

# ニワトリ初期発生胚におけるステージ判定法の精密化に関する研究

筑波大学生命環境系・教授 田島 淳史

## ■ 目的

本研究は、ニワトリ初期胚の発生ステージ判定をより客観的に行うための新たな指標を見いだす事を最終的な目標とした研究の一環として、胚の成長に伴う内臓等の変化、および生理的変化の指標として血液成分の変化について検討した。

## ■ 方法

本実験には、筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター(T-PIRC)農場で飼育されているニワトリ(白色レグホーン)の受精卵を用いた。本研究には、5日胚、6日胚、7日胚、8日胚および9日胚を用いた。

### 1) 胚の臓器の計測

胚の質量を計測した後、剖検し、心臓、肝臓、腺胃と筋胃、右側中腎と生殖巣、左側中腎と生殖巣をそれぞれ摘出し、実体蛍光顕微鏡(M165 FC、グローバルライカ、東京)で写真を撮影し画像解析ソフト(ImageJ)を用いて大きさを計測した。その後、各臓器の質量を計測した。

### 2) 血液の分析

供試卵の鈍端に穴をあけ、気室部分から内卵殻膜を取り除くことにより血管を露出させ、ガラス針を使って採血を行った。採血した血3~5 $\mu$ Lを30 $\mu$ LのPBS(-)に封入し4°C、10,000rcfで10分間遠心分離(Centrifuge 5415 R、Eppendorf、ドイツ)し、血漿を回収し凍結保存した。また、初生雛(0~4日齢)と成鶏からも採血を行い、同様に遠心分離をした後、血清を採取し凍結保存した。

この血液サンプルを用いてSDS-PAGEを行った。まず、胚の血液サンプルにバッファーを入れ、100°Cで4分間加熱した。泳動槽(ミニプロティアン Tetra セル、バイオ・ラッド、東京)に作成したSDSゲルをセットし、サンプルを注入し、20mAで泳動を行い、泳動後にSYPRO® Ruby染色を行った。

### 3) 性判別

性判別にはPCR法を用い、ニワトリ雌のW染色体に特異的な配列を検出した。DNAサンプルとして、胚については解剖時に摘出した体組織を用い、初生雛については血液を用いた。

## ■ 結果および考察

体長、体重、各臓器の大きさ、重量は、孵卵日数が増えるとともに増加したが、雌の9胚における生殖以外の全ての項目において雌雄差は認められなかった。一方、雌雄共に体長・各臓器の大きさと、体重・各臓器の質量においては、増加のパターンに違いが認められた。本研究で測定した項目の中で、眼球の直径は孵卵5日目から9日目まで一定の比率で増加しており、雄雌いずれにおいても有意差が認められた( $P<0.05$ )。

血液中のタンパク質濃度は、胚においては有意差が認められなかった( $P>0.05$ )が、孵卵5日目から7日目にかけて増加する傾向が認められた。また、初期胚の値と初生雛の値とは有意差があり( $P<0.05$ )、初生雛と成鶏の間にも有意差が認められた( $P<0.05$ )。このことから、孵卵9日目以降、血液中のタンパク質濃度は成長に伴って増加することが考えられる。

さらに、胚の血液をSDS-PAGEに供した結果、孵卵日数の違いによる変化が認められた。今後、成長に伴って変化する具体的なタンパク質を同定することが出来れば発生ステージを決定するための指標となることが期待される。

## ■ 結語

本研究は、ニワトリ初期胚の発生ステージ判定をより客観的に行うための新たな指標を見つけることを目標とした。その結果、ニワトリ初期胚の成長を評価する指標として眼球の大きさがその新たな候補として挙げられた。今後、眼球の発達に伴う遺伝子発現および転写・翻訳活性を検討していく予定である。