 1989 ; Naito *et al.*, 1990)。

しかし、これらの代替卵殻を用いた培養では、容器となる卵殻が必須となる。代替卵殻として、二黄卵のような大型の卵殻や、例えば、アイガモやアヒル、七面鳥など、ニワトリよりもやや大型の卵を産む鳥類の卵殻などが用いられてきた (Rowlett and Simkiss, 1987 ; Borwornpinyo *et al.*, 2005)。

窓開け法や卵殻外培養法が確立されたことで、発生学や奇形の発生機序に関する研究 (Matheus *et al.*, 2019)、イメージング (Kulesa *et al.*, 2010 ; Funahashi *et al.*, 2014)、異種移植などの胚操作 (Boulland *et al.*, 2010)、漿尿膜アッセイ (Ribatti, 2016 ; Vu *et al.*, 2018)、幹細胞の多能性評価 (Haraguchi *et al.*, 2016)、再生医療の基礎研究 (Chiba *et al.*, 2010) など、様々な分野への応用が進んだ。しかし、窓開け法や代替卵殻を使う方法は、様々な処理後に、発生を継続させることはできたが、その過程を常時観察することは極めて困難であった。さらに、代替卵殻を使う方法では、一度にたくさんの代替卵殻の確保が難しい事もあり、卵殻を用いない完全な人工培養容器の開発が必要と考えられた。また、代替卵殻を用いない人工培養容器の開発は、卵殻が胚に与える影響を解析するためにも必要な技術と考えられた。

PTFE 膜を用いた人工培養容器の開発

代替卵殻を用いない人工培養法の開発は、古くから行われており、ポリエチレン製の袋や食品用ラップを用いた培養法では、初期胚における発生継続が可能であった。しかし、これらでは、孵化させることはできず、通気性や胚へのカルシウム供給など、様々な問題点が指摘されてきた (Elliott and Bennett, 1971 ; Rowlett and Simkiss, 1987)。

Kamihira *et al.* (1998) は、代替卵殻を用いず、PTFE 膜を用いた人工培養容器にてウズラ胚を孵化させることに成功した。この方法では、培養 2 日目の卵の卵殻を除去し、胚へのカルシウム源として、人工培養容器に卵殻粉および乳酸カルシウムを加え、インキュベーター内に純酸素を供給しながら培養することで、42.8% の胚が孵化したと報告した。また、代替卵殻を用いた人工培養においても、乳酸カルシウムを添加することで、孵化率が向上すると報告した。これらのことから、卵殻外培養において、乳酸カルシウムの添加が重要であると指摘された。

田原による簡便な培養容器の開発

PTFE 膜を用いた人工培養容器は、代替卵殻を必要としないという大きな利点がある一方、PTFE 膜は、不透明で、上部以外か

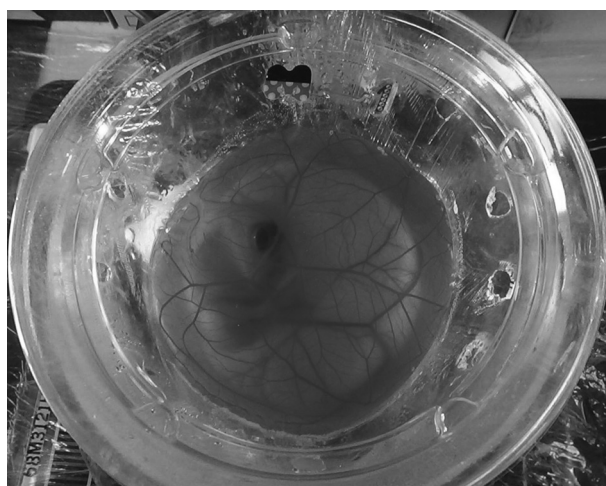


図 1. Tahara and Obara (2014) の方法で培養した 11 日目のニワトリ胚の様子

らの観察が難しく、また、入手が困難であった。田原は、主に、高等学校での生物の授業への応用を目的とした、より簡便な人工培養容器の開発を行った。その結果、培養容器としてポリメチルペンテン製食品用ラップを用い、胚へのカルシウム源として乳酸カルシウムを加えた後、前培養 55 時間前後 (Stage 16 ; Hamburger and Hamilton, 1951) の胚を培養容器に移して培養を続け、培養 17 日目以降は、純酸素を培養容器内に直接供給することで孵化させることが可能となった (Tahara and Obara, 2014)。この方法は、透明なフィルムを培養容器として用いることで、従来の方法に比べ、発生の観察が容易になるだけでなく、胚へのアクセスも容易となるため、バイオイメージング、胚操作や漿尿膜アッセイなど、様々な分野への応用が容易になると考えられた。

高等学校等における無卵殻培養の実践

日本の公立高等学校に一般的にある設備では、鳥類胚の発生過程を連続観察し、最終的にヒナを孵化させる実験は不可能とされてきた。一方で、日本の高等学校の生物の教科書では、ニワトリ胚の初期発生を観察する方法として、胚を卵黄膜ごと切り取って観察する方法 (New, 1955) や、茶碗を培養容器として用いた無卵殻培養が紹介され、授業でも用いられてきた (本川ら, 2008) が、この方法では胚を孵化させることはできなかった。

田原は、同僚らとともに 40 年以上前から、高等学校の生物の授業での胚の発生観察や、生物部の研究活動を通して、鳥類の無卵殻培養による胚の連続観察と孵化を可能にする新しい方法の開発をめざし、高校生と共に試行錯誤を繰り返し、日本国内の生物の教員が集まる場で報告を重ねた。この時の研究は、日本の高等学校の生物の教科書にも紹介された (堀田ら, 2010)。その後、田原は 2012 年に千葉県立生浜高等学校で、食品用ラップを用いた無卵殻培養により初めてニワトリのヒナを孵化させることに成功し、さらに条件検討を繰り返した上で詳細な培養方法について報告した。 (Tahara and Obara, 2014 ; 田原, 2016)

この報告以後、田原と同僚らは開発された技術を使い、ヒナを



図 2. ウズラ卵を用いた授業の様子

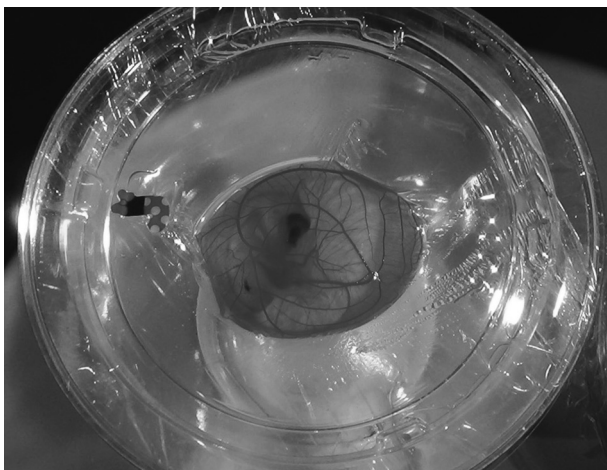


図 3. Tahara and Obara (2014) の方法を応用して培養した 10 日目のウズラ胚の様子

孵化させることができる授業の実践や部活動での更なる研究活動を継続してきた。本法で使用する培養容器は、容器が透明なため様々な角度からの観察が可能だけでなく、高校生が自作可能であり、無菌状態ではない環境で孵化するまでの培養が可能である。本法は、高等学校の授業での実験の実践を十分可能にしている (図 1)。

無卵殻培養実験後、孵化したヒナは希望する高校生が里親として自宅で飼育するようにしている。しかし、都市部では、周辺環境など様々な要因により、ニワトリを飼育できる家庭は限られる。そこで田原は、ニワトリ無卵殻培養法をニワトリに比べ飼育しやすいウズラへ応用できないか、各条件を検討し、孵化させることに成功した。近年、千葉県立生浜高等学校では、ウズラの無卵殻培養を授業での実験観察に用いている (図 2, 3)。

【用語解説】

※ 1 卵殻外培養：本来の卵殻を除去または卵殻形成前の胚を、培養容器に移し替えて培養すること。培養容器に代替卵殻を用いる場合も含む。

※ 2 無卵殻培養 (SLC)：卵殻外培養のうち、代替卵殻を用いな

い方法。

謝 辞

このミニレビューは、平成 30 年度日本家禽学会技術賞の受賞内容である。

このミニレビューを作成するにあたり、筑波大学教授の田島淳史先生に助言を頂き、ここに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Andacht T, Hu W and Ivarie R. Rapid and improved method for windowing eggs accessing the stage X chicken embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 69 : 31-34. 2004.
- Borwornpinyo S, Brake J, Mozdziak PE and Petitte JN. Culture of chicken embryos in surrogate eggshells. *Poultry Science*, 84 : 1477-1482. 2005.
- Boulland J, Halasi G, Kasumacic N and Glover J. Xenotransplantation of human stem cells into the chicken embryo. *Journal of Visualized Experiments*, 41 : e2071. 1-16. 2010.
- Chiba A, Yui C and Hirano S. Liver reconstruction on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Archives of Histology and Cytology*, 71 : 45-53. 2010.
- Elliott J and Bennett J. Growth of chick embryos in polyethylene bags. *Poultry Science*, 50 : 974-975. 1971.
- Fisher M. and Schoenwolf GC. The use of chick embryos in experimental embryology and teratology : Improvements in standard procedures. *Teratology*, 27 : 65-72. 1983.
- Funahashi J. and Nakamura H. Time-lapse imaging system with shell-less culture chamber. *Development, Growth & Differentiation*, 56 : 305-309. 2014.
- Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88 : 49-92. 1951.
- Haraguchi S, Matsubara Y and Hosoe M. Chick embryos can form teratomas from microinjected mouse embryonic stem cells. *Development, Growth & Differentiation*, 58 : 194-204. 2016.
- 堀田凱樹, 井口泰泉, 井尻憲一, 田中一朗, 都筑幹夫, 藤原一繪, 廣岡芳年, 白田浩一, 本橋 晃. 生命の探求 生物Ⅱ. 314-317 頁. 教育出版株式会社. 東京. 2010.
- Kamihira M, Oguchi S, Tachibana A, Kitagawa Y and Iijima S. Improved hatching for *in vitro* quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Development, Growth & Differentiation*, 40 : 449-455. 1998.
- Kulesa PM, Bailey CM, Coopere C and Fraser SE. *In ovo* live imaging of avian embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010 (6) : pdb.prot5446. 2010.
- Matheus F, Rusha E, Rehim R, Molitor L, Pertek A, Modic M, Feederle R, Flatley A, Kremmer E, Geerlof A, Rishko V, Rad-Iglesias A and Drukker M. Pathological ASXL1 mutations and protein variants impair neural crest development. *Stem Cell Reports*, 12 : 1-8. 2019.
- 本川達雄, 谷本英一, 赤坂甲治, 太田次郎, 館野正樹, 西田治文, 服田昌之, 渡辺政隆, 渡辺 守, 飯島和重. 生物Ⅱ. 163, 322-323 頁. 新興出版社啓林館. 大阪. 2008.
- 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 and Perry MM. Development in culture of the chick

- embryo from cleavage to hatch. *British Poultry Science*, 30 : 251-256. 1989.
- New DAT. A new technique for the cultivation of the chick embryo *in vitro*. *Development*, 3 : 326-331. 1955.
- Perry MM. A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, 331 : 70-72. 1988.
- Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of Development*, 141 : 70-77. 2016.
- Rowlett K and Simkiss K. Explanted embryo culture: In vitro and in ovo techniques for domestic fowl. *British Poultry Science*, 28 : 91-101. 1987.
- 田原 豊. 殻なし有精卵の人工孵化方法. 特許第 5978523 号. 2016.
- Tahara Y and Obara K. A novel shell-less culture system for chick embryos using a plastic film as culture vessels. *Journal of Poultry Science*, 51 : 307-312. 2014.
- Vu BT, Shahin SA, Croissant J, Fatieiev Y, Matsumoto K, Doan TL, Yik T, Simargi S, Conteras A, Ratliff L, Jimenez CM, Raehm L, Khashab N, Durand J, Glackin C and Tamanoi F. Chick chorioallantoic membrane assay as an *in vivo* model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. *Scientific Reports*, 8 : 5254. 2018.