

無卵殻培養条件下における

ニワトリ胚の成長に影響する要因に関する研究

2023年1月

小原 勝也

無卵殻培養条件下における
ニワトリ胚の成長に影響する要因に関する研究

筑波大学大学院
理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
農学学位プログラム
博士（農学）学位論文

小原 勝也

目次

第1章 緒言 5

1. 鳥類の進化における卵殻の獲得とその意義
2. 鳥類の利用
3. ニワトリの卵子形成と胚発生
4. ニワトリ胚卵殻外培養とその重要性
5. ニワトリ胚無卵殻培養法 (cSLCS) の確立
6. cSLCS の課題

第2章 cSLCS における乳酸カルシウム添加がニワトリ胚に及ぼす影響 . . 15

1. 目的
2. 材料と方法
3. 結果
4. 考察

図表

第3章. cSLCS における培養 17 日目以降の純酸素添加が培養 19 日目までのニワトリ胚に及ぼす影響 32

1. 目的
2. 材料と方法

3. 結果

4. 考察

図表

第4章 総合考察 47

1. 卵殻および卵殻膜の機能と人工容器の関係

2. cSLCS における乳酸カルシウムがニワトリ胚の成長に与える影響

3. cSLCS における酸素添加がニワトリ胚の成長に与える影響

4. 孵化直前の胚における培養容器の影響と今後の課題

5. cSLCS の展望

6. まとめ

図表

和文要約

Summary

謝辞

参考文献

略語一覧

HH-1 ～ HH-46: Hamburger and Hamilton (1951) による孵卵中のニワトリ胚の発生段階を形態学に 46 段階に分けて判定するための指標

cSLCS: Chick Shell-Less Culture System ニワトリ胚無卵殻培養法
卵殻を用いずに人工培養容器にてニワトリ胚を培養する方法

cSLC: Chick Shell-Less Culture ニワトリ胚無卵殻培養
cSLCS によるニワトリ胚の培養

PTFE: Polytetrafluoroethylene ポリテトラフルオロエチレン

PMPW: Polymethylpentene Wrap ポリメチルペンテン製食品用ラップ

PMPF: Polymethylpentene Film ポリメチルペンテン製フィルム
PMPW を卵殻の形状に近い半楕円形に引き伸ばして作製したフィルム

EGK-I ～ EGK-X: Eyal-Giladi and Kochav (1976) および Kochav *et al.* (1980)
による排卵から放卵に至るまでのニワトリ卵管内卵子の発生段階を形態学に
10 段階に分けて判定するための指標

LDH: Lactate Dehydrogenase 乳酸脱水素酵素

Ca: Calcium カルシウム

IP: Inorganic Phosphorus 無機リン

GLU: Glucose グルコース

AST: Aspartate Aminotransferase アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

TCHO: Total Cholesterol 総コレステロール

TG: Triglyceride 中性脂肪

BV: Bone Volume 骨体積

TV: Total Tissue Volume 骨組織体積

BS: Bone Surface Area 骨化領域表面積

BV/TV: 骨密度

BS/BV: 骨体積あたりの骨化領域表面積

vBMD: Volumetric Bone Mineral Density 体積骨密度

qSLC: Quail Shell-Less Culture ウズラ胚無卵殻培養

SpO₂: 経皮的動脈血酸素飽和度

pRTD: Proportion of Renal Tubules with Pathological Degeneration
変性した腎尿細管の割合

第1章 緒言

1. 鳥類の進化における卵殻の獲得とその意義

46億年の地球の歴史の中で、最初に現れた脊椎動物は、今から5億年前のカンブリア紀に出現した無顎類とよばれる魚類である。この無顎類は、約4億年前にかけて軟骨魚類や硬骨魚類に進化し、やがて両生類が生まれた。魚類および両生類は無羊膜類に分類され、胚を乾燥から保護する卵殻をもたないため、水中や湿潤環境下でのみ胚発生が可能である。これに対し、今から約3億2000万年前の石炭紀には、乾燥した陸地で胚発生が可能な羊膜を持つ羊膜類が進化した。羊膜類には爬虫類、鳥類および哺乳類が含まれ、爬虫類から哺乳類が進化したのは約2億5000万年前の三畳紀、鳥類が進化したのは約2億年前のジュラ紀であると考えられている。

無羊膜類から羊膜類への進化の過程で卵に起こった変化は、1) 陸地上での産卵、2) 母体の生殖管内での受精、3) 卵の大型化に伴う耐乾燥性の強化、4) 繊維性の卵殻膜が卵を囲むことによる強化、5) 卵黄に水を多く吸収する蛋白質が増加することによる水分保持力の増加、6) 羊膜と漿膜の出現による耐乾燥性のさらなる強化、7) 尿膜の出現に伴う、卵内のガス交換に対する寄与、8) カルシウムに富む卵殻の出現に伴う、捕食や乾燥に対する保護の増強、という8つの要素が順に起こったと推測されている (Colbert, 2004)。

この一連の陸上生活への適応進化の過程で出現した卵殻は、厳しい生存競争を経て、種の保存に大きく寄与してきた構造物である。

2. 鳥類の利用

本研究の対象である鳥類は、哺乳類および爬虫類と共に羊膜類に属している。その一方、鳥類および爬虫類では卵の周囲がカルシウムアパタイトと呼ばれる構造物でできた卵殻により囲まれており、胚発生は母体外の陸上で起こる。そのため、胚の発生を観察するにあたり母体の拘束・手術が不要なニワトリ胚は、発生学のモデル動物として用いられてきた。ニワトリ胚の発生過程について記述された最も古い文献は、アリストテレスによるもので、紀元前にまでさかのぼる (Aristoteles, 1965)。現在では、ニワトリは発生学のみならず、鶏卵抗体を利用したワクチン等の医薬品や試薬の生産、毒性試験など、幅広い分野で利用されている。

鳥類の中で、特にニワトリは、人類の長い歴史の中で、約 3,600 年前に東南アジアで家畜化されたといわれる (Peters *et al.*, 2022)。現代社会におけるニワトリは、肉や卵といった、生存に欠かせない栄養源としても広く用いられている。養鶏の産業化に大きな貢献を果たしたのは、Lyman Byce による電気孵卵器の発明である。従来は、母鶏の抱卵や、発酵熱を用いた不安定な孵卵器により孵卵されていたものが、電熱器を利用することで、安定して高い孵化率を得ることが可能となった (Byce, 1914)。この発明により、卵や肉の大規模生産を可能とする技術開発が進み、現在では、世界で飼育されている家畜の中で、ニワトリが最も多く、約 330 億羽が飼育されている (FAOSTAT, 2020)。

3. ニワトリの卵子形成と胚発生

ニワトリの卵巣には、卵母細胞を含んだ発育段階が異なる多数の卵胞が存在する。卵胞は成熟段階により様々な大きさのものがある。卵胞の中にある卵母細胞は、母鶏の肝臓で合成され、血液中を循環する卵黄タンパク質の前駆体を層状に蓄積して成長する。この卵母細胞の成長に伴って卵胞も成長する。その後7~11日間かけて急速に成長した卵胞は、下垂体前葉から分泌される黄体形成ホルモン（LH）の働きにより、ステロイドホルモン産生系が変化する。それにより、スティグマと呼ばれる卵胞の表面の一部の組織でタンパク質の分解が起こり卵胞膜が破れ、卵母細胞が排卵される。排卵された卵子は卵管漏斗部に取り込まれて受精した後に、膨大部に移動し、卵白分泌腺から分泌された卵白により覆われる。排卵後約3時間して、卵子は峽部に移行し、卵白の外側に卵殻膜が形成されると同時に、第1卵割が起こる。第1卵割の15分後、第1卵割に対してほぼ直角に第2卵割が起こり、さらに1時間後には第3卵割が起こる。卵子は第4卵割が起こる頃に子宮部に移り、約20時間滞留する。子宮部では、カルシウムを主成分とする高濃度塩類溶液が分泌され、炭酸脱水素酵素の働きにより重炭酸イオン（ HCO_3^- ）から炭酸イオン（ CO_3^{2-} ）が生じ、卵殻膜表面で非酵素的に反応することで炭酸カルシウム（ CaCO_3 ）を主成分とする卵殻が形成される。この間、卵子は卵割を繰り返し、約5万個の細胞からなる胚盤葉にまで発生が進み、放卵される。（Table. 1-1; Figure 1-1, 1-2; 小野, 2014; 水野, 1989）

放卵後は、孵卵が開始されるまで発生は進行しない。孵卵開始後は、最初の24時間で顕著な変化を生じ、HH-6~7に達する。この頃には、すでに外胚葉、

中胚葉、内胚葉への分化は進んでおり、3日目（HH-16）には、血管や心臓をはじめ、多くの臓器原基が形成される。その後、胚の各器官の発生が進み、孵卵10日目には、漿尿膜により胚全体が覆われる。漿尿膜は、胚の生存に必要なガス交換や、卵殻からのカルシウム吸収に寄与する。孵卵19～20日目になると胚は、漿尿膜を破り、気室に嘴を入れることで肺呼吸を開始し、その後、嘴打ちを開始して卵殻を破り、21日目に孵化に至る（Burton and Tullett, 1985）。

4. ニワトリ胚卵殻外培養とその重要性

鳥類において、ヒナの孵化に必要な孵卵条件は、母鶏が抱卵することで全てが満たされるが、家禽においては、この母鶏による抱卵を孵卵器により代替することが可能である（Byce, 1914）。ニワトリにおける孵卵条件は、温度37.6～37.8度、相対湿度約60%で、1時間に1回転卵を行うのが一般的である。

鳥類胚における卵殻外培養は、卵殻に覆われているために観察できない胚の発生過程を可視化することができる技術である。この技術は、発生学における胚発生過程の解明などの基礎研究に広く貢献するだけでなく、生命進化において卵殻がもたらした効果の解析、様々な胚操作（Boulland *et al.*, 2010）、毒性試験（Kanda *et al.*, 2021）、バイオイメージング（Kulesa *et al.*, 2010; Funahashi *et al.*, 2014）、再生医療の基礎研究（Chiba *et al.*, 2010）など、多くの分野への応用が可能である（Tahara and Obara, 2021）。今後、この技術を幅広い分野で活

用していくためには、正常なヒナが安定して孵化し、孵化したヒナが正常に発育可能であるという条件を満たす培養法を開発することが重要な課題である。

5. ニワトリ胚無卵殻培養法 (cSLCS) の確立

ニワトリ胚の発生過程を一部可視化する培養法としては、卵殻の一部に穴を開けて様々な処理を行った後、フィルムで蓋をして培養を続ける窓開け法が知られており (Fisher and Schoenwolf, 1983; Andacht *et al.*, 2004)、多くの分野で応用されている。一方、卵殻外培養によりヒナを孵化させた初めての報告は、Perry (1988) によるもので、この方法では、母体内にある 1 細胞期の受精卵を取り出し、静置したガラス容器の中で培養液と共に約 1 日培養し (System 1)、次いで、他の卵の殻を利用した代替卵殻を用いた容器に胚を移して培養液で満たし、フィルムで蓋をして、胚がフィルムではなく卵殻に接するように横に固定し、転卵を行いながら 6 日目まで培養した (System 2)。その後、二黄卵などの大型の代替卵殻に胚を移し、空気の層ができるようにしながらフィルムで蓋をして、空気の層を上にしたまま培養を継続した (System 3; Figure 1-3)。この方法による孵化率は約 7% であったが、後に、濃厚卵白を除去するなどの改良が行われ、孵化率は 50% ほどにまで改善された (Naito *et al.*, 1990)。この方法は、培養容器に二黄卵等の大型の卵殻を用いたことから、代替卵殻法とも呼ばれている。代替卵殻法の開発により、様々な胚操作や、発生過程の可視化が可能となったが、代替卵殻は不透明であったため、容器を横にする必要がある System 2 では継続した観察が不可能であり、System 3 でも、観察が可能

な領域は限られていた。また、容器となる代替卵殻の確保が難しいという問題もあった。

一方、卵殻を用いずに、ポリエチレンまたはポリ塩化ビニリデン製の袋や食品用ラップを用いた培養法が検討されてきたが、発生が可能なのは初期の間のみで、ヒナを孵化させることはできなかった (Elliott and Bennett, 1971; Rowlett and Simkiss, 1987)。

その後、Kamihira *et al.* (1998) は、代替卵殻を用いず、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 膜を用いた培養容器にて 42.8% の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 日目のウズラ卵の卵殻を除去し、胚へのカルシウム源として、卵殻を細かく砕いた粉と乳酸カルシウムを培養容器に加え、インキュベーター内に純酸素を供給しながら培養した。これにより、代替卵殻なしで胚を孵化させることが可能となったが、PTFE は不透明であるため、胚の観察は上部からのみで、側面からの観察は不可能だった。

近年になり、ポリメチルペンテン製食品用ラップ (PMPW) を用いた培養容器による培養法が開発され、従来の上部のみならず、側面からの観察も容易となった (Tahara and Obara, 2014)。この方法は、PMPW を卵殻の形状に近い半楕円形に引き伸ばして作製したフィルム (PMPF) をプラスチックカップに取り付けた培養容器に、胚へのカルシウム源として、乳酸カルシウムと蒸留水を加え、培養 3 日目の卵殻を割って内容物を移し、蓋をして培養を継続し、培養 17 日目以降は純酸素の添加を行うことで孵化を可能とした。この方法は、卵殻

を用いずに孵化させることができることから、ニワトリ胚無卵殻培養法（chick shell-less culture system; cSLCS）と呼ばれている。

6. cSLCS の課題

Tahara and Obara (2014) による cSLCS は、ヒナを孵化させることを可能にしたが、孵化率が低いことに加えて実験ごとに安定しない (Tahara *et al.*, 2021) など、現時点では未完成の技術である。従って、本技術を実用化するためには、個々の技術的要素を改良して培養条件を最適化することにより、生存率および孵化率の再現性を高め、最終的には卵殻卵に匹敵する孵化率を得ることが必要である。

現在の cSLCS で胚を孵化させるためには、乳酸カルシウムと蒸留水および純酸素の添加が必要である。しかし、これらが正常な胚発生や胚の成長にどのような影響を与えているのかは未だ不明である。そこで、本研究では、白色レグホーンを用い、多くの技術的要因の中で、特に重要度の高い外的要素として、まず前期から中期にかけて乳酸カルシウムと蒸留水の添加がニワトリ無卵殻培養（chick shell-less culture; cSLC）胚に与える影響を検討し、次に培養 17 日目以降の酸素添加が cSLC 胚に及ぼす影響に注目し、生存率低下に関与する問題点を明らかにすることを目的とした。なお、培養 19 日目以降については、生存率が低下する要因が乳酸カルシウムや酸素だけではなく、培養容器自体の形状や、培養容器作製過程における培養容器ごとの品質の差に由来する可能性などを含むことから、今回の研究からは除外することとした。

図表

Table 1-1. Egg formation sequence in the genital tract of hens.

Position of egg	Time spent by egg	Egg formation phases
Ovary	—	Ovulation
Infundibulum	15–20 min	Fertilisation and thin albumen secretion
Magnum	3 hr	Thick and thin albumen secretion
Isthmus	15–60 min	Shell membrane secretion
Uterus	18–22 hr	First cleavage Eggshell formation
Vagina	1–3 min	Blastoderm stage Oviposition

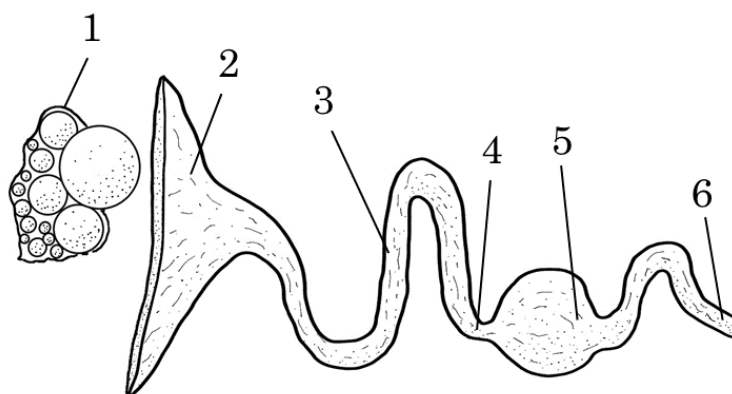


Figure 1-1. Schematic drawing of the oviduct of a hen.

1. Ovary. 2. Infundibulum. 3. Magnum. 4. Isthmus. 5. Uterus.
6. Vagina. (Original drawing by Obara)

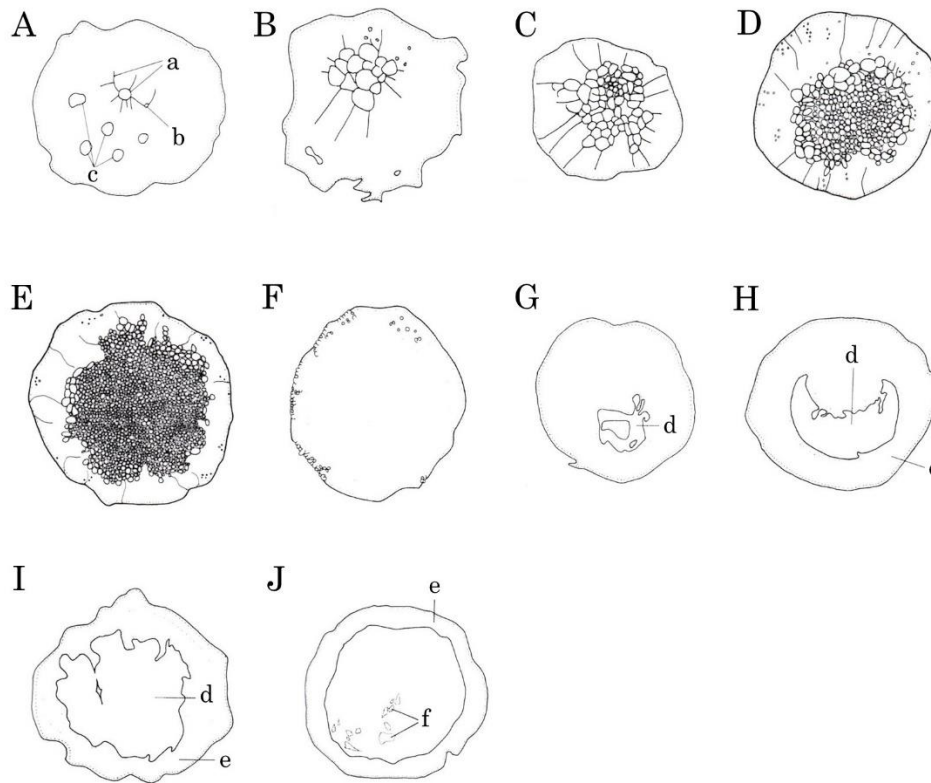


Figure 1-2. Developmental stages of the chick embryo *in utero* from Eyal-Giladi and Kochav (1976) and Kochav *et al.* (1980).

A. EGK-I (0–1 hr uterine age). B. EGK-II (about 2 hr uterine age). C. EGK-III (3–4 hr uterine age). D. EGK-IV (5 hr uterine age). E. EGK-V (8–9 hr uterine age). F. EGK-VI (10–11 hr uterine age). G. EGK-VII (12–14 hr uterine age). H. EGK-VIII (15–17 hr uterine age). I. EGK-IX (17–19 hr uterine age). J. EGK-X (a freshly laid egg about 20 hr uterine age). a. Cleavage furrows. b. Polar body. c. Nests of supernumerary spermia. d. Area pellucida. e. Area opaca. f. Isolated cell aggregates. Modified from Mizuno (1989).

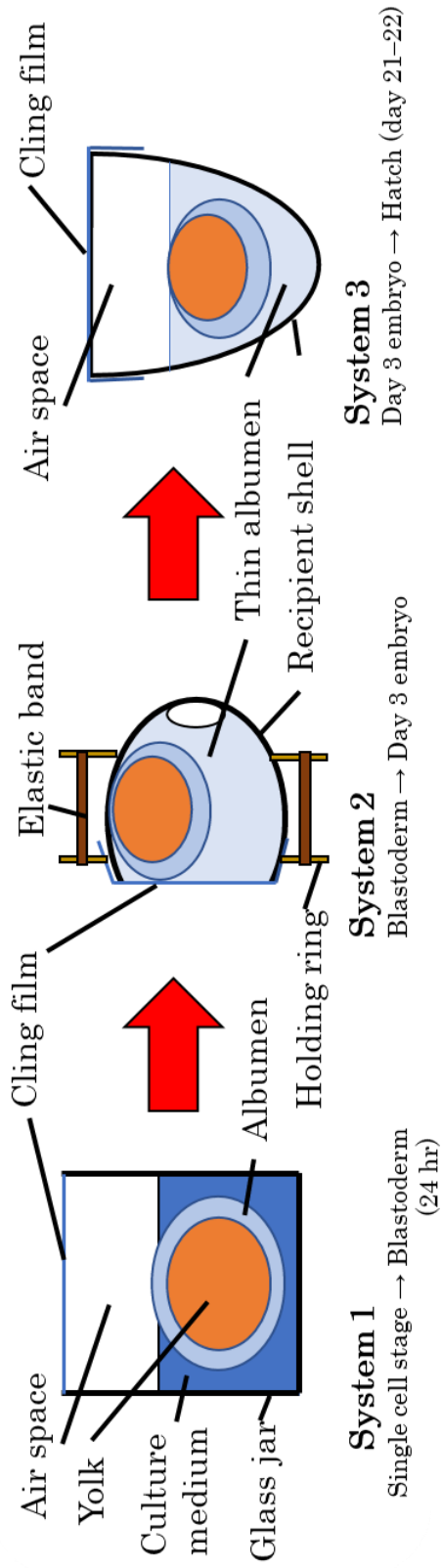


Figure 1-3. A *ex ovo* culture system for chick embryo from Perry (1988).

Fertilised eggs at the single cell stage in the hen's body were removed and hatched in three systems. Modified from Perry (1988).

第2章 cSLCS における乳酸カルシウム添加がニワトリ胚に及ぼす影響

1. 目的

本来、胚は卵殻に由来する炭酸カルシウムをカルシウム源として利用しており、卵殻は胚が要求するカルシウムの大部分を供給している (Rowlett and Simkiss, 1987; Kamihira *et al.*, 1998)。胚は、漿尿膜と卵殻膜を介して接している部分の卵殻を漿尿膜に分布する分泌細胞より分泌される炭酸脱水素酵素により溶解し、漿尿膜に分布する細胞により炭酸カルシウムを取り込み、血液中に分布させている (Gabrielli and Accili, 2010)。

一方で、cSLCS で培養した胚は、卵殻がないため、この経路によるカルシウムの吸収を行うことは不可能である。また、炭酸カルシウムは、水に溶けにくい (Solubility: 1.5 mg/100 mL-H₂O at 25°C) ため、卵白に溶かすことで漿尿膜からの吸収を促すことも不可能である。そのため、現在の cSLCS では、胚へのカルシウム供給源として、水溶性である乳酸カルシウム (Solubility: 6.7 g/100 mL-H₂O at 25°C) が用いられている (Tahara and Obara, 2014)。

本研究では、cSLC における乳酸カルシウムおよび溶媒として用いられる蒸留水の添加が胚に与える影響について明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

受精卵

実験には、家畜改良センター岡崎牧場から導入され、筑波大学 T-PARC 農場にて飼育されている 8~18 ヶ月齢の白色レグホーン種 (MB line) を用い、自由

に採食・飲水できる個別ゲージにて、14 時間明期、10 時間暗期の照明条件下で飼育された。受精卵を採取するため、毎週 1 回人工授精を行った。精液は、複数のオスから腹部マッサージ法により採取し、採取した精液を 1 mL シリンジ (TT-01T, テルモ (株), 東京) を用いて、メスの卵管腔部に約 50 μ L ずつ注入した。放卵された受精卵は 1 日 1 回午後 1 時頃に採卵し、直ちに 15°C の貯卵庫 (MIR-154, PHC (株), 東京) 内に保存した。実験には、放卵後 1~7 日の受精卵を使用した。

本研究は、筑波大学動物実験取扱規程に基づき、筑波大学動物実験委員会の承認 (承認番号: 21-435) を得て実施した。

培養容器の準備

培養容器は、従来の cSLCS に準じたものを使用した (Tahara and Obara, 2014)。

実験方法

受精卵をあらかじめインキュベーター (P-008, (株) 昭和フランキ, 埼玉) にて、温度 37.8°C、相対湿度 70% で前培養を行った。培養 3 日目、胚が HH-15~16 になったら、次の 3 つの条件に無作為に振り分けて実験を継続した。

Trmt-1: 培養容器には、乳酸カルシウムおよび蒸留水を加えずに、3 日目の胚を移し、培養を行った。

Trmt-2 : 培養容器に、2.5 mL の蒸留水のみを加えた後、3 日目の胚を移し、培養を行った。

Trmt-3 : 培養容器に、250 mg の乳酸カルシウム 5 水和物 (Cat #:031-00675, 富士フイルム和光純薬 (株) , 大阪) と 2.5 mL の蒸留水を加えた後、3 日目の胚を移し、培養を行った。

IC : 受精卵の殻は割らずに、そのままインキュベーターで、温度 37.8°C、相対湿度 70% で適宜転卵を行いながら培養を続けた。

Trmt-1, 2, 3 については、従来の cSLCS に従って培養を継続した (Tahara and Obara. 2014; Figure 2-1) 。培養 17 日目に、胚の漿尿膜に分布する血管から約 0.5 mL の血液を採取し、遠心分離によって血漿を分離し、臨床用血液生化学検査装置 (DRI-CHEM V4000, 富士フイルム (株) , 東京) を用いて、乳酸脱水素酵素 (LDH) 、カルシウム (Ca) 、無機リン (IP) 、グルコース (GLU) 、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 、総コレステロール (TCHO) およびトリグリセライド (TG) 濃度を測定した。採血後、胚を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (Cat#: 062-01661, 富士フイルム和光純薬 (株) , 大阪) にて固定した。

Micro-CT 解析

培養 17 日目の胚の固定後、脛骨を取り出し、3-D X-ray microscopic CT scanner (TDM-1000, ヤマト科学 (株) , 東京) を用いて、60 kV 70 μ A の条件にて撮影を行った。撮影したデータは、segmentation threshold (109 mg/cm³) を

設定して軟部組織を取り除き、Micro-CT 解析ソフトウェア TRI/3D-BON（ラトックシステムエンジニアリング（株），東京）を用いて骨化の程度を定量化し、骨体積（BV, mm³）、骨組織体積（TV, mm³）、骨化領域表面積（BS, mm²）、骨密度（BV/TV, %）、骨体積あたりの骨化領域表面積（BS/BV, 1/mm）、体積骨密度（vBMD, mg/cm³）を求めた。

統計学的処理

各実験区間の生存率は、Tukey の検定を用いて解析を行った。血漿及び Micro-CT 解析の統計解析は、R Version 3.4.1（The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）のグラフィックユーザーインターフェースである EZR Version 1.37（Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Japan）を用いて行った（Kanda, 2013）。有意差検定は、一元配置分散分析（one-way ANOVA）により多重比較を行い、Tukey の検定を用いて解析を行った。有意差は $P < 0.05$ とした。

3. 結果

胚の生存率は、Trmt-3 において、培養 6~7 日目の間で有意に減少したが（ $P < 0.05$ ）、Trmt-2 では、わずかに減少するのみで、有意差は認められなかった。また、IC、Trmt-1、2、3 の培養 17 日目における生存率は、それぞれ 95.2%、84.1%、60.6%、26.0% だった（Figure 2-2）。

Trmt-1、2、3 および IC の血漿中 Ca の平均濃度は、それぞれ 9.7、9.5、12.1、12.7 mg/dl だった。Trmt-3 と IC の間には有意差は認められなかったが、Trmt-1 と 2 では、Trmt-3 および IC と比べて有意に低くなった ($P < 0.05$; Figure 2-3A) 。 Trmt-1、2、3 および IC の血漿中 IP の平均濃度は、それぞれ 11.0、9.1、8.8、10.1 mg/dl だった。Trmt-1 では、Trmt-2、3 よりも有意に高くなった ($P < 0.05$) が、Trmt-2、3、IC では、有意差は認められなかった ($P > 0.05$; Figure 2-3B) 。 Trmt-1、2、3 および IC の血漿中 LDH の平均濃度は、それぞれ 521.5、609.5、830.2、685.3 U/l だった。Trmt-3 では、Trmt-1、2 よりも有意に高くなった ($P < 0.05$) が、Trmt-3 と IC の間では、有意差は認められなかった ($P > 0.05$; Figure 2-3C) 。 Trmt-1、2、3 および IC の血漿中 GLU の平均濃度は、それぞれ 221.4、233.8、235.6、209.6 mg/dl だった。各実験区間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$; Figure 2-3D) 。 Trmt-1、2、3 および IC の血漿中 AST の平均濃度は、それぞれ 32.5、36.4、40.0、9.0 U/l だった。Trmt-1 では、有意に低くなった ($P < 0.05$) が、Trmt-2、3 および IC では有意差は認められなかった ($P > 0.05$; Figure 2-3E) 。 Trmt-1、2、3 および IC の血漿中 TG の平均濃度は、それぞれ 252.3、266.3、322.8、360.4 mg/dl だった。各実験区間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$; Figure 2-3F) 。 Trmt-1、2、3 および IC の血漿中 TCHO の平均濃度は、それぞれ 238.9、249.1、238.8、248.6 mg/dl だった。各実験区間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$; Figure 2-3G) 。

Micro-CT による解析では、各実験区とも胚の脛骨に、骨の曲がりなどの形態的な異常は認められなかった (Figure 2-4) 。 Trmt-3 では、ミネラル沈着濃度の

高い領域が Trmt-1, 2 と比べて多かった。また、2次元のミネラル沈着濃度画像を用いた3次元解析でも、Trmt-3でミネラル沈着濃度の高い領域が増加していた。

Trmt-1, 2, 3 および IC の脛骨の長さの平均は、それぞれ 19.3 ± 0.3 、 18.6 ± 0.5 、 18.3 ± 1.1 、 24.3 ± 0.3 mm だった。IC の脛骨の長さは、Trmt-1, 2, 3 と比べて有意に長かった ($P < 0.05$; Figure 2-5A)。

Trmt-1 と 2 では、脛骨中央部断面の太さが、IC と比べて有意に細くなっていたが ($P < 0.05$)、Trmt-3 と IC では、有意差は認められなかった ($P > 0.05$; Figure 2-5B)。

Trmt-1, 2, 3 では、TV、BV、BS の値が IC と比べて有意に低くなった ($P < 0.05$) が、Trmt-1, 2, 3 の間では、有意差は認められなかった ($P > 0.05$; Figure 2-5C)。BS/BV は、IC と有意差が無かったのは、Trmt-3 だけであった ($P > 0.05$)。また、BV/TV は、IC と比べて Trmt-2 において有意に低くなった ($P < 0.05$; Figure 2-5C)。vBMD は、IC と比べて有意差が無かったのは Trmt-3 のみで ($P > 0.05$; Figure 2-5C)、17日目の胚の脛骨の vBMD は、乳酸カルシウムを添加することで有意に増加した。

4. 考察

通常のニワトリ胚の発生過程では、卵殻からのカルシウムや微量元素の吸収が最大となるのは、発生17日目前後であると報告されている (Tuan, 1983; Torres and Korver, 2018)。また、cSLCS において、培養21日でヒナが孵化す

るためには、胚の成長に伴う呼吸量の増加 (Zhang and Burggren, 2012) に対応するため、培養 17 日目から純酸素の添加が必要である (Tahara and Obara, 2014)。そこで、本研究では、乳酸カルシウムと酸素添加の相互作用による影響を避けるため、cSLCS において、乳酸カルシウムが培養 17 日目までの胚の生理・形態学的指標に及ぼす影響を検討した。

cSLCS において、ニワトリ胚を正常に発生させるためには、蒸留水と乳酸カルシウムの両方を添加する必要があると報告されている (Tahara and Obara, 2014)。cSLCS にて蒸留水を加えずに、乳酸カルシウムのみを添加した予備試験では、24 時間以内にほとんどの胚が発生を停止することが確認された (小原未発表)。このことから、乳酸カルシウムと蒸留水の効果は、個別に評価する必要があると考えられた。

実験の結果、Trmt-2 と 3 では、培養 3 日目から 9 日目の間に、有意に生存率が低下した ($P < 0.05$) が、Trmt-1 では、同期間に有意な生存率の低下は確認されなかった。この結果から、乳酸カルシウムと蒸留水が、両方ともニワトリ胚の発生初期に有害であることを示唆している。しかし、この結果は、cSLCS における培養 3 日目から 9 日目までの間の胚の生存率の減少はわずかであったという従来の報告 (Tahara and Obara, 2014) と矛盾している。このように、結果が一致しない理由は不明であるが、これらの研究における実験条件全般 (ニワトリ種、卵の大きさ、母鶏の健康状態、乳酸カルシウムのメーカーなど) が異なるためであると思われる。中でも、受精卵の由来は、cSLCS におけるこれらの研究の間で、胚の生存率が異なる大きな要因であると考えられ、例えば、

Tahara and Obara (2014)、Tahara *et al.* (2021) の両研究では、市販の受精卵が用いられたが、本研究では、家畜改良センター岡崎牧場から導入した MB 系統の母鶏による受精卵が使用された。

Trmt-3 では、培養 13 日目から胚の生存率が低下しはじめたが、Trmt-2 と 3 の間に、有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。生存率が低下した理由は不明であるが、培養初期に乳酸カルシウムや蒸留水の毒性による発生停止を免れた胚であっても、これらより受けた障害が徐々に成長に影響した可能性や、乳酸カルシウムや蒸留水の代謝の過程で何らかの障害が生じた可能性、培養容器のガス透過性や水分透過性が卵殻や卵殻膜と異なることに由来する問題などにより発生停止となった可能性が考えられた。本結果は、本研究における cSLCS の実験条件が、胚発生の重要な段階であるこの時期には適切ではなかったことを示唆している。しかし、cSLCS では、ヒナの孵化には乳酸カルシウムの添加が必要不可欠で (Tahara and Obara, 2014)、予備実験として、乳酸カルシウムを添加せずに 17 日目以降も培養を継続した場合、培養 20~21 日目に全ての胚が発生停止となった (小原未発表)。

次に、乳酸カルシウムの添加が、ニワトリ胚に及ぼす生理的な影響を調べるため、培養 17 日目に胚の主要な血漿成分を分析した。Ca 濃度は、Trmt-3 と IC の間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$) が、Trmt-1 と 2 では、IC より有意に低い値となった ($P < 0.05$)。この結果は、乳酸カルシウムが cSLCS 胚に吸収されたことを示しており、胚のカルシウムの動態について研究した従来の報告 (Tuan, 1980; Tuan and Ono, 1986) とも一致している。また、ウズラでの無

卵殻培養 (qSLC) でのニホンウズラの血液中 IP 濃度は、有卵殻培養の胚よりも高いことが報告されている (Tuan and Ono, 1986) が、本研究では、IC、Trmt-2、3 で、血漿中 IP 濃度に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。Ca と IP は、ともに胚の正常な発育に必須のミネラルであるため、この 2 つのミネラルの相互作用については、さらなる研究が必要である。

Trmt-3 と IC の血中 LDH 濃度には有意差は認められず ($P > 0.05$)、乳酸カルシウムの添加が胚の LDH 活性に影響することが示唆された。一方、カルシウムを添加していない cSLCS では、胚の LDH 活性が IC よりも高い傾向にあることが報告されている (Tuan and Ono, 1986)。このように、従来の報告と反対の結果となった理由は、今後明らかにする必要がある。LDH は、乳酸を糖新生のためのピルビン酸に、あるいは代謝のためのアセチル CoA に変換する逸脱酵素であり、体のほとんどすべての細胞に存在する (Nelson and Cox, 1993; 牧村, 1997)。乳酸カルシウムの添加は、cSLC 胚の LDH 活性を刺激する酵素カスケードに影響を与えた可能性があるかと仮定することができる。血液中の乳酸は、肝臓においてグリコーゲンに再合成されることから、予備試験として IC および cSLC における培養 17 日目の胚の肝臓の組織学的検査を行ったが、乳酸カルシウムに由来すると断定できるような所見は得られなかった (Figure 2-6)。

血漿中 AST 濃度は、Trmt-1 では IC に比べ有意に低かった ($P < 0.05$)。一般に AST 濃度は肝障害があると上昇し、ヒトでは主に肝機能の指標として用いられている。しかし、AST 値は一般的な正常範囲内と考えられたため、臨床的な

意味はないと考えた。GLU、TCHO、TG 濃度については、各実験区間で統計的に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

cSLC における乳酸カルシウム添加の骨形成への影響を評価するために、培養 17 日目における脛骨の形態を Micro-CT にて解析した。その結果、Trmt-3 では、形態的に正常な脛骨であることが確認された。さらに、Micro-CT 解析の結果、Trmt-3 は IC と vBMD に有意差はなかったが ($P > 0.05$)、Trmt-1 と Trmt-2 は IC と比較して有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。ニワトリ胚の骨ミネラル化は、発生 14 日目から 17 日目の間にかなり促進されることが報告されている (Yair *et al.*, 2012)。一方、cSLCS では外部からのカルシウム供給がないため、血中カルシウム濃度の低下に伴う胚の骨格異常が報告されている

(Jourdeuil *et al.*, 2015)。したがって、本研究における cSLC への乳酸カルシウムの添加は、培養 17 日目において形態的に正常な脛骨の発生に寄与していると考えられた。

一方、cSLC 胚では、脛骨長、TV、BV、BS といった量的指標が IC と比較してすべて有意に減少していた ($P < 0.05$)。qSLC 胚でも、胚のサイズがより小さいことが報告されている (Kamihira *et al.*, 1998)。cSLC では胚の発生が遅れることが、胚の大きさが小さくなる理由の一つと考えられている (Ono and Tuan, 1986)。抗てんかん薬であるフェノバルビタールを実験的に投与すると、軟骨細胞の増殖や骨ミネラル化の抑制を引き起こし、胎児の長骨が短くなることが報告されている (Yan *et al.*, 2016)。したがって、本研究で観察された正常な形態と密度を有する脛骨の発達が、量的指標において異常であること

は、cSLCS における軟骨細胞増殖に対する未同定の阻害因子の影響に起因する可能性があると考えられる。

最近、cSLC において、炭酸カルシウムをカルシウム源として添加することで、正常なヒナが孵化したという報告がされた (Tahara *et al.*, 2021)。乳酸カルシウムと炭酸カルシウムという 2 つの異なるカルシウム源による血中カルシウム濃度への影響、cSLC におけるミネラル代謝や骨形成への影響については、今後の研究でさらに評価する必要がある。

これらのことから、cSLC で乳酸カルシウムを添加すると、発生中のニワトリ胚の骨形成を正常に近づけるが、特に培養 5~7 日目の胚の生存率に悪影響を与えることが示唆された。

図表



Figure 2-1. Outlook of chick shell-less culture system (cSLCS).

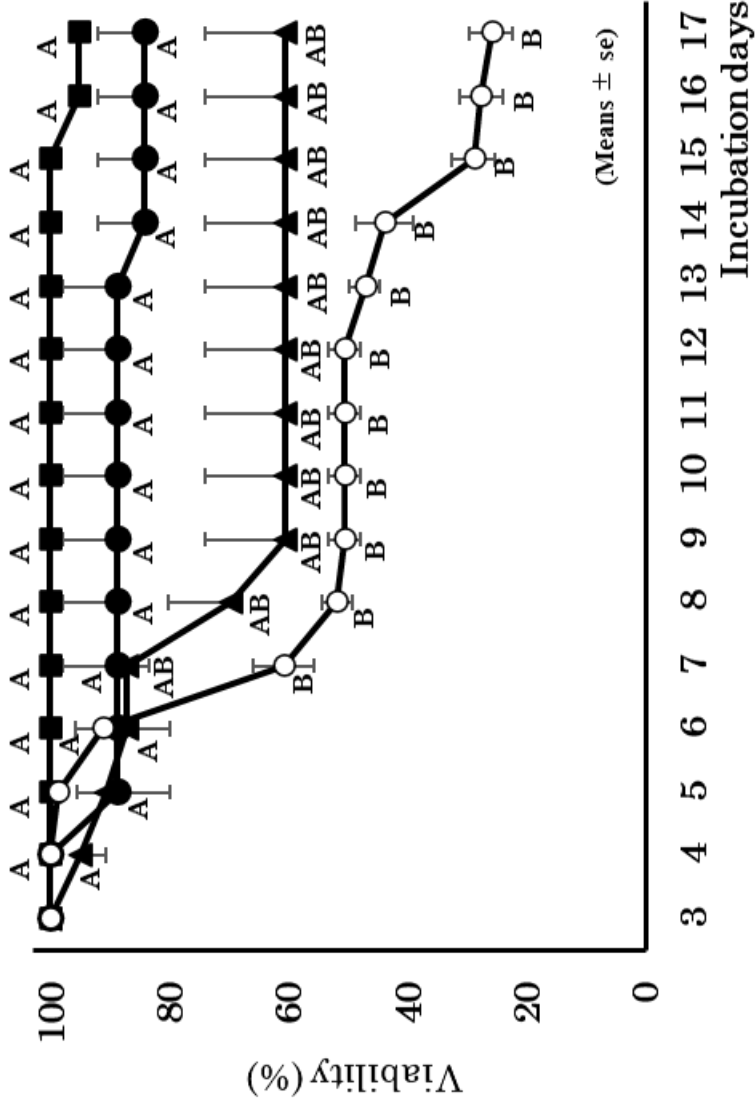


Figure 2-2. Viability of cultured embryos at day 17 of incubation.

■: Intact control (n=21 embryos), ●: Treatment-1 (n = 23 embryos), ▲: Treatment-2 (n = 23 embryos), ○: Treatment-3 (n = 47 embryos).

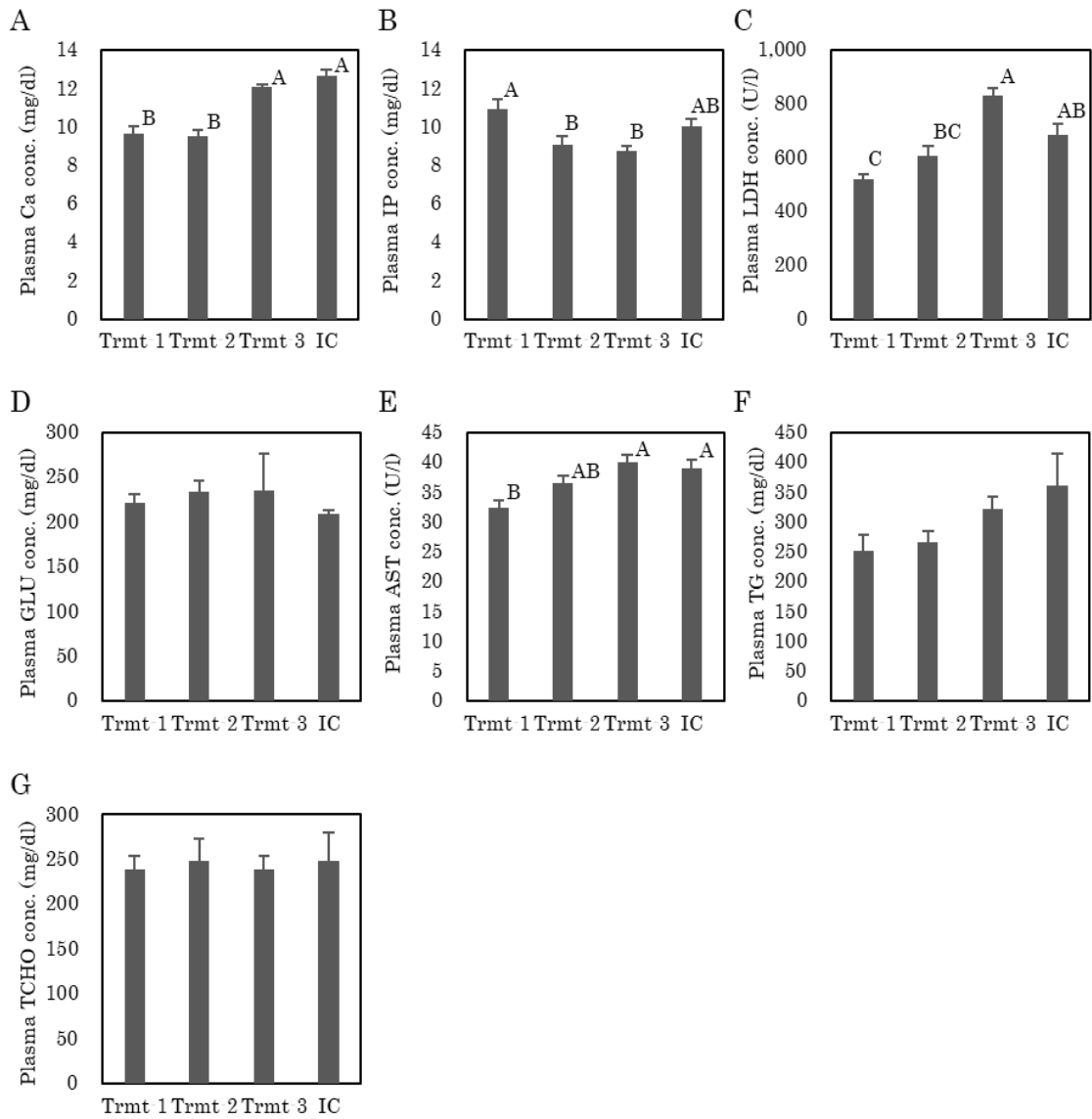


Figure 2-3. Concentrations of representative plasma components at day 17 of incubation.

Abbreviations. Ca, calcium; IP, inorganic phosphate; LDH, lactic acid dehydrogenase; GLU, glucose; AST, aspartate aminotransferase; TG, triglyceride; TCHO, total cholesterol.

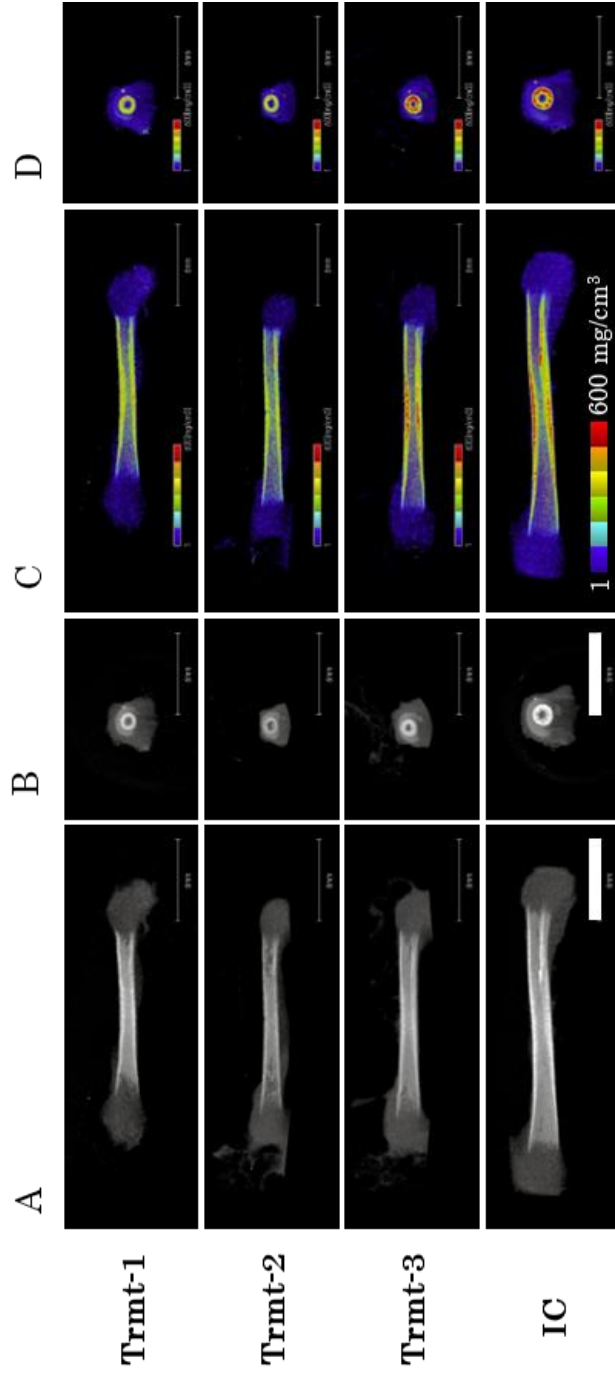


Figure 2-4. Micro-CT images of embryonic tibia at day 17.

A and B: Two-dimensional micro-CT images (scale bar = 6 mm).

C and D: Two-dimensional mineral density images.

A and C: Side sections of a whole tibia.

B and D: Cross sections at the midpoint of the tibia.

Gradient color scales in Fig. C and D indicate bone mineral density, where blue represents the lowest mineral density (1 mg/cm³), followed by light blue, green, yellow, and orange representing mineral density values in ascending order, and red representing highest mineral density (600 mg/cm³).

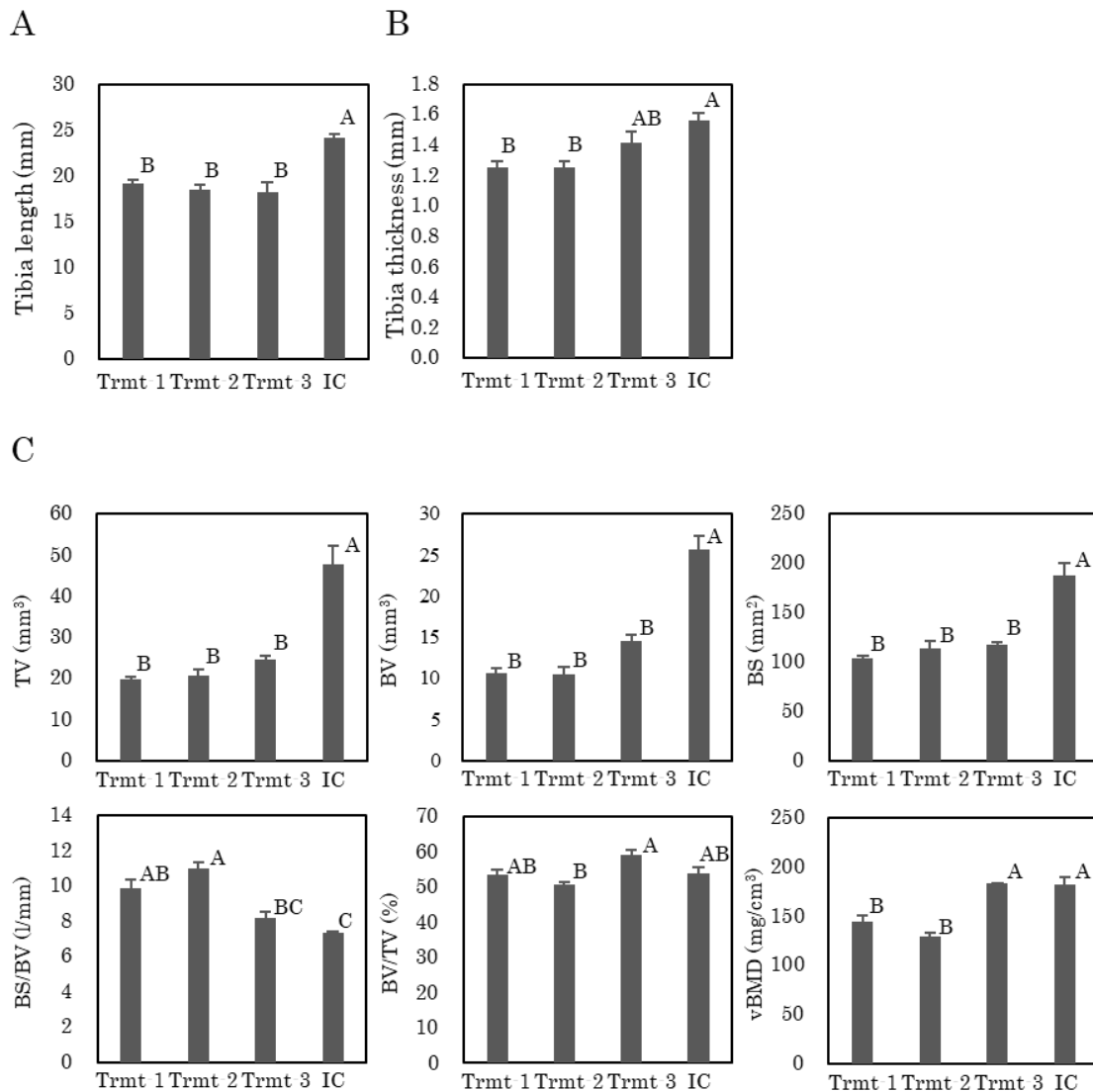


Figure 2-5. Quantification of physical properties of tibia at day 17 using micro-CT analysis.

A, Tibia length; B, Tibia thickness at the midpoint of long axis.

Abbreviations. TV, tissue volume; BV, bone volume; BS, bone surface area;

BS/BV, bone surface area per bone volume; BV/TV, bone volume per tissue volume; vBMD, volumetric bone mineral density.

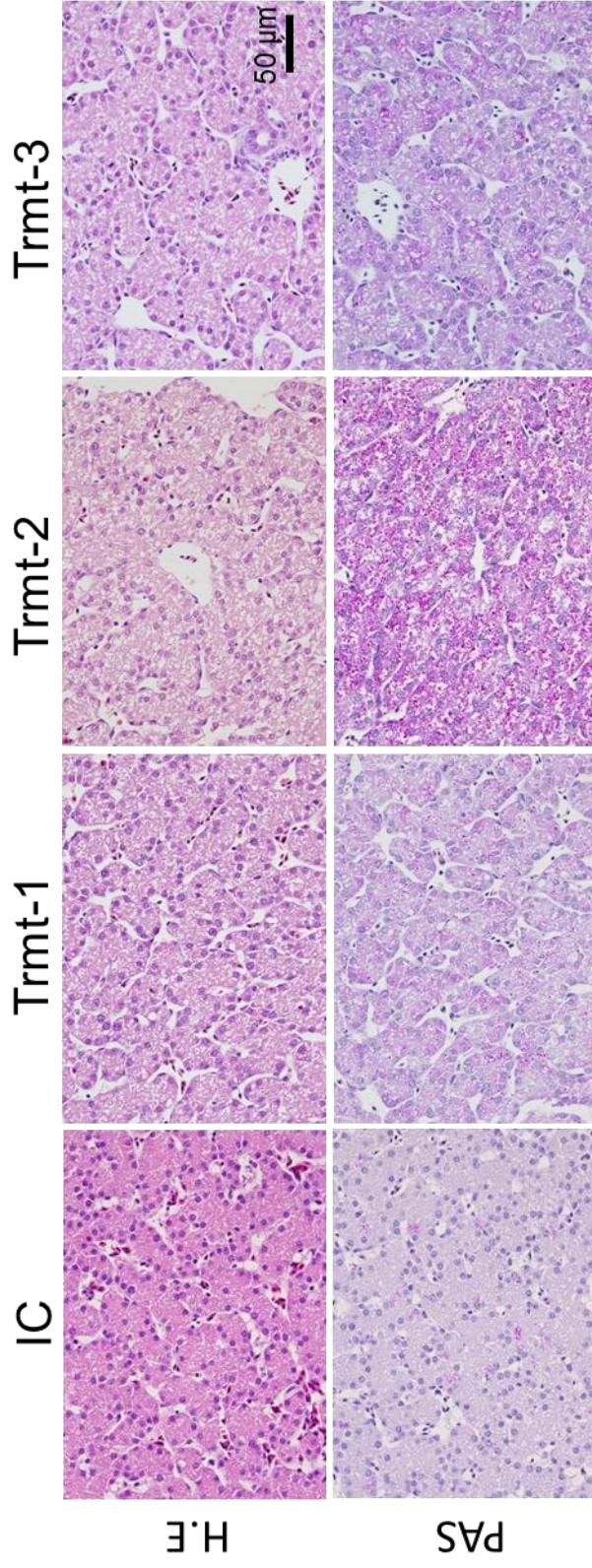


Figure 2-6. Histopathological images of chick embryonic liver at day 17 of culture in cSLCS.

Even though hepatic glycogen tended to be higher in Trmt-2, no hepatic histological findings in suspected liver disorder were observed in all treatments.

H.E, Haematoxylin-eosin stain. PAS, Periodic acid-Schiff reaction.

第3章 cSLCS における培養 17 日目以降の純酸素添加が培養 19 日目までのニワトリ胚に及ぼす影響

1. 目的

cSLC でヒナを孵化させるために、純酸素を添加する必要があると考えられたのは、酸素を添加せずに培養した胚が孵化に至らず、病理組織学的に酸素欠乏を疑わせる腎臓病変が認められたことからであった（未発表データ）。実験的にニワトリ胚を低酸素環境で培養すると、成長が遅れたり、死亡率が上昇すると報告されている（Lourens *et al.*, 2007; Zhang and Burggren, 2012）。さらに、低酸素は哺乳類胎児の腎臓の発達に悪影響を及ぼすと報告されている

（Wilkinson *et al.*, 2015）。しかし、cSLC 胚の発生に対する酸素添加の影響は、これまで評価されてこなかった。そこで、本研究では、cSLC において培養 17 日目から開始する酸素添加の影響を検証することとした。

2. 材料と方法

受精卵

実験には、第2章と同様の白色レグホーン種（MB line）を用い、同様の条件で飼育、受精卵を得て保存し、実験に使用した。本研究は、筑波大学動物実験取扱規程に基づき、筑波大学動物実験委員会の承認（承認番号：21-435）を得て実施した。

培養容器

培養容器は、第 2 章で用いられた容器を同一のものを用い、側面に開けられた直径 2 cm の穴から、直径 2 mm のプラスチックチューブ（アトム多用途チューブ，アトムメディカル（株），東京）を挿入して酸素供給を行った（Tahara and Obara, 2014）。

胚培養

胚は、インキュベーター（P-008，（株）昭和フランキ，埼玉）を用いて、従来の報告と同様に、HH15～16 のニワトリ胚を、PMPF に粉末乳酸カルシウム（Cat #:031-00675，富士フイルム和光純薬（株），大阪）250 mg と滅菌蒸留水（2.5 mL）を加えた培養容器に移して培養した（Tahara and Obara, 2014）。培養 17 日目に、胚を次の 2 つの実験区に無作為に振り分けた。

Trmt-1：大気圧下の cSLC

Trmt-2：Tahara and Obara（2014）に準じ、約 500 mL/h の流量で酸素供給を行

う cSLC

IC：殻を割らずに通常の状態（温度 37.8°C、相対湿度 70%）で培養した受

精卵

培養 19 日目に、胚の漿尿膜にある太い血管から約 0.5 mL の血液を採取して血漿を分離し、Ca、IP、LDH、GLU、AST、TG および TCHO 濃度を臨床用生化学自動分析装置（DRI-CHEM V4000，富士フイルム（株），東京）で測定した。

経皮的動脈血酸素飽和度の測定

培養 17 日目および 19 日目に、胚を無作為に選び、反射型センサー付き動物用パルスオキシメーター（Ani-Pal, (株) キムラメド, 東京）を用いて、胚の背面から経皮的動脈血酸素飽和度（SpO₂）を測定した（Figure 3-1）

病理組織学的検査

採血を行った後、各実験区につき、3 個体の胚を無作為に選び、10% 中性緩衝ホルマリン液（Cat #:062-01661, 富士フイルム和光純薬（株）, 大阪）にて固定した。固定後、腎臓をパラフィンに包埋し、5 μm の組織切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。切片は、光学顕微鏡（Nikon Eclipse Ni, (株) ニコン, 東京）にて観察した。切片中の腎尿細管病変は、変性した腎尿細管の割合（pRTD）により、次のように分類した。

グレード 1（軽度）：pRTD < 25 %

グレード 2（中等度）：25% < pRTD < 49 %

グレード 3（高度）：50% < pRTD

統計学的処理

生存率は、フィッシャーの正確確率検定を用いて解析した。各データは Bartlett 検定を用いて等分散性を検定した。血漿成分および SpO₂ データで等分散性のあるものは、一元配置分散分析に続いて Tukey の検定を用い、等分散性のないものはノンパラメトリック検定である Kruskal-Wallis 検定を用いて統計

解析を行った。また、血漿中 IP 濃度と TCHO 濃度の間のピアソンの相関係数を算出した。有意差は $P < 0.05$ とした。

3. 結果

培養 17 日目で生存していた胚のうち、培養 19 日目に生存していた胚は、Trmt-1 で 81.0%、Trmt-2 で 94.3 % だった。各実験区間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

培養 17 日目における cSLC 胚と IC の平均 SpO₂ はそれぞれ 76.6% と 93.4%、培養 19 日目における平均 SpO₂ は、Trmt-1、2、IC でそれぞれ 87.8%、90.2%、96.0% だった (Figure 3-2)。Trmt-1 と 2 の間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

培養 19 日目における Trmt-1、2 および IC の平均血漿 Ca 濃度は、それぞれ 10.9, 10.5, 12.8 mg/dL であった。Trmt-1 および Trmt-2 における Ca 濃度は、IC に比べ有意に低かった ($P < 0.05$; Figure 3-3A)。Trmt-1、2 および IC の平均血漿 IP 濃度は、それぞれ 12.0, 13.5, 6.0 mg/dL で、両実験区は IC と比べ、有意に高かった ($P < 0.05$; Figure 3-3B)。Trmt-1、2 および IC における平均血漿 LDH 濃度は、それぞれ 771.6、744.5、528.3 U/L、平均血漿 GLU 濃度は、それぞれ 229.0、268.3、206.2 mg/dL、平均血漿 AST 濃度は、それぞれ 53.6、51.8、43.7 U/L、平均血漿 TG 濃度は、それぞれ 280.9、262.4、217.0 mg/dL だった。平均血漿 LDH、GLU、AST、TG 濃度については、各実験区間で有意差は認められなかった (全て $P > 0.05$; Figure 3-3C-F)。Trmt-1、2 および IC における平

均血漿 TCHO 濃度は、それぞれ 514.9、531.9、261.5 mg/dL で、Trmt-1 および 2 における TCHO 濃度は、IC より有意に高かった ($P < 0.05$; Figure 3-3G)。

Figure 3-4 では、腎尿細管の病変と各実験区における病変の程度を pRTD で示した。IC では、主な尿細管病変は認められなかった (Figure 3-4Aa)。また、尿細管上皮細胞では、軽度の空胞化 (Figure 3-4Ab, 矢頭) が認められたが、正常範囲内であると判断された。一方、Trmt-1 および Trmt-2 では、尿細管内腔の拡張 (Figure 3-4Ac, アスタリスク)、細胞質内の顆粒形成 (Figure 3-4Ad, 矢印)、核濃縮 (Figure 3-4Ae, 矢印) が認められた。各実験区における 3 つの代表的な切片から、Trmt-1、2 では、IC に比べ、pRTD が高い傾向になることが明らかとなった (Figure 3-4B)。

Figure 3-5 に、血漿中 IP 濃度と TCHO 濃度の関係を示した。IC の 6 個体の胚の血漿中 IP および TCHO 濃度は、それぞれ、7.8 mg/dL 以下、394 mg/dL 以下であった (Figure 3-5C)。これらの値を正常胚における上限値と仮定し、Figure 3-5 に点線で示した。Trmt-1、2 および IC における IP 濃度と TCHO 濃度の相関係数は、それぞれ 0.741、0.829、-0.26 だった。Trmt-1 および 2 における IP と TCHO 濃度は、有意に相関していた ($P < 0.05$) が、IC では、有意な相関は認められなかった ($P > 0.05$)。

4. 考察

cSLC において、正常なヒナが孵化するためには、培養 17 日目から酸素添加を行う必要がある (Tahara and Obara, 2014)。しかし、cSLC における酸素添加

が、その後の胚発生に及ぼす影響については、これまで検証されてこなかった。そこで、培養 17 日目から開始した酸素添加が、cSLC におけるその後の胚発生に及ぼす影響を検討した。

その結果、Trmt-1 と 2 では、培養 17 日目と 19 日目における生存率と血液生化学検査の各結果に、有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。しかし、IC と比較して、Trmt-1 および 2 では、血漿 IP および TCHO 濃度が有意に増加し ($P < 0.05$)、血漿 Ca 濃度は有意に減少した ($P < 0.05$)。第 2 章では、IC と培養 17 日目における cSLC 区の胚の間で、血漿 Ca、IP、TCHO 濃度に有意差は認められなかった。従って、Trmt-1 および 2 では、17 日目から 19 日目にかけて血漿中の IP、Ca、TCHO 濃度が増加したものと推察された。

ヒトでは、腎機能障害により、血中の IP 濃度が増加すると、血漿中の Ca と結合するため、低カルシウム血症となることが知られている (Lumeij, 2008)。また、高コレステロール血症は、腎機能障害をはじめ、様々な病態下において認められる (Vaziri, 2016)。私達が知る限り、鳥類の発生途中にある胚において、腎機能を評価する方法は確立されていない。そのため、血液生化学検査と病理組織学的解析に基づいて cSLC 胚の腎機能評価を行うことが必要不可欠であった。一般に、酸素欠乏は、直接腎臓尿細管に影響し、酸素欠乏性急性尿細管壊死 Hypoxic acute tubular necrosis を引き起こす。また、同時に酸素欠乏は、心機能低下によるうっ血性心不全を引き起こす。これにより、心拍出量は低下し、さらなる尿細管壊死が起こる。このため、腎臓の病理学的評価は、酸素欠乏の指標として用いることができると考えた。

正常なニワトリ胚では、胚発生 12 日目に後腎が発生し始め、中腎は 15 日目に退化し始める (Narbaitz and Kacew, 1978; Bolon and Burggren, 2013)。そこで、培養 17 日目に開始した酸素添加が胚の腎臓に及ぼす影響を、培養 19 日目に胚の後腎の組織標本を作製して評価した。その結果、cSLC の Trmt-1 (Figure 3-4Bf-h)、Trmt-2 (Figure 3-4Bi-k) の両実験区とも培養 19 日目で腎尿細管の変性が認められ、腎機能の低下が示唆された。鳥類における腎機能障害時の血漿 IP と Ca 濃度の関係はよく分かっていない。もし、ヒトにおける血液中のこれらの濃度変化と腎機能障害の関係を鳥類のそれにあてはめることができれば、培養 17 日目から 19 日目の間の IP と Ca 濃度の変化も鳥類における腎機能障害を反映している可能性がある。

注目すべき点として、Trmt-1 (Figure 3-5A) と 2 (Figure 3-5B) の両方で、血漿中 IP 濃度と TCHO 濃度の間に有意な相関性が認められたことである。IC の最大 IP 濃度と最大 TCHO 濃度を用いて、IC を第 3 象限にプロットすると

(Figure 3-5C)、Trmt-1 (Figure 3-5A) では、56% (5/9)、Trmt-2 (Figure 3-5B) では、73% (8/11) の胚が第 1 象限に分けられることが明らかとなった。

各実験区の代表的な 3 つの胚のうち、Trmt-1 の 2 個体 (Figure 3-4Bh, g)、Trmt-2 の 1 個体 (Figure 3-4Bk) の血漿 IP 及び TCHO 濃度は第 1 象限であり、これらの胚の組織学的評価はグレード 3 とされた (Figure 3-4B)。また、Trmt-2 の 2 つの胚 (Figure 3-4Bi, j) は、第 4 象限にあり、これらの胚の組織学的評価もグレード 3 と判定された (Figure 3-4B)。これらより、血漿中 IP 濃度と TCHO 濃度は、発生途中のニワトリ胚における腎機能障害の指標として用いる

ことができる可能性が示唆された。今後、血液学的な指標と発生途中のニワトリ胚の生理学的な状態との関係を解析する必要があるだろう。

培養 17 日目の cSLC 胚では、SpO₂ が IC に比べ低い傾向にあり、胚がすでに酸素欠乏状態であることが示唆された。酸素供給開始 3.5 時間後には、漿尿膜に分布する血管が鮮やかな赤色となり、胚の赤血球中のヘモグロビンが酸化していることが示唆された (Figure 3-6)。

培養 19 日目胚の SpO₂ の平均値は、Trmt-2 で高くなったが、数値にばらつきがあり、標準誤差 (SE; Figure 3-2) が大きくなった。なぜばらつきが大きくなったのかは不明であるが、培養容器の形状のわずかな違い、PMPF の小さな皺、培養容器内の胚の向きや位置、胚のサイズの違いなど、様々な原因により、それぞれの胚の酸素吸収率が異なるのではないかと推察された。なお、酸素添加を行わなかった Trmt-1 においても、培養 19 日目の SpO₂ は、17 日目の SpO₂ よりも高い傾向にあった。しかし、培養 19 日目の SpO₂ は、生存している胚のみで測定したため、今回の結果は、培養 17 日目から 19 日目にかけて SpO₂ が低い胚が発生停止となり、除去されたことを反映していると考えられた。

鳥類では、漿尿膜から肺へのガス交換の移行、すなわち、肺呼吸への移行は、孵化前の胚のくちばしが漿尿膜を突き破り、気室に到達したときに始まる。一方、無処置の有卵殻のニワトリ胚では、肺呼吸への移行は培養 19 日目前後に始まる (Rahn *et al.*, 1979; Burton and Tullett, 1985)。cSLC では、肺呼吸への移行開始前の培養 17 日目前後から胚の生存率が低下し始める (Tahara and Obara, 2014)。本研究では、胚の SpO₂ の平均値の SE は、IC に比べ培養 17 日

目の cSLC で大きくなった。また、培養 19 日目における Trmt-1、2 と IC の間でも同様のことが観察された。これらのことから、培養 17 日目において SpO₂ が高い胚は培養 19 日目まで生存できるが、培養 17 日目の cSLC で SpO₂ が低い胚は、腎尿細管病変を伴う低酸素症を発症すると仮定した。この仮説を検証するためには、cSLC から胚を取り出すことなく、培養を継続したまま SpO₂ を測定する方法の考案が必要である。

今後、cSLC での胚の生存率と孵化率を向上させるためには、酸素添加開始のタイミングや添加方法、添加量を最適化するための研究が必要である。

図表



Figure 3-1. SpO₂ measurement of an embryo cultured in a cSLC using a pulse oximeter on day 19 of culture.

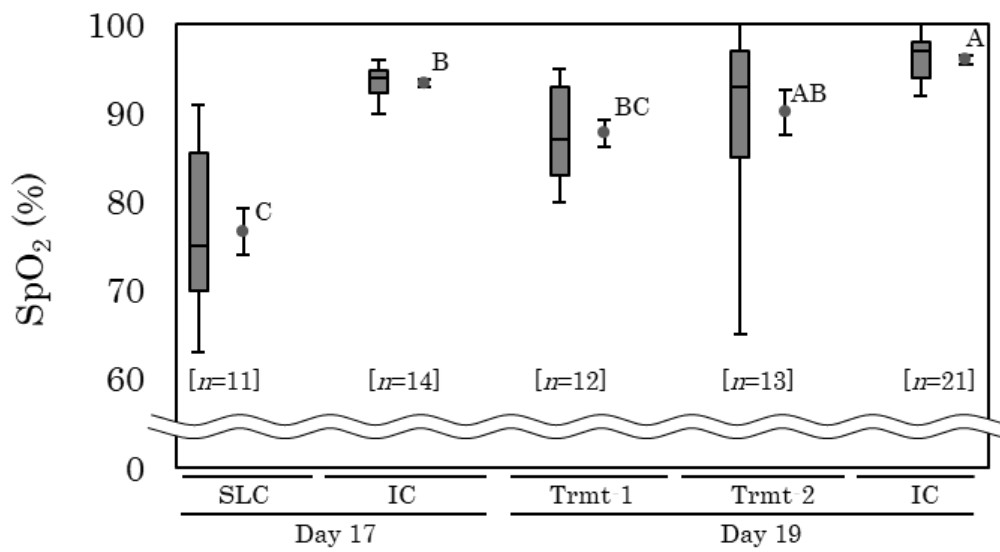


Figure 3-2. SpO₂ of cSLC embryos.

Two different methods were used to describe the SpO₂ values for each treatment group: box plots (left) and the mean \pm standard error (right). In the box plots, the top and bottom of the box indicate the 75th and 25th percentiles, respectively; the horizontal bar in the box denotes the median value; and the top and bottom whiskers are the maximum and minimum values, respectively.

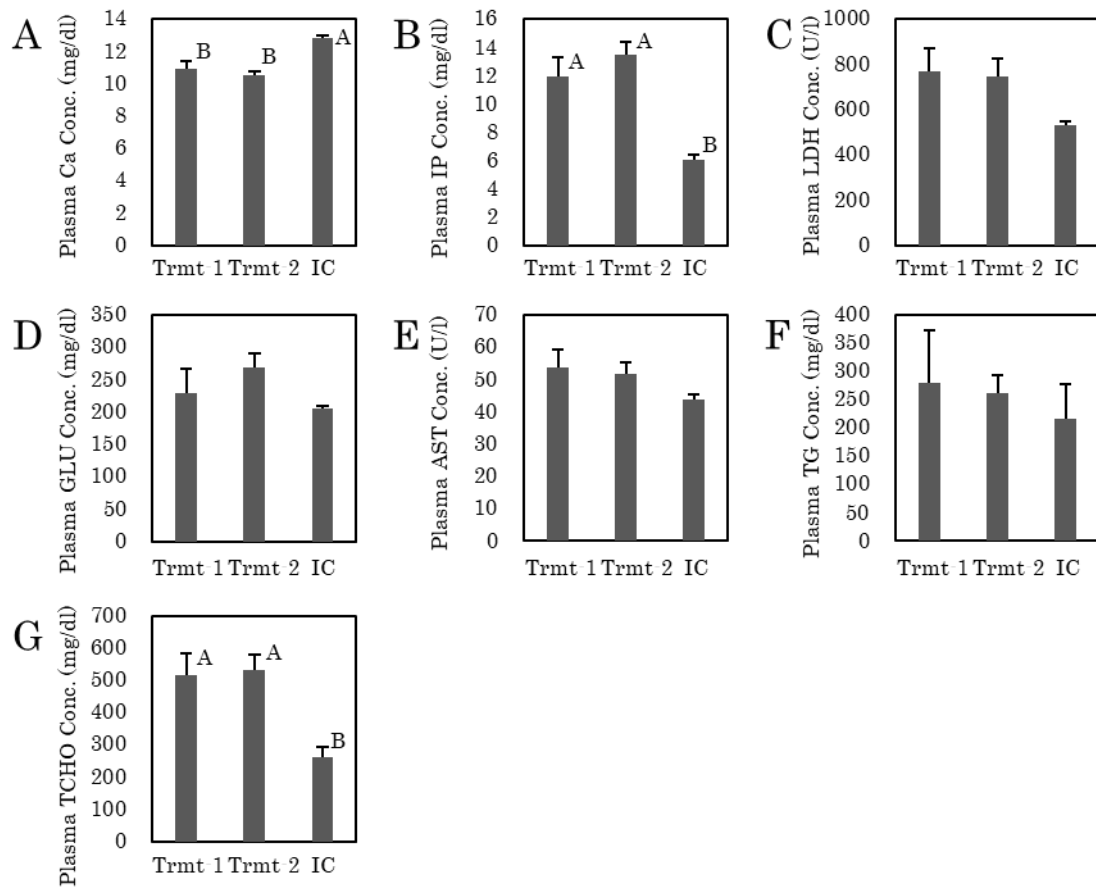
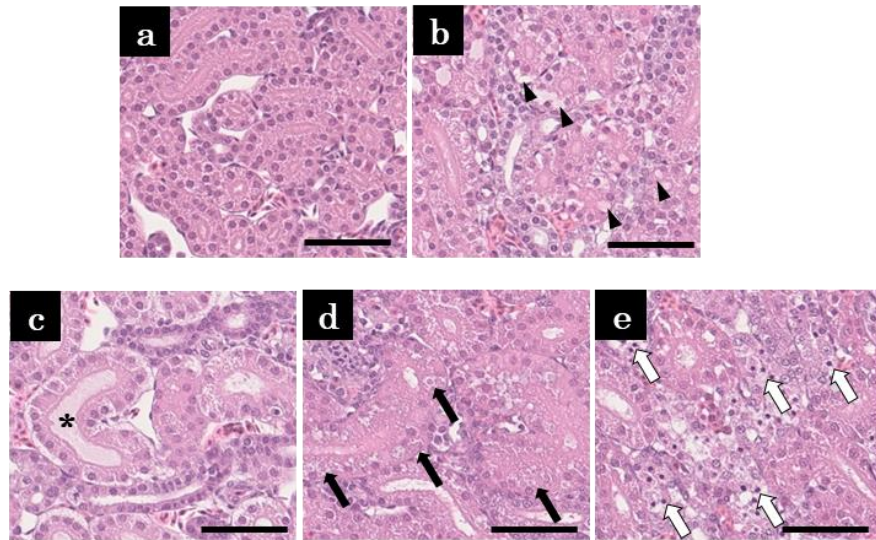


Figure 3-3. Plasma biochemical concentrations.

The average plasma concentrations of Ca, IP, LDH, GLU, AST, TG, and TCHO at day 19 of culture, respectively. Abbreviations: SLC, shell-less culture; IC, intact control; Trmt-1, SLC without oxygen supply after day 17 of culture (D17); Trmt-2, SLC with oxygen supply after D17; Ca, calcium; IP, inorganic phosphorus; LDH, lactate dehydrogenase; GLU, glucose; AST, aspartate aminotransferase; TG, triglyceride; TCHO, total cholesterol

A



B

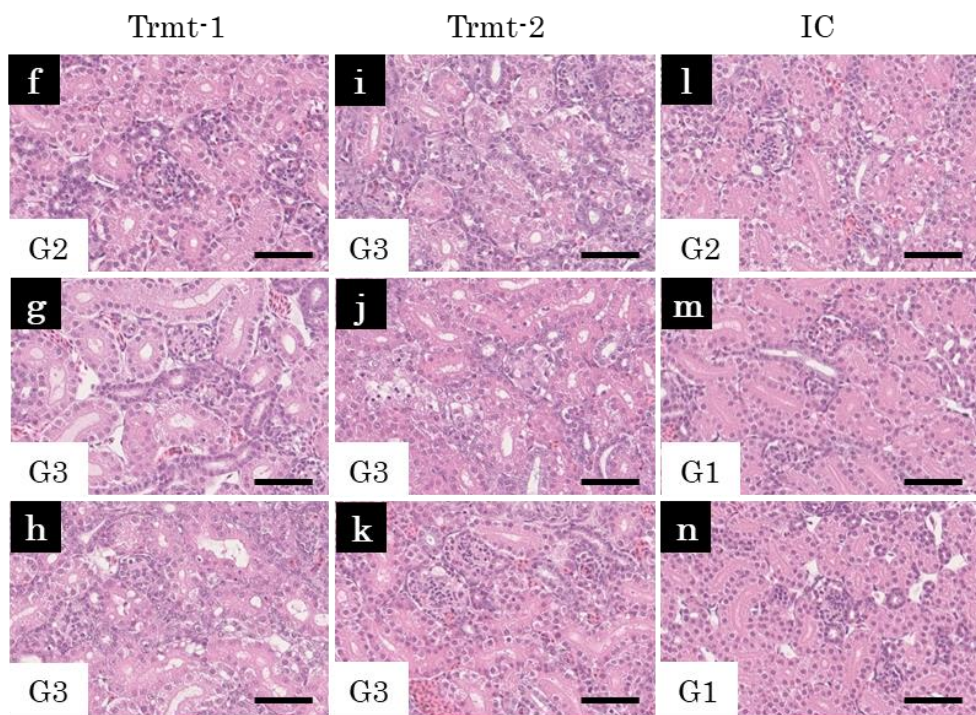


Figure 3-4. Histopathological images of chick embryonic kidneys at day 19.

A. a) Normal tubular structures in the intact control; b) vacuolated renal tubular epithelial cells (arrowheads); c) dilated tubular lumens (asterisk); d) formation of cytoplasmic granules (black arrow); e) pyknotic nuclei (white arrow). Scale bar = 50 μ m.

B. Kidney sections of three representative samples for the Trmt-1 (f–h), Trmt-2 (i–k), and IC (l–n) groups. Pathological grades are shown at the bottom left. Scale bar = 50 μ m.

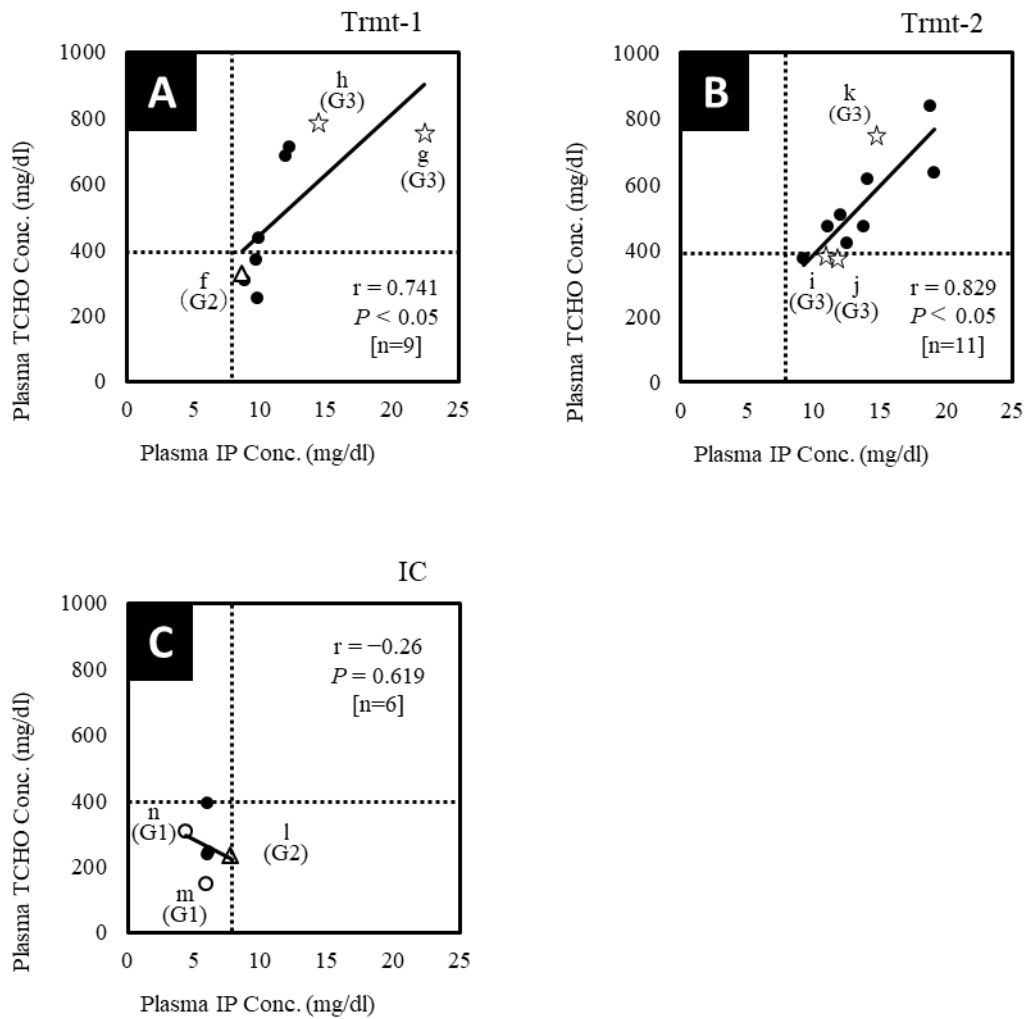


Figure 3-5. Relationship between the plasma IP and TCHO concentrations

The plasma IP and TCHO concentrations of representative embryos from the Trmt-1 (f–h), Trmt-2 (i–k), and IC (l–n) groups associated with metanephros pathological grade 1 (○), 2 (△), and 3 (☆). Linear regression lines are shown. Maximum IP (7.8 mg/dL) and TCHO (394 mg/dL) concentrations observed in the IC are shown as a vertical and horizontal dotted lines, respectively.

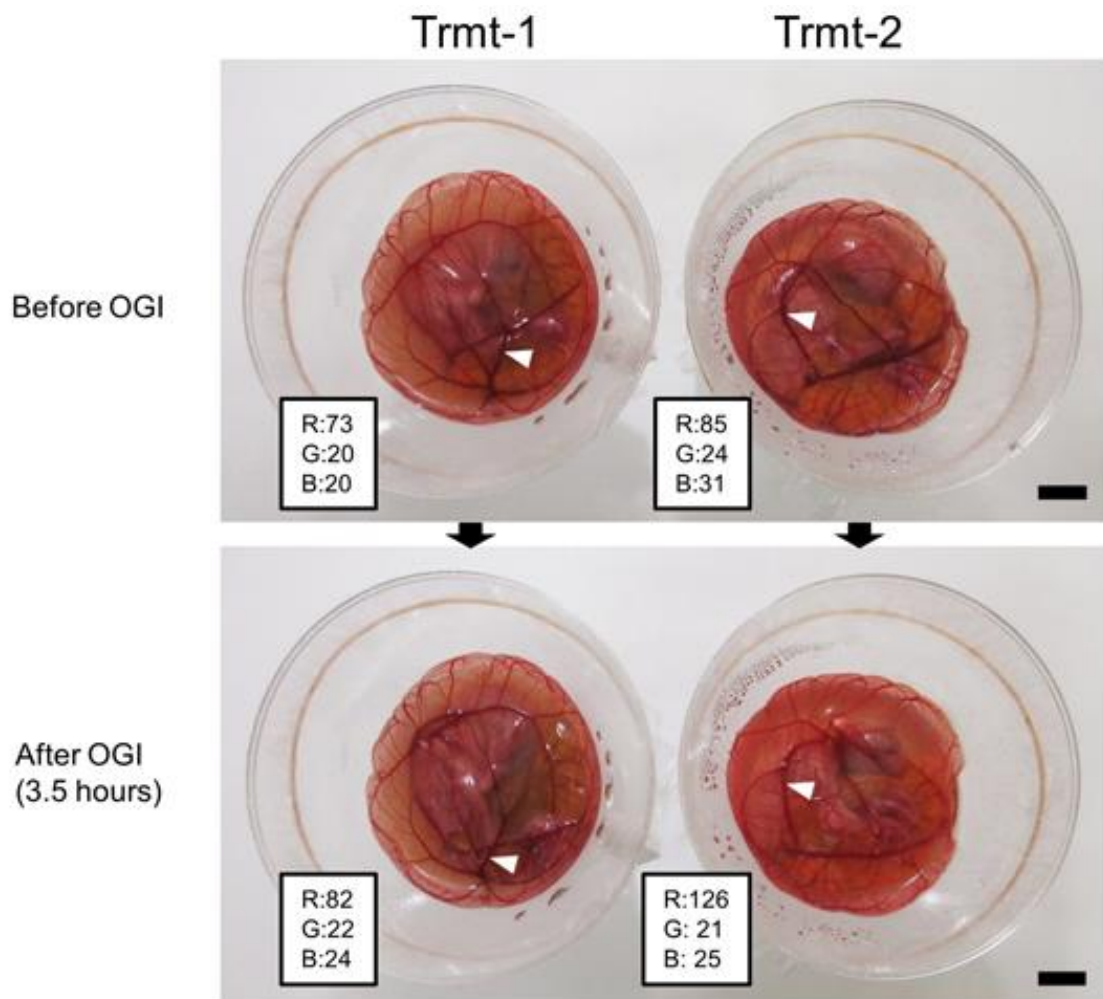


Figure 3-6. Color of the blood vessel network in the chorioallantoic membrane in embryos on day 17 before and after oxygen gas injection.

Left, Trmt-1 (cSLC without oxygen gas injection; OGI); right, Trmt-2 (cSLC with OGI). These images were taken immediately after the lids were removed. The RGB values indicate the color of blood vessels in the area shown by the arrowheads. The RGB values are the average of a 5×5 pixel area. Image analysis was performed on Adobe Photoshop Elements 14 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). Scale bar = 1 cm.

第4章 総合考察

1. 卵殻及び卵殻膜の機能と人工容器の関係

鳥類卵の卵殻は、炭酸カルシウムを主成分としており、胚へのカルシウムの供給源となるほか、胚を様々な物理的要因から保護して乾燥した陸地での胚発生を可能にするための重要な構造物である。また、卵殻には、気孔と呼ばれる直径 10~30 μm の微少な穴が開いており、水分子およびガスは通過できるため、胚の生存に必要な呼吸を可能とする（加藤, 1998）。

一方、卵殻の内側には、厚さ約 70 μm のタンパク質の繊維を主成分とする内外 2 層の卵殻膜があり、胚の漿尿膜を介したガス交換や、水分の保持に参与していると考えられている（加藤, 1998）。

cSLCS では、胚を培養容器に移し替える際に、卵殻及び卵殻膜が除去される。そのため、胚発生を進めるためには、両者の機能を代替する必要がある。

本研究においては、胚に接する卵殻膜の代替として市販の透明なポリメチルペンテン製食品用ラップ（PMPW）を半球状に引き延ばして加工したフィルム（PMPF）を用いた。この PMPW は、他の市販ラップ（ポリエチレン製やポリ塩化ビニリデン製）と比較して酸素透過性に優れているという特徴を有する（ $8.0 \times 10^{-10} \text{ mol/m}^2 \text{ SPa}$; Tahara and Obara, 2014）。

本研究においては、孵卵 3 日胚を割卵し、卵内容物を PMPF に移し替え、胚と卵白を側面から底部にかけて覆うことにより、卵殻膜が担っている 1) 胚を支えること、2) 乾燥から守ること、3) ガス交換を行うことという 3 大機能を代替した。

一方、通常の有卵殻卵を孵卵した場合には卵殻膜を通して卵殻に含まれているカルシウムが胚に供給されるのに対し、cSLCS においては PMPF を経由したカルシウムの供給が無い場合、カルシウムを人為的に供給する必要がある。さらに、本研究で用いた cSLCS においては、胚を孵化させるためには、培養 17 日目以降に純酸素の添加を行う必要がある (Tahara and Obara, 2014)。

以上の通り、cSLCS においては有卵殻卵における卵殻および卵殻膜の機能をどのように代替するかが重要となる。一般に有卵殻卵を孵卵した場合、孵化率は 90% 以上で安定しているのに対し、本研究で用いた cSLCS で孵卵 3 日胚を培養した場合、有卵殻卵を孵卵した場合と比べて培養開始 3 日以内の胚死亡（前期死亡）率および孵化予定日前の数日間の胚死亡（後期死亡）率が高い。そのため、現在の cSLCS では、胚の発育に必要な卵殻と卵殻膜の機能が十分に代替されていない可能性が高い。

そこで、本研究においては、cSLCS における孵化率の向上を目指した研究の一環として、前期胚死亡および後期死亡に影響する要因について検討することを目的とした。

2. cSLCS における乳酸カルシウムがニワトリ胚の成長に与える影響

第 2 章では、現在の cSLCS における前期胚死亡に関与している可能性がある乳酸カルシウム添加の影響について検討した。本研究で用いた cSLCS においては、PMPF の底部に水と乳酸カルシウムを添加した後に孵卵 3 日胚の卵内内容物を PMPF に移し替えた。有卵殻卵における卵殻カルシウムは、胚の成長に伴い

骨形成に利用されることが知られている (Tuan and Ono, 1986)。従って、本来であれば cSLCS においても培養開始後の適切な時期にカルシウムを添加するのが理想であるが、培養中の胚は極めて繊細であり、わずかな変化に敏感に反応して発生を停止する。従って、本研究における cSLCS においては Tahara and Obara (2014) に準じ、孵卵 3 日胚の内容物を水と乳酸カルシウムを添加した PMPF に移し替える方法を採用した。本研究の結果から、蒸留水および乳酸カルシウムの添加は胚を孵化させるために必要であるものの、前期胚死亡を増加させる要因になっていることが明らかになった。また、本研究において、蒸留水が胚の生存率に影響を与えたメカニズムは明確ではないが、蒸留水により、卵白の成分が希釈され、胚との間の浸透圧差や電解質差が生じ、生存率に影響を与えた可能性が考えられる。しかし、第 2 章で述べたとおり、蒸留水を加えずに乳酸カルシウムのみを加えた場合は、高い確率で培養初期に胚が発生停止になることから、蒸留水は胚への毒性がある一方で、乳酸カルシウムの毒性を緩和する効果があることが示唆された。

一方で、乳酸カルシウムが胚に吸収される経路や、吸収された乳酸カルシウムに由来する乳酸またはその代謝物が胚に及ぼす影響については明らかではない。有卵殻卵での孵卵の場合、胚は漿尿膜により、卵殻膜を介して卵殻からカルシウムを吸収している。また、カルシウムの吸収は、漿尿膜が発達する孵卵 10 日目頃から始まると報告されている (小野, 2014)。しかし、cSLCS においては、漿尿膜が接している PMPF に卵殻の主成分である炭酸カルシウムは含まれておらず、PMPF の外側にも卵殻に該当する構造物は接していない。そのた

め、胚は、本来のカルシウム吸収とは異なる原理によりカルシウムを吸収する必要がある。cSLCS では、胚へカルシウムを供給するために乳酸カルシウムを培養容器内に添加したが、乳酸カルシウムが濃度勾配により漿尿膜から胚に吸収されるのか、他に乳酸カルシウムを取り込む経路が存在するのかは不明である。また、胚に吸収された乳酸カルシウムに由来する乳酸においても、その代謝、排泄については不明である。これらは、cSLCS における胚の成長に影響する要因として今後検証が必要であると考えられる。

3. cSLCS における酸素添加がニワトリ胚の成長に与える影響

cSLCS において胚を正常に発育させるためには、培養 17 日目以降孵化までの間、外部から酸素を添加し続ける必要があることが報告されている (Tahara and Obara, 2014)。酸素は、培養容器のプラスチックカップに開けた穴から、カップと PMPF の間にプラスチックチューブを通して添加されている。添加された酸素は、PMPF を通して胚の側面の漿尿膜により、または、PMPF 上部に開けられた小さな通気孔から容器内に分布した酸素が、胚の上面に分布する漿尿膜により胚に吸収され、肺呼吸開始後は、肺呼吸により直接胚に取り込まれる。

本研究では、肺呼吸が始まる直前（培養 17 日目から 19 日目）における胚への純酸素添加の影響を検証した。その結果、培養 19 日胚における SpO₂ の改善が認められた。しかし、本研究の結果、酸素添加を開始する培養 17 日目の時点で、すでに多くの胚は酸素不足に陥っていることが明らかになったことか

ら、cSLCS における酸素の条件を再検討する必要があることが明らかになった。

また、卵殻には多くの気孔があり、酸素、二酸化炭素等のガスおよび水分子などが通過できることが知られている。さらに、卵殻膜及び卵殻は、孵卵 10 日目において、酸素透過性が放卵直後に比べ約 10 倍になると報告されている (Lomholt, 1976)。現在の cSLCS においては酸素の添加を必要としていることから、PMPF のガス透過性は、卵殻膜よりも低いと考えられた。一方、cSLCS において PMPF を支持しているプラスチックカップの側面には、直径約 2 cm の穴が開けられているが、脱脂綿で栓がされており、卵殻と比べて通気が悪い可能性がある。

cSLCS で用いている PMPF は、現在、市販の PMPW を、半球形に引き延ばして加工した後に、プラスチックカップに装着している。この PMPF の加工は、現在、手作業で行なっているため、培養容器ごとに PMPF の形状や、引き伸ばしの程度などに差異が生じている。また、これまでの経験上、市販の PMPW には作製工程時に破れやすい等のロット差が存在することから、異なるロットの製品を用いて作製した PMPF の厚さに影響し、ガス透過性が培養容器ごとに異なる可能性がある。市販の PMPW のロット差は、cSLCS における酸素要求量に違いをもたらすことから実験条件の最適化を目指す上での支障となっている。本研究における数値データの標準誤差が大きいのは、この手作業に起因する PMPF の差違や、市販の PMPW のロット差による培養環境の違いが、胚の成長に影響を与えていることが原因である可能性がある。今後、

PMPF を一定の品質で作製するための加工法の開発や、PMPF を作製するために適した PMPW のロットを選ぶことにより実験間誤差を減少できる可能性がある。

4. 孵化直前の胚における培養容器の影響と今後の課題

本研究の最終目標は cSLCS における孵化率の向上である。これまでに、cSLCS では、培養 19 日目～20 日目の孵化直前に大きく生存率が低下することが報告されている (Tahara and Obara, 2014; Tahara *et al.*, 2021)。この時期は、肺呼吸の開始や、嘴打ちなど、胚にとって孵化に必須となる様々な事象が連続して起こる時期である。これらの事象が適切に起きなければ、胚の発生は停止し、死籠もり状態となる。cSLCS では、最初に、胚が漿尿膜に包まれた状態のまま肺呼吸様の胸部運動を間欠的に繰り返し、次第に頻度を増し、その後、胚自身の動きにより嘴で漿尿膜を破ることで肺呼吸が開始される。しかし、cSLCS では、培養容器内の胚の位置が、培養ごとに一定ではなく、頭部が培養容器底部に位置するなどの理由により、適切な時期に肺呼吸に移行できない個体が認められた。また、卵黄嚢が胚の背側に位置するため、孵化に先立ち卵黄嚢を腹腔内に納めることができない個体も認められた (小原未発表)。卵殻内での胚の位置が一定である有卵殻卵での孵卵では、これらの問題は起こらないことから、卵殻および卵殻膜には、胚の位置を適切に保ち、孵化率を高めることを可能にする働きがあることが示唆された。以上より、cSLCS における孵化

率の向上には、培養容器内の胚の位置を適切に保つための改良が必要であると考えられた。

5. cSLCS の展望

cSLCS により、安定して高い孵化率を得ることが可能となれば、様々な分野への応用が進むと思われる。しかし、現在、可視化したまま培養を開始できるのは、孵卵 3 日目以降の胚に限られる。ニワトリ胚発生では、放卵時に胚盤葉期まで発生が進み、その後孵卵 3 日目までの間に、眼や心臓をはじめ、各器官の原基ができあがる (Figure 4-1)。従って、現在の cSLCS では、心臓や眼をはじめとした、体の基本構造が分化していく様子を可視化したまま継続して培養し、孵化させることは不可能である。将来、この時期の発生過程を可視化する技術が実現されれば、様々な分野へ応用が期待される。例えば、発生学では、初期発生過程の詳細な解析、毒性学では、毒性発現のメカニズムや経時的变化の解析、バイオイメーjingとして発生段階にある特定の細胞の追跡、再生医療の基礎研究では、細胞の分化や臓器発生に関する研究など、応用可能な分野は多岐にわたる。

現在、胚盤葉期 (0 日胚) から、本研究で用いた培養容器を用いて、孵化まで連続して培養するための条件検討ならびに実験を進めており、さらには、胚盤葉期からの培養が可能になることで実現できる新たな応用研究についても検討を行っている。

6. まとめ

鳥類は、地上で繁殖するために、進化の過程で卵を卵殻膜および卵殻で覆い、物理的に胚を守るという戦略で生き延びてきた。cSLCS は、胚を守るこの2つの構造物を除去することにより、言わば進化以前の状態を再現し、ニワトリ胚を卵殻外で可視化して培養し孵化させることを可能とする技術である。この技術は、基本的に卵殻膜を市販の PMPW で置き換えることにより正常な雛の孵化を可能としているが、胚の成長が悪い、孵化率が低く、実験間での誤差が大きい等、実用に向けて改善すべき課題が多い。本研究では、現在の cSLCS の問題点を明確化することを目的として、卵殻膜を PMPF で代替した場合において乳酸カルシウムの添加が培養前期の胚に及ぼす影響並びに培養容器に対する純酸素の添加が培養後期における胚に及ぼす影響に着目して一連の研究を行った。その結果、乳酸カルシウムは、胚の正常な骨の発育に貢献するが胚は小型であること、ならびに胚の成長に悪影響を及ぼす要因となることが明らかになった。さらに、培養 17 日目以降の胚に対する純酸素の添加は、胚を孵化させるために必要であるが、その効果には大きな個体差が認められた。

以上の結果から、現在の PMPF を用いた cSLCS は、卵殻および卵殻膜の機能を代替するための最低条件を満たしているものの、血液中のカルシウム濃度や酸素濃度を正常に近づけるだけでは胚の成長に不十分で、改良の余地が大きく、特にカルシウムおよび酸素の添加方法や時期、添加量などにはさらなる検討が必要なことが明らかになった。

卵殻および卵殻膜は、ニワトリ胚が孵化するために必要な全ての条件が最適化された構造物である。cSLCS における培養条件を詳細に検証することにより、鳥類が進化の過程で陸上での繁殖に適応し、卵殻および卵殻膜を獲得した経緯を解明できる可能性がある。

cSLCS は、どの程度家畜へ応用できるかは未知数であるが、育種に新たな手法を提供するもので、家畜の生理機構の解明に役立つ可能性がある。また、未だ明らかではない部分も多い卵殻膜の機能の解析や、人工卵殻膜の開発にも繋がる。そして、胚の正常な発育に関わる多くの技術的課題が解決され、cSLCS が様々な分野に応用されれば、鶏卵の新たな活用法となることが期待される。

図表

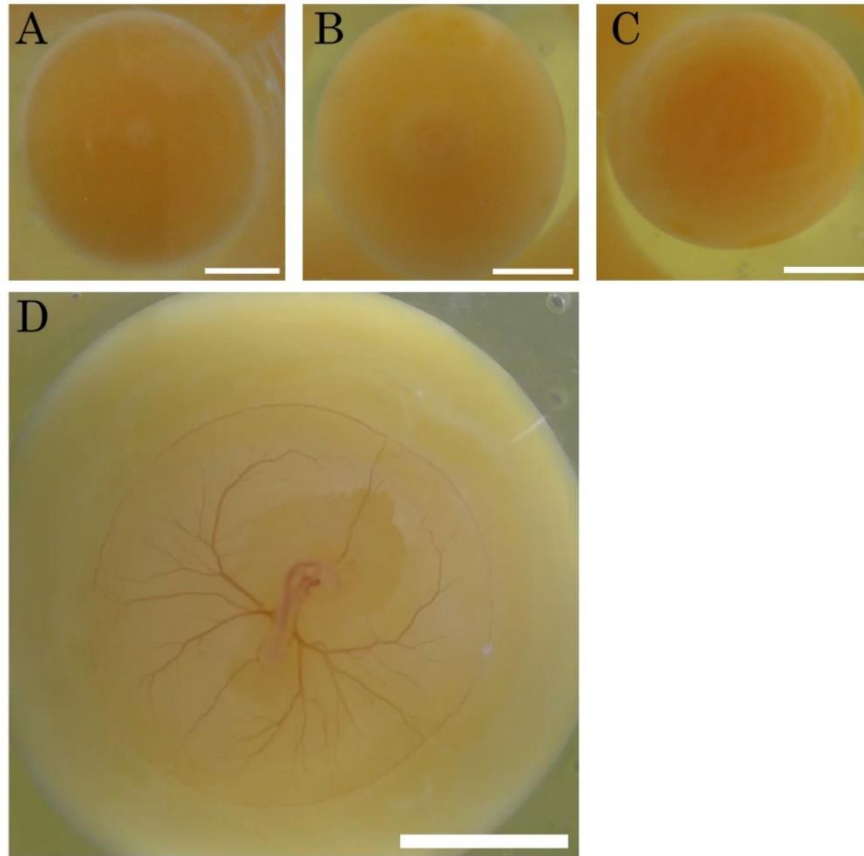


Figure 4-1. Chick embryo up to 56 hours of incubation.

A: Immediately after oviposition (Blastoderm stage). B: 20 hours of incubation (HH-5). C: 45 hours of incubation (HH-11). D: 56 hours of incubation (HH-16). Scale bar = 1 cm.

和文要約

畜産業の中で養鶏業は、肉や卵などの人類にとって必要不可欠なタンパク源を生産する重要な産業の一つである。FAOによると、世界では約 330 億羽、日本では約 3.2 億羽のニワトリが飼育されているが、家畜単位で比較した場合の鶏の飼育数は世界的にも日本においても主要家畜の中で最も多い。このように養鶏業が発達した要因として、孵卵器が発明されて以来蓄積されてきた受精卵から健康なヒナを孵化させる人工孵卵技術の発達がある。この受精卵の人工孵卵技術は、養鶏産業の発展に寄与したのみならず、毒性試験やワクチン生産などの医薬品産業や、発生学や実験生物学などの分野においても極めて重要な役割を果たしてきた。ところが、卵殻という閉鎖系の中で、わずか 21 日間でニワトリのヒナが孵化するメカニズムについては不明な点が多々ある。しかし、不透明な卵殻が存在するため卵を割らなければ胚の発育状態を観察することができないという課題があった。

近年、ニワトリ胚を卵殻外で培養する技術が複数開発されたことにより、ニワトリ胚の発生過程を経時的に観察することが可能になった。その中で、特に人工卵殻膜として透明なポリメチルペンテン製食品用ラップ (PMPW) を用いたニワトリ胚無卵殻培養法 (chick Shell-less Culture System: cSLCS) を用いることにより、孵卵 3 日胚から孵化までの胚の発生過程を経時的に観察化することが可能になった。ところが、現在の cSLCS では、培養開始直後期 (Early Culture Period: ECP) 並びに培養後期 (Late Culture Period: LCP) に胚の生存率

が低下するという問題が認められる。そこで本研究は、この両期に胚の生存率が低下する要因の解明を目的とした。

実験 1 では、ECP における乳酸カルシウム (Ca-L) 添加の影響について検討した。本研究には白色レグホーンの孵卵 3 日胚 (D3 胚) を用い、予め Ca-L と蒸留水を添加された PMPW 上に移動した後培養を継続した。培養 17 日胚

(D17 胚) までの生存率と、D17 胚の血液性状および脛骨の形状、骨密度および 3 次元解析を行った。その結果、血液中の総コレステロール (TCHO)、グルコース (GLU) および中性脂肪 (TG) については、全ての実験区間で有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。また、リン (IP) では、有卵殻対象区 (IC 区) と各実験区の間には有意差は認めなかった ($P > 0.05$)。乳酸脱水素酵素

(LDH) は、Ca-L 無添加区 (CaL(-)区) において、やや低くなる傾向にあった。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) は、CaL(-)区において、有意に低くなった ($P < 0.05$) が、一般的な正常基準範囲内であり、臨床的な意味合いはないと考えられた。一方で、Ca-L 添加区 (CaL(+)) 区における血液中の Ca 濃度は、CaL(-)区より有意に高く ($P < 0.05$)、IC 区との間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。また、骨密度は、CaL(+)) 区では、IC 区との間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$) が、CaL (-)区では有意に低かった ($P < 0.05$)。一方、脛骨の形状は各実験区において異常は認められなかったが、脛骨の長さは、CaL(+)) 区および CaL(-)区において IC 区より有意に短かく ($P < 0.05$)、胚全体の大きさも、CaL(+)) 区および CaL(-)区において IC 区より小さくなった。胚の生存率は、CaL(-)区と IC 区との間に有意差は認められな

った ($P > 0.05$) が、CaL(+)区においては ECP に有意に IC より低かった ($P < 0.05$)。以上の結果から、Ca-L は、胚に吸収され、血液中を循環し骨形成を正常に近づけるが、胚体は小型であることに加え、ECP における胚の生存率を低下させることが明らかになった。

実験 2 では、LCP における酸素添加の影響について検討した。本研究は実験 1 における CaL(+)区と同様の方法を用い、培養 17 日目から酸素を添加した区 (O(+))と酸素を添加しなかった区 (O(-))を設け培養 19 日目胚 (D19 胚) における胚の生存率、血液性状 (Ca、IP、LDH、GLU、AST、TG、TCHO)、経皮的動脈血酸素飽和度 (SpO_2) および後腎の組織学的な解析を行った。

その結果、O(+))区および O(-))区における胚の生存率および血液性状に有意差は認められなかった ($P > 0.05$) が、CaL(+)区と CaL(-)区を IC 区と比較すると、IP および TCHO は有意に高く ($P < 0.05$)、Ca は有意に低くなった ($P < 0.05$)。一方で、 SpO_2 は、酸素添加を開始する前の D17 胚の時点ですでに IC 区と比べて有意に低かった ($P < 0.05$)。さらに D19 胚における O(-)区の SpO_2 は IC 区と比べて有意に低かった ($P < 0.05$)。その一方、O(+))区においては全体的に SpO_2 が上昇したものの、上昇の程度には大きな個体差が認められた。また、後腎の組織学的解析より、O(+))区および O(-))区のいずれにおいても酸素欠乏を疑わせる所見の一つである重度の尿細管病変が認められた。以上の結果から、cSLCS に対する D17 からの酸素添加は、D19 胚における SpO_2 を改善さ

せるが、酸素の添加開始時期や添加方法には改善が必要であることが明らかとなった。

本研究により、無卵殻培養において、単に胚の血液中の Ca 濃度や SpO₂ を生理的な正常値に近づけるだけでは、高い孵化率を得るには不十分で、Ca-L や酸素の添加方法や添加時期、添加量にはさらなる検討が必要なことが明らかとなった。通常の有卵殻卵の孵卵において、卵殻や卵殻膜は、胚を乾燥や物理的な衝撃から保護し、適度な通気を維持して胚のガス交換に寄与し、胚へのカルシウム供給を行う優れたシステムである。cSLCS では、卵殻や卵殻膜を人工容器に置き換えて胚を培養するが、Ca-L や酸素といった条件は、卵殻や卵殻膜の機能を補完する目的で添加されている。こうした卵殻や卵殻膜の機能に関連する条件が、無卵殻培養における胚の発育に影響していると考えられた。今回得られたこれらの知見は、cSLCS における孵化率の向上のみならず、卵殻や卵殻膜の機能の解析などにおいても貢献すると考えられる。

さらに、今後、cSLCS を用いて放卵直後の受精卵（培養 0 日胚）を孵化する技術が確立すれば、本技術の応用範囲が一層拡大することが期待される。

Summary

Factors affecting the growth of the chick embryo under a shell-less culture system

Katsuya Obara

The poultry industry is one of the major agricultural production sectors that supply highly nutritious meat, eggs, and other poultry products for human. According to the FAOSTAT (FAO 2022), there are approximately 33 billion chickens in the world, among which approximately 320 million chickens are in Japan. In the livestock unit basis, the number of chickens, both in the world and in Japan, are larger than any other major commodity livestock species.

One of the key technologies that contributed to rapid growth of the industry is attributed to the invention of electric incubator which enabled a constantly hatch of healthy chicks with hatching-rate almost equivalent to eggs in the nest incubated by molting hen. Furthermore, the invention of electric incubator has played a pivotal role in the pharmaceutical areas, such as toxicity testing and vaccine production, and also in the areas of developmental/experimental biology. Nevertheless, the temporal phenotypic change of developing chick embryo *in ovo*, and also processes of pipping to hatching at 21st days of incubation remains unexplored primarily due to the inability to observe through untransparent eggshell.

After extensive efforts, a complete chick shell-less culture system (cSLCS), which uses transparent polymethylpentene wrap (PMPW) as an artificial shell membrane, was

reported by Tahara and Obara (2014). However, in the current cSLCS, the viability of embryos were observed to decrease during the early culture period (ECP) and the late culture period (LCP). The aim of this study, therefore, was to clarify the factors that cause ECP and LCP.

In Experiment 1, the effect of calcium lactate (Ca-L) supplementation on ECP was investigated. White Leghorn embryos at day 3 of culture (D3 embryos) were used in this study. Embryos were carefully transferred onto PMPWs to which Ca-L and distilled water had been added previously. Viability to day 17 embryos in culture (D17 embryos) and blood components and tibia shape, bone density and 3D analysis of D17 embryos were measured. No significant differences in total cholesterol (TCHO), glucose (GLU), and triglycerides (TG) in plasma between all experimental groups ($P > 0.05$). In addition, no significant differences were observed in phosphorus (IP) between the shelled egg (IC) and each experimental group ($P > 0.05$). Lactate dehydrogenase (LDH) was slightly lower in the Ca-L-less (CaL(-)) group. Event though Aspartate aminotransferase (AST) was significantly lower in the CaL(-) group ($P < 0.05$), the results were within the normal range and considered to be no clinical significance. On the other hand, plasma Ca concentration in the Ca-L-supplemented (CaL (+)) group was significantly higher than CaL (-) group ($P < 0.05$), but not significantly different with IC group ($P > 0.05$). Bone mineral density was also significantly lower in the CaL (+) group than in the IC group ($P < 0.05$), but not significantly different between the CaL (-) group and the IC group ($P > 0.05$). No abnormalities in tibia shape were observed in each experimental group, however, tibia length was significantly shorter ($P < 0.05$) in the CaL (+) and CaL (-)

groups than in the IC group, and whole embryo size was also smaller in the CaL (+) and CaL (-) groups than in the IC group. The viability of embryos was not significantly different between the CaL(-) and IC groups ($P > 0.05$), however, the CaL(+) group was significantly lower in ECP than in IC ($P < 0.05$). These results showed that Ca-L is absorbed by the embryo, circulates in the blood and support bone formation with normal bone density. However, embryo body size in cSLCS were significantly smaller than IC ($P < 0.05$) and also reduction of embryo viability was observe during ECP.

In Experiment 2, the effect of oxygen supplementation on LCP was investigated. In this study, the same method was used as in the CaL(+) group in Experiment 1, and from day 17 of culture, the oxygenated (O(+)) and non-oxygenated (O(-)) groups were established and embryo viability, blood components (Ca, IP, LDH, GLU, AST, TG, TCHO), percutaneous arterial blood oxygen saturation (SpO₂) and histological analysis of the metanephros were conducted on day 19 of culture embryos (D19 embryos). As a result, there were no significant differences in embryo viability and blood component in the O(+) and O(-) groups ($P > 0.05$), whereas IP and TCHO were significantly higher ($P < 0.05$) and Ca was significantly lower ($P < 0.05$) in the CaL(+) and CaL(-) groups when compared to the IC groups. On the other hand, SpO₂ was significantly lower ($P < 0.05$) compared to IC groups already at D17 embryos before the start of the oxygen supplementation. Furthermore, SpO₂ in D19 embryos in the O(-) group was significantly lower than in the IC group ($P < 0.05$). On the other hand, SpO₂ generally increased in the O(+) group, but the extent of the increase varied widely among individuals. Histological analysis of the metanephros revealed severe tubular lesions, findings suggestive of

hypoxia, in both the O(+) and O(-) groups. These results suggest that the supplementation of oxygen from D17 to cSLCS improves SpO₂ in D19 embryos, but the timing and method of starting oxygen supplementation require to be improved.

In conclusion, it was revealed that external supply of Ca and O₂ in cSLCS elevated blood Ca and SpO₂ concentration onto physiologically normal levels, respectively, but these are both insufficient to support normal embryo growth.

Future study should be directed toward hatching normal chick by culturing newly laid fertilized embryos at blastodermal stage.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系浅野敦之助教ならびに、田島淳史名誉教授に心より御礼申し上げます。同系古川誠一准教授、筑波大学連携大学院三森眞琴教授、作本亮介教授には副査としてご助言頂くとともに、論文の作成にあたり、ご指導いただきましたことを深く御礼申し上げます。さらに、本研究に際しご指導いただきました元農業生物資源研究所の内藤充先生に深く御礼申し上げます。加えて、論文作成にあたりご助力いただいた岡山理科大学獣医学部病理学研究室の宇根有美教授、元同逸見（小原）千寿香講師に深くお礼申し上げます。また、ニワトリ胚無卵殻培養法についてご助力いただいた千葉県立生浜高等学校の田原豊教諭に深く感謝いたします。

参考文献

- Andacht T, Hu W and Ivarie R. 2004. Rapid and improved method for windowing eggs accessing the stage X chicken embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 69: 31–34.
- Aristoteles. 1965. *History of Animals, Volume I: Books 1–3*. Translated by A. L. Peck. Loeb Classical Library 437. Cambridge, MA. Harvard University Press.
- Bolon G and Burggren WW. 2013. Metanephric kidney development in the chicken embryo: Glomerular numbers, characteristics and perfusion. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 166: 343–350.
- Boulland J, Halasi G, Kasumacic N and Glover J. 2010. Xenotransplantation of human stem cells into the chicken embryo. *Journal of Visualized Experiments*, 41: e2071. 1–16.
- Burton FG and Tullett SG. 1985. Respiration of avian embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 82A: 735–744.
- Byce LC. 1914. Incubator, United State Patent 1, 110, 532. Patentd Sept 15.
<https://patentimages.storage.googleapis.com/pages/US1110532-0.png>
- Chiba A, Yui C and Hirano S. 2010. Liver reconstruction on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Archives of Histology and Cytology*, 71: 45–53.
- Colbert EH. 2004. 脊椎動物の進化（田隅本生訳）. 築地書館, 東京.
- Elliott J and Bennett J. 1971. Growth of chick embryos in polyethylene bags. *Poultry Science*, 50: 974–975.

- Eyal-Giladi H and Kochav S. 1976. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Developmental Biology*, 49: 321–337.
- FAOSTAT. 2020. Livestock Primary. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>, Accessed Aug 30,2022.
- Fisher M. and Schoenwolf GC. 1983. The use of check embryos in experimental embryology and teratology: Improvements in standard procedures. *Teratology*, 27: 65–72.
- Funahashi J. and Nakamura H. 2014. Time-lapse imaging system with shell-less culture chamber. *Development, Growth & Differentiation*, 56: 305–309.
- Gabrielli, M. G. and Accili, D. 2010. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 940741.
- Hamburger V and Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88: 49–92.
- Jourdeuil KA, Hammer CL and Franz-Odenaal TA. 2015. A comparative analysis of chick culturing methods on skeletogenesis. *Anatomical Record*, 298: 810–819.
- Kamihira M, Oguchi S, Tachibana A, Kitagawa Y and Iijima S. 1998. Improved hatching for *in vitro* quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Development, Growth & Differentiation*, 40: 449–455.

- Kanda K, Ito S, Koh D, Kim E and Iwata H. 2021. Effects of tris(2-chloroethyl) phosphate exposure on chicken embryos in a shell-less incubation system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207: 111263.
- Kanda Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation*, 48: 452–458.
- 加藤丈雄. 1998. 卵の構造, In: 中村良 (編) , 卵の科学. pp.1–9. 朝倉書店, 東京.
- Kochav S, Ginsburg M and Eyal-Giladi H. 1980. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Developmental Biology*, 79: 296–308.
- Kulesa PM, Bailey CM, Coopere C and Fraser SE. 2010. *In Ovo* live imaging of avian embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6): pdb.prot5446.
- Lomholt JP. 1976. The development of the oxygen permeability of the avian egg shell and its membranes during incubation. *Journal of Experimental Zoology*, 198: 177–184.
- Lourens A, van den Brand H, Heetkamp MJW, Meijerhof R and Kemp B. 2007. Effects of eggshell temperature and oxygen concentration on embryo growth and metabolism during incubation. *Poultry Science*, 86: 2194–2199.
- Lumeij JT. 2008. Avian clinical biochemistry. In: *Clinical biochemistry of domestic animals (sixth edition)* (Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML eds.). pp. 839-872. Academic Press, London.

- 牧村進. 1997. 5・各種疾患の鑑別, In: 長谷川篤彦, 前出吉光 (監), 獣医内科
診断学. pp. 290. 文永堂出版, 東京.
- 水野丈夫. 1989. 5・鳥類, In: 岡田節人 (編), 脊椎動物の発生・上. pp.391–
444. 培風館, 東京.
- Naito M, Nirasawa K and Oishi T. 1990. Development in culture of the chick embryo
from fertilized ovum to hatching. *Journal of Experimental Zoology*, 254: 322–326.
- Narbaitz R and Kacew S. 1978. Ultrastructural and biochemical observations on the
metanephros of normal and cultured chick embryos. *Anatomy and Embryology*,
155: 95–105.
- Nelson DL and Cox MM. 1993. レーニンジャーの新生化学 (上) 第2版 (川寄敏
祐編). 廣川書店, 東京.
- 小野珠乙. 2014. ニワトリの発生と遺伝子工学, In: 古瀬充宏 (編), ニワトリの
科学. pp.116–125. 朝倉書店, 東京.
- Ono T and Tuan RS. 1986. Effect of experimentally induced calcium deficiency on
development, metabolism and liver morphogenesis of the chick embryo. *Journal of
Embryology and Experimental Morphology*, 92: 207–222.
- Perry MM. 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, 331: 70–72.
- Peters J, Lebrasseur O, Irving-Pease EK, Paxinos PD, Best J, Smallman R, Callou C,
Gardeisen A, Trixl S, Frantz L, Sykes N, Fuller DQ, and Larson G. 2022. The
biocultural origins and dispersal of domestic chickens. *Proceedings of the National
Academy of Sciences*, 119: e2121978119.

- Rahn H, Ar A and Paganelli CV. 1979. How bird eggs breathe. *Scientific American*, 240: 46–55.
- Rowlett K and Simkiss K. 1987. Explanted embryoculture: *In vitro* and *in ovo* techniques for domestic fowl. *British Poultry Science*, 28: 91–101.
- Tahara Y and Obara K. 2014. A novel shell-less culture system for chick embryos using a plastic film as culture vessels. *Journal of Poultry Science*, 51: 307–312.
- Tahara Y and Obara K 2021. *Ex Ovo* Culture System for Avian Embryos and its Application. *Journal of Poultry Science*, 58: 1–4.
- Tahara Y, Obara K and Kamihira M. 2021. Calcium carbonate supplementation to chorioallantoic membranes improves hatchability in shell-less chick embryo culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 131: 314–319.
- Torres CA and Korver DR. 2018. Influences of trace mineral nutrition and maternal flock age on broiler embryo bone development. *Poultry Science*, 97: 2996–3003.
- Tuan RS. 1980. Calcium Transport and Related Functions in the Chorioallantoic Membrane of Cultured Shell-less Chick Embryos. *Developmental Biology*, 74: 196–204.
- Tuan RS. 1983. Supplemented eggshell restores calcium transport in chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 74: 119–131.
- Tuan RS and Ono T. 1986. Regulation of extraembryonic calcium mobilization by the developing chick embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 97: 63–74.

- Vaziri ND. 2016. HDL abnormalities in nephrotic syndrome and chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 12: 37–47.
- Wilkinson LJ, Neal CS, Singh RR, Sparrow DB, Kurniawan ND, Kurniawan ND, Ju A, Grieve SM, Dunwoodie SL, Moritz KM and Little MH. 2015. Renal developmental defects resulting from in utero hypoxia are associated with suppression of ureteric b-catenin signaling *Kidney International*, 87: 975–983.
- Yair R, Uni Z and Shahar R. 2012. Bone characteristics of late-term embryonic and hatchling broilers: Bone development under extreme growth rate. *Poultry Science*, 91: 2614–2620.
- Yan Y, Cheng X, Yang RH, Li H, Chen JL, Ma ZL, Wang G, Chuai M and Yang X. 2016. Exposure to excess phenobarbital negatively influences the osteogenesis of chick embryos. *Frontiers in Pharmacology*, 7: 349.
- Zhang H and Burggren WW. 2012. Hypoxic level and duration differentially affect embryonic organ system development of the chicken (*Gallus gallus*). *Poultry Science*, 91: 3191–3201.