

平成16年度共同研究実施報告書

研究 題 目	始原生殖細胞を利用した岩手地鶏の保存方法に関する研究
共 同 研 究 者 (所 属 ・ 職)	研究代表者 松原 和衛 (岩手大学農学部・助教授) 小松 繁樹 (岩手県農業研究センター畜産研究所・家畜育種研究室室長) 吉田 登 (岩手県農業研究センター畜産研究所・専門研究員) 赤平 英之 (財団法人きんりく基金・主任研究員)
研 究 代 表 者 連 絡 先	電 話：019-621-6160 F A X：019-621-6162 Eメール：kazuei@iwate-u.ac.jp U R L：
研 究 目 的	始原生殖細胞を用いて発生工学的手法によって、絶滅が危惧されている山形村原産の天然記念物「岩手地鶏」の新しい保存方法と増殖方法を開発する。
研 究 結 果 の 概 要	<p>1 はじめに (研究の背景等)</p> <p>岩手地鶏は国および県の天然記念物に指定されており、本県の重要な遺伝資源である。その飼養羽数は年々減少し、現在では岩手県農業研究センター畜産研究所で特産鶏開発のための基礎鶏として約400羽ほどが飼養されている。しかし、近交度の高まりとともに、1羽当たりの産卵数は年々少なくなっており、絶滅の一途をたどっている。畜産研究所では近交度が高まらないように計画交配を行ってはいるが、新たな増殖方法を考える必要が出てきた。始原生殖細胞 (PGC) は、孵卵約60時間後の胚体外卵黄静脈中を血液細胞とともに浮遊し、孵卵約3.5日目以降から将来の生殖腺 (卵巣あるいは精巣) になる生殖隆起に到達し定着する。したがって、この時期のPGCを取り出して他の種類の鶏の血管に注入することによって生殖系キメラ (精巣や卵巣に他の品種の精子や卵子を持つ鶏) を作出することが可能である。そこで、岩手地鶏から得られたPGCを白色レグホーンに移植することにより、岩手地鶏の雛数を増加させることが可能となる。また、PGCを凍結保存することによっていつでも岩手地鶏を復元できることになる。平成13～14年度に、岩手地鶏PGCの移植とそれによって孵化した操作鶏同士を交配する一連の実験を初めて行ったが、岩手地鶏を生産することはできなかった。操作した胚の孵化率を上昇させるには、孵卵諸条件の検討を行うこと、移植用の岩手地鶏PGCをいかに大量に得ることができかが重要なカギを握っている。引き続き、一連の操作を改良しながら実験を進めることで、生殖系キメラから岩手地鶏を生産することは可能と考えられる。一方、ニワトリPGCの培養は一般に成功しておらず、申請者の基礎研究ではそれに成功しており、本研究では簡単に培養と採取ができるように検討を進め、培養と採取方法の確立を待つて、岩手地鶏PGCの凍結方法の確立および融解したPGCの移植を試みることを目的とした。</p> <p>2 調査方法</p> <p>3日間孵卵した岩手地鶏 (JR) の種卵からPGCを採取し、同時に孵卵した白色レグホン (WL)</p>

の胚へ岩手地鶏PGCを移植し、生殖系キメラの雛を作出する。一方、岩手地鶏から採取した生殖隆起を培養し、培養によって増殖する生殖隆起由来PGC (gPGC) を分離するとともに、各種凍結保護剤を使用し-198℃で凍結を行う。凍結後には解凍を行い、培養による増殖能およびトリパンブルーによる色素排除試験で細胞活性を調べる。岩手大学で作出した雄および雌の生殖系キメラ雛を性成熟に達する180日齢まで畜産研究所で飼育し、それらの生殖系キメラ同士を交配し、産卵される雛について、岩手地鶏：白色レグホン：雑種F₁の出現比率について調査する。また、出現した岩手地鶏の後代検定についても実施する。

3 結果

1. 生殖隆起の培養、gPGCの採取、凍結保存

孵卵6日目(ステージ28~29)の生殖隆起を、ニワトリヒナ血清または仔ウシ血清を添加した2種類の培地で培養した結果、生殖隆起から出た繊維芽細胞が培養プレート底面にシートして広がっていた。ニワトリヒナ血清添加区では、シートして広がった繊維芽細胞上に、形態からgPGCと思われる球形の細胞が観察されたが、仔ウシ血清添加区では観察することはできなかった(図1)。gPGCの採取方法は3通りの方法を試みた。方法1では、生殖隆起を解離して実体顕微鏡下で組織細胞よりやや大きいgPGCを、マイクロピペットで選択的に採取することが可能であった。方法2では、孵卵6日目の生殖隆起を48時間培養し、シートした繊維芽細胞とゆるく結合していたgPGCを、実体顕微鏡下でピペッティングすることでgPGCのみをシート細胞から分離することは可能であり、gPGCの回収は容易であった。方法3では、セルパンカーを用いて、組織細胞とともにgPGCを凍結し、融解後トリパンブルーで生細胞率を調べた結果、90%であり凍結保存は可能であった。

2. 走査型電子顕微鏡(SEM)によるgPGCの観察

生殖隆起中に存在するgPGCを観察した結果、gPGCは生殖隆起中の他の組織細胞より大きく12~13μmの大きさであり、周りの細胞とは繊維状の構造物で結合していた(図2)。また、生殖隆起を48時間培養したgPGCは、図3に示すようにA、Bは生殖隆起上に存在したgPGCであり、C、Dは培養によって繊維芽細胞上に存在したgPGCであった。生殖隆起上に存在したA、Bより、周辺のC、DのgPGCの方が微絨毛突起は大きかった。

3. 移植と操作ニワトリの作出(表1)

移植は血管にマイクロピペットを刺す必要がある。したがって、マイクロピペットを抜いた後、血液があふれ出し移植したgPGCも流れ出る可能性があった。そこで、マイクロピペットの径をgPGC 1個が通る程度までできるだけ細くし、移植後マイクロピペットを抜く際、針先を血管上壁に浮かせて、血流が正常であることを確認してからマイクロピペットを抜くことで、血液が血管からあふれ出す現象を解決することに成功した(図4)。ドナー細胞となるJRのgPGCは上述した3種類のを準備した。方法1では、3度の移植実験で、計20個の胚に移植し、9羽が孵化した(孵化率45%)。このうち8羽(♂3:♀5)が性成熟に達したが、No.14は斃死した。方法2では、4度の移植実験で、計25個の胚に移植し、8羽が孵化した(孵化率32%)。このうち5羽(♂3:♀2)が性成熟に達したが、No.22、23、25は斃死した。方法3では、gPGCを凍結・

表1 マニピュレーションによって作出されたキメラニワトリの移植状態

方法	操作したニワトリNo.	孵卵方法	除去した水溶性卵白 (mℓ)	レシピエントから除去した血液 (μl)	レシピエント胚の移植ステージ	PGCの移植状態	性
1	11	system III	0	bloodletting	13	8embryos	♀
	12	system III	0	blood2 μl	12	18embryos	♂
	13	system III	1.5	blood1 μl	14	♀※	♀
	14	system III	1.5	blood1 μl	14	♀※	dead
	15	system III	1.5	blood1 μl	14	♀※	♀
	16	system III	1.5	blood1 μl	14	♀※	♂
	17	system III	1.5	bloodletting	14	♀※	♀
	18	system III	1.5	bloodletting	14	♀※	♂
	19	system III	1.5	blood1.5 μl	14	♀※	♀
2	21	system II and III	0	bloodletting	14	3embryos	♀
	22	system III	0	bloodletting	14	3embryos	dead
	23	system III	0	bloodletting	14	3embryos	dead
	24	system III	0	bloodletting	14	3embryos	♂
	25	system III	0	bloodletting	13	3embryos	dead
	26	system III	0	blood2.5 μl	12	2embryos	♂
	27	system III	0	blood0.5 μl	12	2embryos	♀
	28	system III	0	bloodletting	13	2embryos	♂
3	31	system III	2	—	14	12embryos and Ficoll	dead
	32	system III	2	—	14	12embryos and Ficoll	♀
	33	system III	2	—	14	12embryos and Ficoll	♀
	34	system III	2	blood1 μl	14	15embryos	♂
	35	system III	2	blood0.5 μl	14	15embryos	dead
	36	system III	2	blood2 μl	14	15embryos	dead
	37	system III	2	—	14	14embryos	♀

※性はPCRで決定した

融解してから採取、移植した。3度の移植実験で、計39個の胚に移植し、7羽が孵化した（孵化率17.9%）。このうち3羽が性成熟に達したが、No.31、35、36は斃死した。なお、No.37は成長不良で性成熟に達しなかった。

4. 後代検定

性成熟に達した操作ニワトリから順に後代検定を実施した。雄操作ニワトリは、雌WL3～4羽と人工授精した結果、No.12は7週間で138個の卵を得て、うち103個が有精卵であり、66羽が孵化し（孵化率64.1%）、うち4羽に黒い刺毛をもつF₁が確認された（キメラ率6.1%）。No.34は3週間で50個の卵を得て、うち30個が有精卵であり、25羽が孵化し（孵化率83.3%）、うち1

表2 移植によって作出された雄操作ニワトリの後代検定

方法	操作鶏 No.	試験期間(週)	生産された卵の数	受精率(%)※	孵化率(%)***	F ₁ (%)
1	12	7	138	103 (74.6)	66 (64.1)	4 (6.1)
	16	3	45	30 (66.7)	23 (76.7)	0
	18	3	39	20 (51.3)	10 (50.0)	0
2	24	4	104	92 (88.5)	69 (75.0)	0
	26	4	72	69 (95.8)	58 (84.0)	0
	28	4	76	75 (98.7)	64 (85.0)	0
3	34	3	50	30 (60.0)	25 (83.3)	1 (4.0)

※ 受精卵/生産された卵の数

*** 孵化したヒナの数/受精卵数

羽に黒い刺毛をもつF1が確認された(キメラ率4.0%)。その他の5羽の雄操作ニワトリからは、試験期間中に黒い刺毛をもつF1を確認することができなかった(表2)。雌操作ニワトリは、雄WLと人工授精した。試験期間3~11週間で、いずれの個体からも黒い刺毛をもつ後代を確認することはできなかった。後代検定の結果生まれたF1が、正常に成長するかどうかを検討するために飼育した。このF1個体は雄と思われ、4週齢の時点では下回っていたが、8、10週齢では上回る成長を示し特に異常は認められず、順調に成長している。

5. 精子の観察とDNAによる精液中のW精子の検出

No.12の精液を観察した結果、ニワトリ特有の細長い頭部を有する精子が確認された。精液量は0.2ml採取可能だった。精子数は $3.13 \times 10^9/ml$ であり、異常な精子は観察されなかった。後代検定の結果、キメラになっていることが証明されたNo.12は、18胚分のPGCを混合し、移植している。したがって、雌特有の性染色体であるW染色体をもつ精子が存在する可能性が考えられたためPCRにより解析した。No.12の精子から得られたDNAをPCRに適応して分析した結果、Z染色体由来の250bpのバンドのみ認められ、W染色体由来の370bpの増幅産物は得られなかった。したがって、W染色体をもつ精子の存在を確認することはできなかった(図5)。

6. ドナー胚のDNAによる性判別

移植後、ドナー胚の性をPCRにより解析した結果、No.13~19へ移植したドナー3羽は、Z染色体由来の250bpとW染色体由来の370bpの増幅バンドが認められ、雌であると判定された(図6)。したがって、表現型の性も雌であるNo.13、15、17、19は同性キメラ、No.16、18は異性キメラであった(表1)。

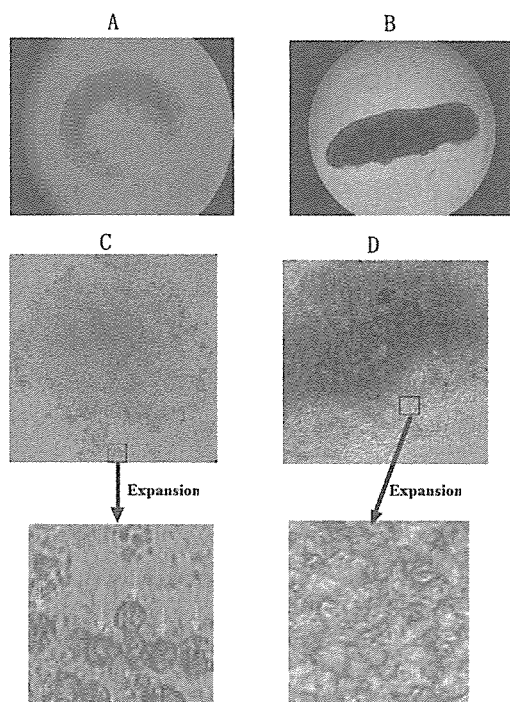


図1. ニワトリ血清とウシ血清で培養したJRの生殖隆起

A: ニワトリ血清、B: ウシ胎児血清
C and D: 48時間培養した生殖隆起
↓: JRのgPGC

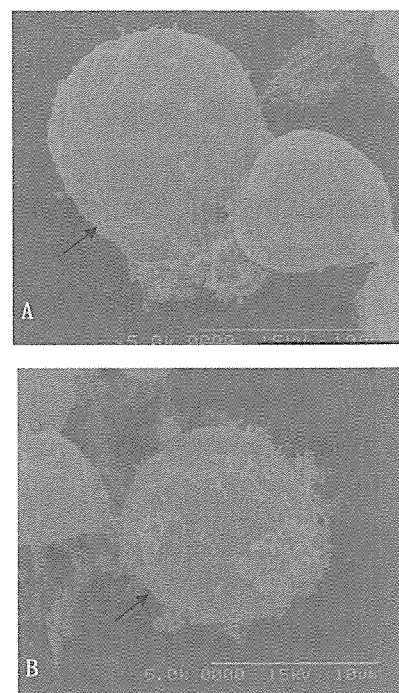


図2. SEMによるgPGCと生殖隆起の組織の観察

A: Trypsin-EDTA処理、
B: 処理なし
←: gPGC

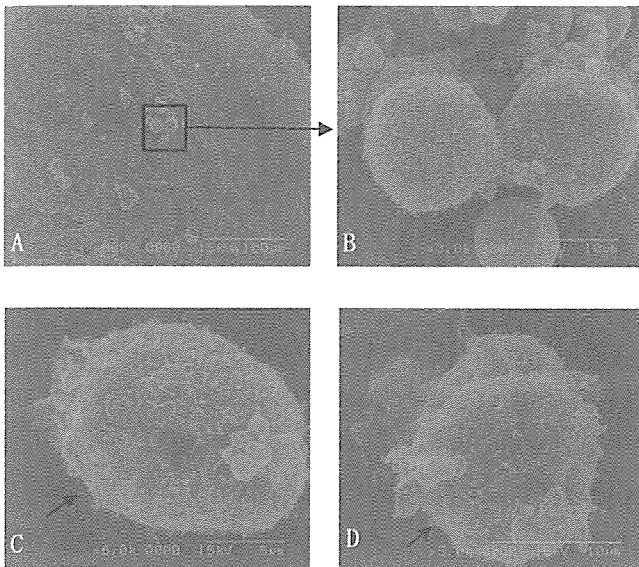


図 3. 生殖隆起を48時間培養した時に出現したgPGCのSEMによる観察
 A and B : 生殖隆起上のgPGC、B : 細かな微繊毛を持つgPGC
 C and D : gPGCは生殖隆起の周りに広がり多くの微繊毛をもっていた
 ← : gPGC

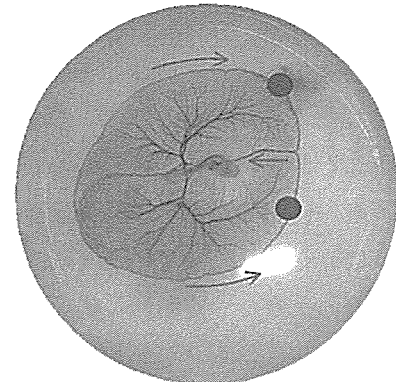


図 4. キメラニワトリ作出のための移植位置
 ● : 移植位置と血液の除去
 ← : 血流
 この胚は観察のため墨を入れている

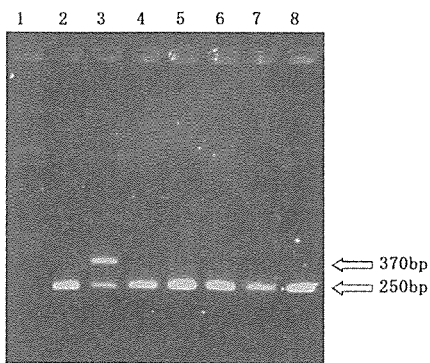


図 5. NO.12 (♂) 精子からのW特異的染色体の検出
 1 : マーカー、2 : ♂ 血液、3 : ♀ 血液
 4 ~ 8 : NO.12 ♂ 精子
 矢印 : 250bp Y特異的バンド、370bp W特異的バンド

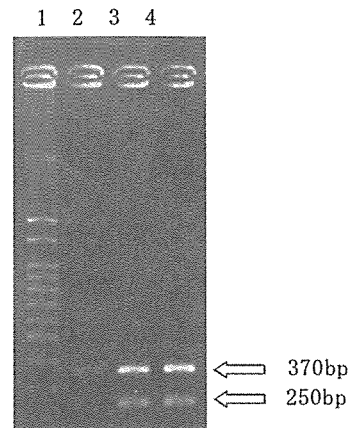


図 6. PCR法によるドナー胚の性決定
 1 : マーカー、2 ~ 4 : ドナー胚 (♀)
 矢印 : 250bp Z染色体バンド、370bp W染色体バンド

4 考 察

移植方法と移植後の胚の培養法について試行錯誤を繰り返し、本試験期間中の胚の体外培養法による孵化率は、17.9~45%となった。移植から孵化まで約20日を要し、移植されたレシピエント胚の負担も大きく、その間に発生が中止する個体も多かった。そのため、卵殻にかけたラップを外す時期や卵座に移動させるタイミングなどの注意が必要であった。一連の作業は技術的に熟練を要するが、慣れによって孵化率をさらに上げることは可能と思われる。血中に存在するPGCは少量で回収にも限りがあり、個体差も大きい。より多くのPGCを集める方法として、将来、精巣や卵巣へ分

化する生殖隆起に到達したgPGCを移植した生殖系キメラの作出を試みた。方法1では取り出したgPGCをすぐに移植し、方法2では2日間しか培養しなかったため、環境変化によるダメージを受けたままのgPGCを移植し、そのダメージの影響でレシピエント胚の生殖隆起への移動・定着能力および分化能力が低下したとも考えられる。

本実験でgPGCを凍結・融解して移植したNo.34 (♂) の生殖系キメリズムは4.0%であった。このことからJR のgPGCは凍結・融解後も生殖隆起へ到達する能力を有し、生殖能力を有する精子へと分化したことが示唆される。後代検定の結果、No.12とNo.34の2羽の雄が生殖系キメラになっていたことが証明された。しかし、産卵性が悪いJRのgPGCを産卵性の高い白色レグホンへ移植すると、産卵性の高い品種の生殖細胞が分化しやすいと仮定すれば、移植されたJRのgPGCはその分化競争に敗北し、精子や卵子といった段階まで分化できなかった可能性が示唆される。したがって、岩手地鶏のような、産卵性の低いニワトリを産卵性の高い白色レグホンへ移植すると高い生殖系キメリズム個体は得られない可能性があるのかもしれない。レシピエント胚の生殖細胞の働きを低下させ、産卵性の低いニワトリのドナー細胞でも優先的に生殖巣に導入され、分化する方法を検討する必要がある。雌操作ニワトリNo.13、15、17、19は、産卵数の20%未満しか後代検定を行っておらず、多くの卵を無駄にしてしまった。また、後代検定期間も3週間と短かったため、今後継続して後代検定を行うことで、キメラニワトリになっていることが証明されるかもしれない。実験期間中に雌の生殖系キメラが確認できなかったため、生殖系キメラ同士の交配が行えず、岩手地鶏を生産することはできなかったが、雌の後代検定は引き続き行っており、その可能性は十分あるものと思われる。

キメラと証明されたNo.12 (♂) の精子を検査した結果、精液量、精子数、精子の形態は正常なものと変わらず生殖系キメラになったとしても、問題なく精子が生産されることが示唆された。

本実験では、生殖系キメラになっていることを雄2羽の個体のみしか確認することができなかった。これは、後代検定期間が少ないため、これから継続して後代検定を行うことにより、生殖系キメラになっている個体を確認することができるかもしれない。この生殖系キメリズムを向上させることで、希少鳥類保存のための生殖系キメラ技術を実用化することが可能になり、岩手地鶏をはじめとする美しく優雅な姿や長鳴きで人々を楽しませる多くの日本鶏を未来に残す方法の1つとなるとと思われる。

地域振興への展開

岩手地鶏は国の天然記念物であり、岩手県の重要な遺伝資源である。飼養羽数が減少しており、種の保存は将来的に困難になることが予想される。本研究の一連の作業は熟練を要するが、慣れれば生殖系キメラを作出することは容易になると思われる。本研究の結果から、gPGCとしての岩手地鶏遺伝資源の保存と、個体としての増産の可能性はある。また、このgPGCのDNAに有用な遺伝子を導入すれば遺伝子改変ニワトリを作出することは可能である。したがって、興味のある岩手県内の養鶏業者があれば技術指導することで地域貢献が期待できる。

備 考

本研究の詳細は、日本家禽学会誌に投稿予定である。