

キメラ鶏作成に関する研究

Studies on production of chimeric fowl

代表研究者 広島大学生物生産学部助教授 前田 照夫
Asso. Prof., Faculty of Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ.
TERUO MAEDA

In order to create transgenic chickens by homologous recombination, the production of chimeric chickens, especially germline chimeras is essential. The purpose of present study was to improve the technique for the production of chimeric chickens.

1. The effect of injecting micropipettes of different sizes into chick blastoderms on viability and hatchability was examined. The viability and hatchability were not affected by the micropipettes of sizes ranging from 20 μm to 100 μm .

2. The effect of injected volumes into chick blastoderms on viability and hatchability was examined. The viability and hatchability were not affected by the injected volumes ranging from 0.5 μl and 2 μl .

3. To increase the chimeric rate, various numbers of the cells isolated from the blastoderms of Barred Plymouth Rock chickens were injected into the subgerminal cavity in fertilized eggs of White Leghorn chickens and the eggs were incubated. The highest chimeric rate was obtained from eggs injected with 5000 cells, 9 of 104 (8.7%) were phenotypically chimeric as judged by the presence of black feathers, and 6 of these survived to hatching.

4. To improve our method of production of chimeric chickens, the distribution of donor blastodermal cells after injecting into recipient eggs was morphologically examined. The cells injected with micropipette distributed over near the epiblast, the subgerminal cavity and yolk. Comparing the numbers of injected cells in the subgerminal cavity near by epiblast with those in yolk, the latter was much larger the former. Therefore, to increase the chimeric rate, it seems that more and more donor blastodermal cells will be injected near to the epiblast.

5. From these results, it was speculated that the proper size of micropipette and injecting volume to produce chimeric chickens was under 100 μm and 2 μl , respectively, and that injected blastodermal cells of which number is about 5000 should be injected into near portion of the epiblast to increase the chimeric rate.

研究目的

遺伝子工学や発生工学の急速な発展により、クローニングされた特定の遺伝子を動物の胚に導入し、固体レベルで発現させた形質転換動物の作成法が確立し、最近では特定の動物に特定の遺伝子を意のままに発現させることも可能な状況になりつつある。この相同遺伝子組換えによる形質転換動物の作成法が確立されれば、家畜、家禽の育種分野に大きな変革をもたらすことはあきらかである。

鳥類で形質転換動物を作成する場合、現在、次

の4通りの方法(①レトロウィルス感染による形質転換動物作成法、②受精卵の雄性前核内に直接顕微注入し、形質転換動物を作成する方法、③精子を介して外来遺伝子を導入し、形質転換動物を作成する方法、④キメラを用いた形質転換動物作成法)が考えられる。しかし、①、②、③の形質転換動物作成法では、非同源遺伝子組換えによる形質転換動物を作成することは可能であるが、相同遺伝子組換えによる形質転換動物を作成する事は不可能である。現在のところ相同遺伝子組換えの形質転換動物を作成できる方法は④の方法だけ

である。非相同遺伝子組換えの形質転換動物では、ゲノム遺伝子のランダムな位置に導入されるが、相同遺伝子組換えによる形質転換動物では、導入する外来遺伝子と細胞内ゲノム遺伝子の相同性のある部分に組換えがおこる。したがって、目的の遺伝子座に有用外来遺伝子が人為的に導入され、実際の家畜の育種に広く利用する事ができる。

本研究では、相同遺伝子組換えの研究を作成する際にも応用可能で、簡易で効率の良いキメラ作成法を開発する事を目的として、まず実験1では、外径の異なるマイクロピペットの鶏胚盤への穿刺が胚の生存率及び孵化率に及ぼす影響を、実験2では、鶏胚盤に注入する溶液量が胚の生存率及び孵化率に及ぼす影響を検討した。また、実験3では、注入胚盤葉細胞数によるキメラの発生率の向上について検討し、実験4では、キメラ作成時に注入した胚細胞が注入直後どのような部位に分布するかを組織学的に調べた。

研究経過

本研究の実験1及び2は1991年4月から1991年10月の間に、実験3は1991年8月から1991年12月の間に、実験4は1991年11月から1992年3月の間に実施された。

研究成果

実験1. 鶏胚盤に穿刺するマイクロピペットの先端外径の大きさが胚の生存率及び孵化率に及ぼす影響

先端の外径が、20 μ m、50 μ m及び100 μ mのマイクロピペットを鶏胚盤へ刺し、孵卵した時の胚の生存率及び孵化率を表1に示した。6日目生存率は対照区で92.4%、各処理区は85%前後で、有意ではないが、すべての処理区が対照区(窓を開けたがマイクロピペットを穿刺しなかった受精卵)より低い値を示す傾向であった。13日目生存率においても各処理区の間に多少の差はみられたが、対照区に比べ有意ではないが低い値を示した。孵化率でもすべての処理区が対照区より低い値を示したが、有意な差は認められなかった。また、20 μ m区で1例、100 μ m区で1例、孵卵途中で死亡した胚の中に奇形死亡胚がみられた。20及び100 μ m区の奇形は眼球及び脳が無く、嘴様のものだけが見られた。以上の結果より、鶏胚盤へのマイクロピペットの穿刺は6日目までの胚の生存率に悪影響を及ぼすと考えられた。また、マイクロピペットの先端外径の大きさが20~100 μ mの範囲であれば穿刺した胚の生存率に及ぼす影響はほぼ同じ程度であると推定され

表1. 外径20, 50及び100 μ mのマイクロピペットを穿刺し、孵卵した胚の生存率及び孵化率

	ピペットの外径	使用受精卵数	生存率 (%)		孵化率 (%)
			6日目	13日目	
対照区	—	130	92.4 \pm 3.7	81.9 \pm 4.7	35.0 \pm 7.6
	20 μ m	134	84.1 \pm 9.2	64.9 \pm 9.3	28.4 \pm 11.9
処理区	50 μ m	134	83.9 \pm 8.5	73.0 \pm 9.1	28.4 \pm 12.1
	100 μ m	134	85.5 \pm 15.7	69.7 \pm 18.0	29.8 \pm 14.8

表2. 窓を開けた受精卵の胚に0.5, 1及び2 μ lの溶液を注入した時の胚の生存率及び孵化率

	注入量	使用受精卵数	生存率 (%)		孵化率 (%)
			6日目	13日目	
対照区1	—	100	87.0 \pm 12.1	74.0 \pm 11.1	26.0 \pm 4.9
対照区2	—	100	84.0 \pm 7.4	76.0 \pm 9.2	21.0 \pm 8.6
処理区	0.5 μ l	100	84.0 \pm 4.9	72.0 \pm 5.1	29.0 \pm 8.0
	1 μ l	100	85.0 \pm 7.1	74.0 \pm 10.2	28.0 \pm 14.4
	2 μ l	100	87.0 \pm 8.7	79.0 \pm 10.2	32.0 \pm 14.4

対照区1: 窓を開けたのみの受精卵

対照区2: 窓を開け穿刺したのみの受精卵

た。

実験 2. 鶏胚盤に注入する溶液量が胚の生存率及び孵化率に及ぼす影響

窓開け受精卵の胚に注入する TCM-199 量が胚の生存率及び孵化率に及ぼす影響を調べた。その結果を入卵時の受精卵数に対する 6 日目、13 日目の生存率及び孵化率で示した (表 2)。対照区 1 (窓を開けたのみで穿刺を行わなかった受精卵) 及び対照区 2 (窓を開け穿刺したのみの受精卵) を含む全ての処理区の 6 日目生存率は 85% 前後、13 日目生存率は 75% 前後、孵化率は 21~32% を示し、対照区 1 と各処理区との間及び対照区 2 と各処理区との間に有意差はなかった。しかし、2 μ l の TCM-199 を注入した区の孵化率は対照区 1 及び 2 よりもかなり高い値を示した。

次に、窓を開け TCM-199 を注入しなかった対照区 1 では奇形は 1 羽も発生しなかったが、胚盤をマイクロピペットで穿刺したが TCM-199 を注入しなかった対照区 2 では 4 例、TCM-199 0.5 μ l 注入区で 1 例、1 μ l 注入区で 1 例、2 μ l 注入区で 1 例の奇形死亡胚が見られた。手や足は正常に発生していたが、頭部に異常がみられ眼球がなく、嘴と思われるものと臉の様なもの 2 ヶ所に存在したもの (1 μ l 注入区)、嘴、臉、どちらもみられないもの (2 μ l 注入区)、頭部が破裂し、内容物がはみ出ているもの (対照区 2)、眼球が一つだけで、その上と下に嘴様のようなものがあるもの (対照区 2) などがみられた。これらのことから、胚盤への TCM の注入量は注入受精卵の孵化率に

はほとんど影響を及ぼさないものと考えられた。しかし、胚盤中央部へのマイクロピペットの穿刺は孵卵中に死亡する胚の頭部に奇形を起こさせるものと思われた。

実験 3. 注入胚盤葉細胞数によるキメラの発生率の向上について

白色レグホンの窓開け受精卵に、1 個当たり 500, 5,000 及び 50,000 個の横斑プリマスロック胚盤葉細胞を注入した時の胚の生存率、孵化率及びキメラ発生率を表 3 に示した。6 日目、13 日目生存率及び孵化率のいずれにも、各処理区が窓開けのみを行った各対照区に比べて有意ではないが、低い値を示した。また、5,000 個の胚盤葉細胞を注入した受精卵 104 個中 9 個体で羽毛キメラと判定された。104 個に対するキメラ発生率は 8.7%、羽毛を確認できた固体に対するキメラ発生率としては 11.8% であった。50,000 個の胚盤葉細胞を注入した場合にも、処理受精卵 81 個中 2 個体の羽毛キメラがみられた。この時の処理卵全体に対するキメラ発生率は 2.3%、羽毛を確認できた胚に対するキメラ発生率としては 3.4% であった。5,000 個の胚盤葉細胞を注入した羽毛キメラ 9 個体中 6 羽は生きて孵化し (図 1)、3 個体は孵卵途中に死亡していた。この孵化した羽毛キメラの発生率は 5.8% であった。50,000 個の胚盤葉細胞を注入した羽毛キメラ 2 個体中、1 個体は生きて孵化し、1 個体は孵卵途中に死亡していた。この時の孵化した羽毛キメラの発生率は、1.2% であった。

表 3. 白色レグホンの窓開け卵に 500, 5,000 及び 50,000 個の横斑プリマスロック胚盤葉細胞を注入した時の胚の生存率、孵化率及びキメラ発生率

	注入胚盤 葉細胞数	使用受 精卵数	生存率 (%)		孵 化 率 (%)	キ メ ラ 発 生 率 (%)	生存キメ ラ発生率 (%)
			6 日目	13 日目			
対照区	—	58	88.6	79.6	43.2	—	—
処理区	500	44	82.8	63.8	32.8	0.0	0.0
対照区	—	74	93.2	77.0	37.8	—	—
処理区	5,000	104	78.4	60.6	27.9	8.7	5.8
対照区	—	75	89.3	76.0	42.7	—	—
処理区	50,000	81	81.5	71.6	38.3	2.3	1.2

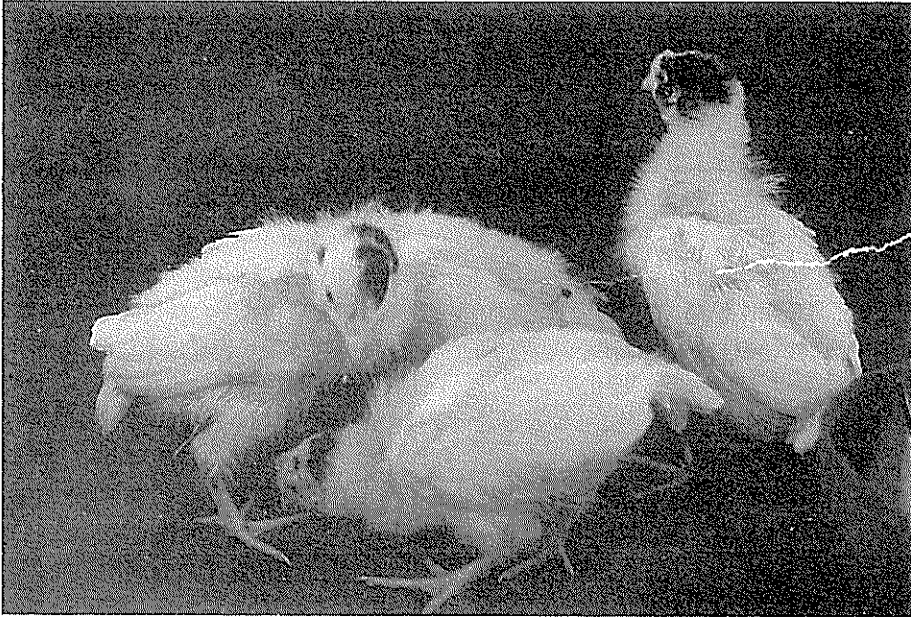


図1. 実験3で得られたキメラ鶏

5,000個の胚盤葉細胞を注入した受精卵より発生した羽毛キメラの黒色羽毛の部位は、頭部及び首部のものが2羽、首部のみに1羽、背部のみのものが2羽、背部及び翼部のものが2羽、尾部のみのものが2羽であった。その羽毛の占める割合は、個体により異なり、羽毛全体の約1/4が黒色となっているものや、わずかに数本の羽毛が黒色となっているものなどさまざまであった。これは、生きて孵化した雛、発生の途中で死亡していた胚のどちらにおいても同様であった。

50,000個の胚盤葉細胞を注入した受精卵より孵化した羽毛キメラは、背部の全体、右翼部のほとんど、左翼部の一部及び腹部にまで黒色羽毛がみられ、羽毛全体の半分以上が黒色の羽毛であった。しかし、孵卵途中で死亡していた羽毛キメラは、首部にわずかに黒色羽毛がみられただけであった。

実験4. キメラ作成時に注入した胚細胞の胚における分布について

キメラ作成に供した受精卵の胚盤葉上層はすでに4mm以上に発達しており、胚盤葉下層は形成されつつある状態であり、胚盤下腔が認められ

た。その下腔の幅（胚盤葉から卵黄顆粒のある位置までの距離）は最も広いところで約200 μm であった。マイクロピペットにより注入された胚細胞は10~20 μm の大きさであり、胚盤葉に開口した孔をふさぐような状態、穴の近くの胚盤下腔に遊離した状態、あるいは下腔の下部の卵黄顆粒中に埋もれた状態で存在していた。大多数の注入胚細胞は卵黄顆粒中に分布しており、開口した胚盤葉付近あるいはその下腔に分布している注入胚細胞数は少なかった。また最も深く注入された胚細胞は胚盤葉から約800 μm の深さにまで達していた（図2）。以上の結果より、効率良くキメラを生産するためには、胚盤葉により近接した位置に多くの胚細胞を注入できるような方法に改良することが必要であると考えられた。

今後の課題と発展

形質転換動物を作成するには、外来遺伝子を顕微注入する方法、レトロウィルスに感染させる方法及びキメラを用いる方法等が使用される。これらの方法の内、顕微注入とレトロウィルス感染法は、導入された外来遺伝子が宿主の染色体のランダムな位置に組込まれる非相同遺伝子組換えであ

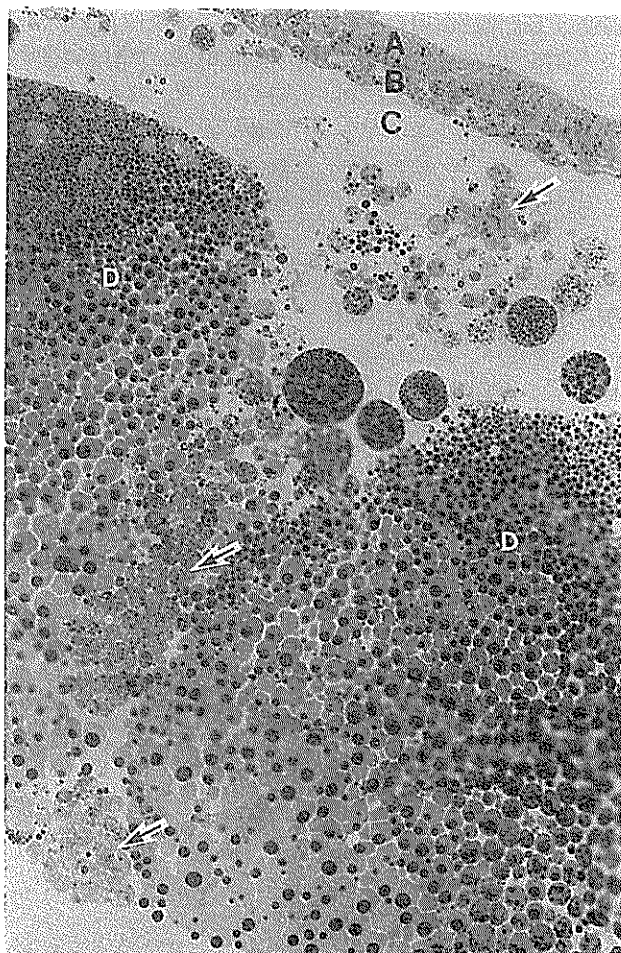


図2. キメラ作成時に注入した胚細胞の胚における分布
 A: 胚盤葉上層; B: 胚盤葉下層; C: 胚盤下腔; D: 卵黄
 矢印は注入した細胞を示す。

り、キメラを用いて形質転換動物を作成する方法が、相同遺伝子組換えによる形質転換動物の唯一の作成方法と言える。したがって、キメラ作成の意義は大きい。

本研究で種々の胚操作を検討した結果、マイクロピペット先端外径の大きさが $100\ \mu\text{m}$ 以下、注入する溶液量が $0.5\sim 2\ \mu\text{l}$ の範囲の注入溶液量は、胚の生存及び孵化率に悪影響を及ぼさないと推定された。次に、注入する胚盤葉細胞数がキメラ発生率に及ぼす影響について検討した結果、5,000 個の胚盤葉細胞を注入した場合に 8.7%、50,000 個の胚盤葉細胞を注入した場合に 2.3%

のキメラ発生率を得たが、500 個の胚盤葉細胞を注入した場合には羽毛キメラは得られなかった。また、5,000 個の胚盤葉細胞を注入し、孵化した羽毛キメラの発生率は 5.8% であった。したがって、注入胚細胞数は受精卵 1 個当たり 5,000 個が適当であると結論された。また、キメラ作成時に注入した胚細胞の胚における分布を組織学的に検討した結果、効率よくキメラを生産するためには、胚盤葉により近接した位置に多くの胚細胞を注入できるような方法に改良する必要があることが明らかにされた。

一方、生殖系キメラを作成する時、哺乳類では、

奇形種細胞である EC 細胞, EK 細胞が用いられている。鳥類ではこのような細胞株はまだ樹立されていないが, 始原生殖細胞 (精巢又は卵巣に到達し, 将来精子又は卵子になる細胞) を用いて生殖系キメラ作成が可能であり, また, 始原生殖細胞を初期胚から分離する方法なども検討されている。

したがって, 今後, 始原生殖細胞を初期胚から分離採取し, 本研究で明らかになったように 100 μm 以下のマイクロピペットを用い, 窓開け受精卵の胚の最適部位に, 0.5~2 μl の範囲 (注入細胞数は約 5,000 個) で, 顕微注入し, 生殖系キメラを作成すれば, より効率的な相同遺伝子組換えの形質転換動物の作成法が確立されるであろう。

謝 辞 最後に, 本研究に御助成下さった日産科学振興財団, 御助成を決定下さった同財団の選考委員の方々, また, 推薦下さった日本畜産学会に深謝いたします。

発 表 論 文

学術論文

Maeda, T., Y. Yamakawa, K. Masuda and T. Terada:
The distribution of blastodermal cells transferred to chick embryo for chimera production using windowed eggs. Jpn. Poult. Sci., (投稿中)

口頭発表

増田 圭, 村中謙昭, 前出照夫, 寺田隆登: 鶏胚盤葉細胞の注入によるキメラ作成法について。平成三年度日本畜産学会関西支部大会, 演題番号 II-1 (1991)。