

## 岩手地鶏由来始原生殖細胞の移植による生殖系キメラの作出

松原和衛<sup>1,\*</sup>・吉田啓記<sup>1</sup>・川越雄太<sup>1</sup>・吉田 登<sup>2</sup>・斎藤靖史<sup>3</sup>

<sup>1</sup>岩手大学農学部, 岩手県盛岡市上田 3-18-8 〒 020-8550

<sup>2</sup>岩手県庁, 岩手県盛岡市内丸 10-1 〒 020-8570

<sup>3</sup>岩手大学農学部附属寒冷バイオフロンティア研究センター, 岩手県盛岡市上田 3-18-8 〒 020-8550

2013年4月12日受付, 2013年5月24日受理

### 要 約

岩手地鶏 (*Iwate Jidori*) は絶滅が危惧される日本の天然記念物である。本研究は、岩手地鶏の赤笹種 (JR) の生殖隆起から採取した始原生殖細胞 (gPGCs) を白色レグホン種 (WL) に移植して、生殖系キメラの作出を行った。生殖隆起へ到達した6.5日目 (ステージ28-29) のJRのgPGCsを分離して①すぐに移植、②凍結融解後移植、③ニワトリヒナ血清を添加した培地で48時間培養してから移植の3つの方法で、WL胚 (ステージ13~14) の卵黄周縁動脈に移植した。その結果、操作胚から計24羽の仮キメラが孵化し17羽が性成熟に達した。この時点の仮キメラの羽装はWLの羽装と同じであった。性成熟に達した仮キメラとWLを人工授精し、後代検定を実施した。①の移植方法で孵化した2羽の雄とWL (♀) の交配によって孵化したヒナから10羽 (平均キメリズム: 5.0%)、②の移植方法で孵化した1羽の雄とWL (♀) の交配から1羽 (キメリズム: 0.5%) の黒い刺毛の入った後代が確認された。③の方法で作出された仮キメラの後代には黒い刺毛は確認されなかった。したがって、JRから採取されWLに移植されたgPGCsは、WL胚中で正常に分化し精子として機能したことが確認された。雌の仮キメラ10羽も同様にWL (♂) と交配させたが、キメラは確認できなかった。また、生殖隆起をヒナ血清で培養することにより、マウスと同様に生殖隆起からgPGCsが移動しコロニーを形成することが観察されたが、FCS添加では見られなかった。さらに、培養21日目のgPGCsはPAS陽性、SSEA-1陽性であり、成長因子を添加しなくとも培養することが可能であった。

キーワード: 岩手地鶏、始原生殖細胞、生殖系キメラ、培養

東北畜産学会報 63(1): 15 ~ 23 2013

### 緒 言

岩手地鶏 (*Iwate Jidori*) は、1984年に日本の天然記念物に指定された岩手県の重要な遺伝資源である。岩手地鶏は年々減少し、現在では岩手県農業研究センター畜産研究所で数百羽が飼育されている。しかし、1羽当たりの産卵数は約60個と年々少なくなっており絶滅の一途をたどっている (吉田ら, 2006)。鳥類の始原生殖細胞 (Primordial germ cells: PGCs) は、孵卵約60時間後の胚体外卵黄動脈中を血液細胞とともに浮遊し (circulating PGCs: cPGCs)、孵卵約3.5日目以降から生殖隆起

(genital ridge: GR) に到達し定着する (genital ridge PGCs: gPGCs)。したがって、この時期のcPGCsを取り出して他の種類のニワトリ胚に移植することによって生殖系キメラを作出することが可能である (Wentworthら, 1989; Vickら, 1993; Shimkissら, 1989; Tajimaら, 1993; Naitoら, 1994, 1998; Rikimaruら, 2011)。

我々は、先に岩手地鶏のcPGCsを白色レグホン種 (WL) の胚血管に移植して3羽の雄と4羽の雌を作出し、これらのニワトリ同士を交配したが岩手地鶏を生産することはできず、生殖腺異常を持つ個体が観察されたことを報告した (吉田ら, 2006)。一方、Kuwanaら (2006) は、久連子鶏 (*Kureko Dori*: KD) の凍結融解cPGCsをWL胚に移植し、その生殖系雌キメラと雄のKDを交配したところドナー由来の黒いヒナが得られたことを報告

\* 連絡者: 松原和衛 (まつばら かずえい)  
(岩手大学農学部動物科学課程)  
Tel: 019-621-6160 Fax: 019-621-6160  
E-mail: kazuei@iwate-u.ac.jp

した。しかし、貴重な絶滅危惧種のニワトリ胚血液からcPGCsを得てWL胚の血管に移植するには熟練を要し、移植したcPGCsが後代で生殖細胞となる確率も低いことが問題となっている。移植効率を上げるためには、多くのレシピエント(WL)胚にドナーPGCsを移植し、多くの仮キメラを作出することが必要である。しかし、血液中のcPGCsは少なくこの技術の欠点となっている。Mayanagiら(2003)は、交配後125日目のマウス胚から採取したGRをラット血清添加DMEM培地で7日間培養すると、アルカリフォスファターゼ陽性のgPGCsがGRから移動するが、ウシ胎児血清(FCS)添加では確認されなかったことを報告している。

そこで本研究では、岩手地鶏の赤笹種(*Japanese Red*: JR)の生殖系キメラの作出を目指し、GR由来gPGCsを採取後すぐに移植(方法1)、凍結融解後移植(方法2)、またはGRをヒナ血清で培養(方法3)し、ステージ12~13のWL胚の血管に移植して生殖系キメラの作出を試みた。

## 材料および方法

### 1. 供試鶏卵

JRとWLの卵は、それぞれ岩手県農業研究センター畜産研究所で飼育している種鶏群、および小岩井農牧株式会社で飼育している種鶏群から有精卵をランダムに採取し使用した。それぞれの種卵は、温度37.8℃、湿度60~65%に設定した孵卵機(昭和フランキ、P-008B型バイオ仕様)で孵卵した。以後の胚発生ステージは、Hamburger & Hamilton(1951)の基準に従って判断した。

### 2. 生殖隆起の培養とPGCsの確認

孵卵6.5日目(ステージ28~29)のJR胚からGRを採取した。基礎培地は、Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM:SIGMA)にベニシリン・ストレプトマイシン溶液(SIGMA)を添加したものを使用した。採取したGRをFCS、あるいは孵化日のWLのヒナ血清を10%添加した基礎培地に入れ、37℃、5%CO<sub>2</sub>で3,7,14,21日間培養した。PGCsは、PAS染色(アスカ純薬:S-395A)、およびマウス抗SSEA-1モノクローナル抗体(MAB:4301)を1次抗体とし、2次抗体にBiotin標識抗マウスIg(GEヘルスケアバイオサイエンス:RPN1004)、その後ストレプトアビジン結合HRP(GEヘルスケアバイオサイエンス:RPN1231)で細胞を標識し、PODイムノステインキット(Wak:299-18841)で発色させ倒立顕微鏡下で観察した。また、Mayanagiら(2003)

が作製したFITC-ウサギ抗マウス12.5dpc PGC IgGとの反応を蛍光顕微鏡で観察した。さらに、培養細胞は1%グルタルアルデヒドで固定後、1%オスミウム酸で固定しエタノール上昇系列で脱水した。次に酢酸イソアミルで置換し、臨界点乾燥後、金蒸着を行い走査型電子顕微鏡(日立S-2500型SEM)で観察した。

### 3. gPGCsの調製

JRのgPGCsは次の3つの方法で調製した。6.5日目のJR胚から分離したGRを①Trypsin-EDTA(GIBCO)で解離し、ピペッティングにより細胞をバラバラにした。その後遠心洗浄しTrypsin-EDTAを除去した(方法1)。②Trypsin-EDTAで解離したGR懸濁液を遠心分離後、Trypsin-EDTAを取り除きセルバンカー(日本全業工業株式会社)を加え懸濁した後、液体窒素に保存した。移植当日氷水中で融解し、直ちに培地を加え遠心分離後上清を除去した(方法2)。③GRを37℃、5%CO<sub>2</sub>で10%ヒナ血清添加DMEMを用いて48時間培養し、培養プレートの底面に繊維芽細胞(fibroblast cells:FBC)が広がり、その上に存在したgPGCsを採取し移植する方法(方法3)の3通りで実施した。gPGCsの採取は細胞懸濁液を35mmペトリディッシュ(Nunc)のフタにドロップを作り、倒立顕微鏡下で無菌的にマイクロピペットを用いてgPGCを選択的に1個ずつ採取した。

### 4. gPGCsの移植

WL胚の培養は、Naitoら(1990)の方法を参考にしSystem IIIを実施した。WL卵の鋭端部に内径3.5cmの穴をあけ、中身をプラスチックシャーレの上に移した。濃厚卵白を除去した後、水様性卵白と卵黄を再び前の卵殻に移し準備しておいた水様性卵白で満たした。ラップを卵白で満たした切断部にかぶせ、塩化ビニールパイプで作製した器具で卵殻を両方から挟み込み輪ゴムで固定した。孵卵機は、温度37.8℃、湿度55~65%に設定し、48~52時間孵卵した。ステージ12~13に達したWL胚を、直径4cmの鈍端部を切り取り中身を捨てておいた二黄卵殻へ移し替えた。実体顕微鏡下で、移し替えたWL胚の血流に逆らって内径100μmのマイクロピペットで血液を1~2μl程度吸い出した。その後、数時間孵卵機内に静置した後移植を行った。gPGCsの移植細胞数は、20~50個/μl/個とした。なお、方法1では2つのWL胚に8および18の性別不明のJR胚由来GRを混合したもの、残り7つのWL胚には、3胚(後にDNA検査の結果3胚とも雌と判定)のJR胚由来GRを混合したものから調製したgPGCsを使用した。また、方法2では12から15のJR胚由来GRから、方法3で

は2から3つのJR胚由来GRから調製したgPGCsを使用した。内径20 $\mu$ mのマイクロピペットを血管に刺し、gPGCsを慎重に移植し、ラップで穴を覆って15日間孵卵した。孵化予定3日前に発生座に静置した。孵化したヒナはバタリー鶏舎で餌付けをした。

## 5. ドナー胚のDNAによる性判別

DNAの抽出はWalshら(1991)の方法に準じて行った。PCRはItohら(2001)の方法に準じて行った。また、方法の詳細は安永ら(2006)の方法を参考にした。ドナー胚組織片約3mm<sup>3</sup>に5% Polystyrene-divinylbenzene iminodiacetate (Chelex100: Bio-Rad)を200 $\mu$ l加えた後、56 $^{\circ}$ Cの恒温器中で一晚保温、煮沸後サンプルとした。DNA/Chelex100懸濁液を12,000rpmで3分間遠心し、上清をPCR反応に使用した。プライマーは、W染色体特異的配列を増幅するプライマーUSP1/USP3(SIGMA)とZ染色体特異的配列を増幅するプライマーCPE 15F/CPE 15R(SIGMA)を使用した。DNAの増幅は、プレ熱変性95 $^{\circ}$ Cで3分、熱変性95 $^{\circ}$ Cで80秒、アニーリング59 $^{\circ}$ Cで90秒を1サイクルとし、35サイクル、プレ伸張反応72 $^{\circ}$ Cで9分間行った。目的部分の増幅を確認するためアガロース電気泳動を行い、泳動終了後に波長312nm下でバンドを確認した。

## 6. 後代検定

後代検定は、仮キメラが性成熟に達したことを確認した後(約180日)に行った。雄の性成熟については腹部マッサージ法により精液を採取できたとき、雌については卵重がある程度大きくなった時点で性成熟に達したと判断した。腹部マッサージ法により採取した雄の仮キメラの精液を雌WL3~4羽と、雌の仮キメラは雄WLから採取した精液を人工授精した。得られた有精卵は、2週間分を室温10 $^{\circ}$ Cの貯卵室で保存し1度に孵卵した。WLとJRのF<sub>1</sub>ヒナは、WLヒナには見られない黒い刺毛が体のどこかに入るため、黒い刺毛が入ったヒナが生まれた場合、その親である仮キメラは生殖系キメラになっていることが証明される(吉田ら, 2006)。

## 結果

### 1. gPGCsの培養と観察

孵卵6.5日目(ステージ28~29)のJRから採取したGRを、DMEMにヒナ血清またはFCSを10%になるように添加した2種類の培地で48時間器官培養した。その結果、24時間後にはヒナ血清添加区ではGRの輪郭がFCS添加区よりも不鮮明となり(Fig.1-A,D)、48

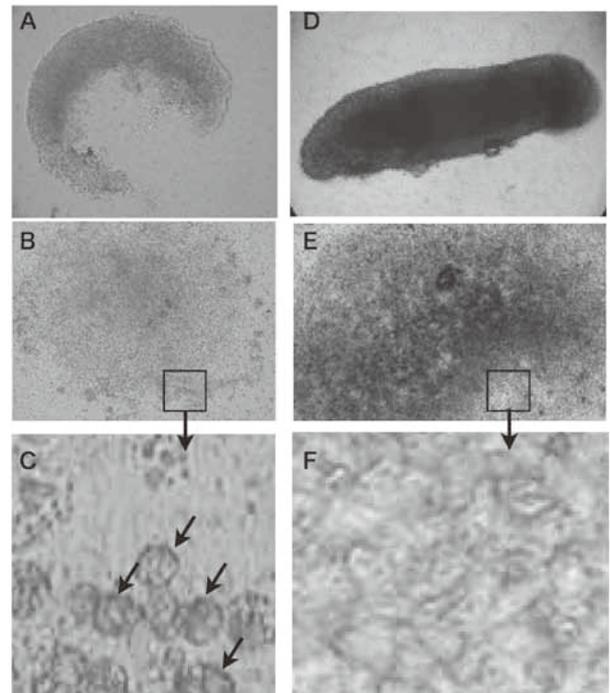


Fig. 1. Observation of GR (genital ridge) cultured with chick serum or FCS.

A, B, C: addition of chick serum, D, E, F: addition of FCS, A, D: after 24hrs, B~F: after 48hrs, C, F: magnification of B and E, arrows: gPGCs

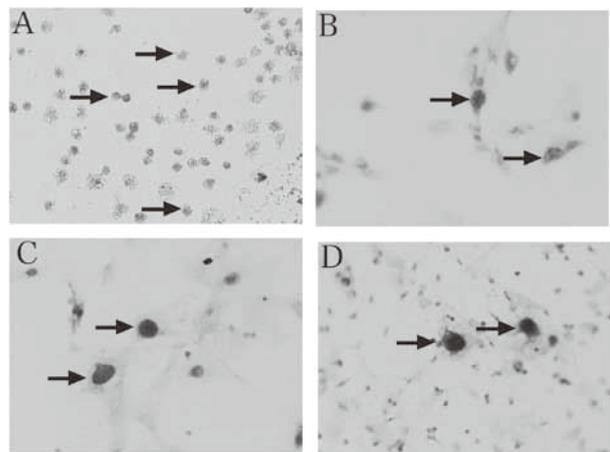


Fig. 2. Reaction of PAS in gPGCs cultured for 3, 7, 14, 21 days.

A: day 3 ( $\times 200$ ), B: day 7 ( $\times 400$ ), C: day 14 ( $\times 400$ ), D: day 21 ( $\times 400$ ), arrows: PAS positive gPGCs

時間後にはヒナ血清添加区がFCS添加区と比較して完全に崩れていた(Fig.1-B,E)。拡大するとGR由来FBCが培養プレート底面にシート上に広がり、その上に球形のgPGCsが観察された(Fig.1-C)。FCS添加区では若干崩壊したGR周辺にわずかにFBCが認められたが、その上にはgPGCsは観察されなかった(Fig.1-F)。ヒナ血清添加区で観察されたgPGCsは、培養21日まではPAS陽性(Fig.2)、抗SSEA-1抗体陽性であった(Fig.3)。また、FITC-ウサギ抗マウス12.5dpc PGC IgGにも

gPGCは特異的に反応し、アメーバー状の細胞にも若干反応した(Fig.4)。培養したGRをSEMで観察した結果、培養1,3日目にはGR表面から突出したgPGCsが認められた(Fig.5-A,B)。培養が進むにつれてGRの周りにFBCが徐々に張り出し(Fig.5-C)、GRから移動した5~15 $\mu$ mのgPGCsがその上に広がり、培養7日目にはアメーバー状のgPGCsが出現し(Fig.5-D)、その後14日目にはコロニーを形成することが観察された(Fig.5-E,F)。

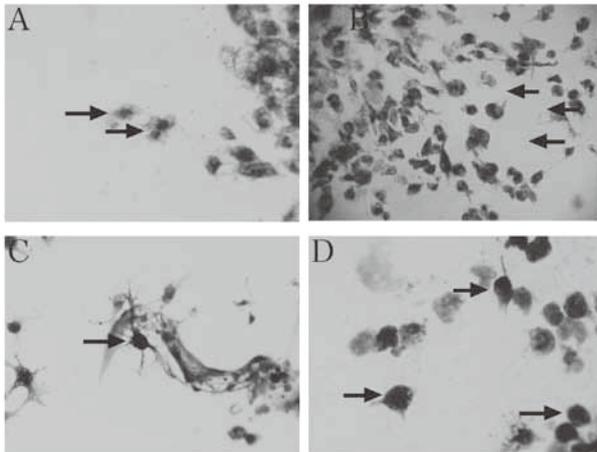
## 2. gPGCs移植による仮キメラの作出

上述した3種類の方法で準備したJRのgPGCsをWLに移植した結果、方法1では、計20個の胚に移植し9羽(No.11~19)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。方法2では、計39個の胚に移植し7羽(No.21~27)が孵化した(孵化

率17.9%)。このうち4羽(♂1:♀3)が性成熟に達した。方法3では、計25個の胚に移植し8羽(No.31~38)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(Table 1)。なお、これらの仮キメラの羽装はWLの羽装と同じであった。移植後、方法1のドナー胚の性をPCRにより解析した。その結果、No.13~19の個体に移植した3個体混合のドナーgPGCsは、それぞれのドナー個体がZ染色体由来の250bpとW染色体由来の370bpの増幅バンドを持っていたことから雌と判定された(Fig.6)。したがって、表現型の性も雌であるNo.13,15,17,19は同性キメラであり、雄のNo.16と18は異性キメラであることが判明した。なお、その他の仮キメラに移植したドナーgPGCsは、2~18個体のJR胚から集めており、DNAによる性判定もしていないため同性キメラか異性キメラかは不明である。

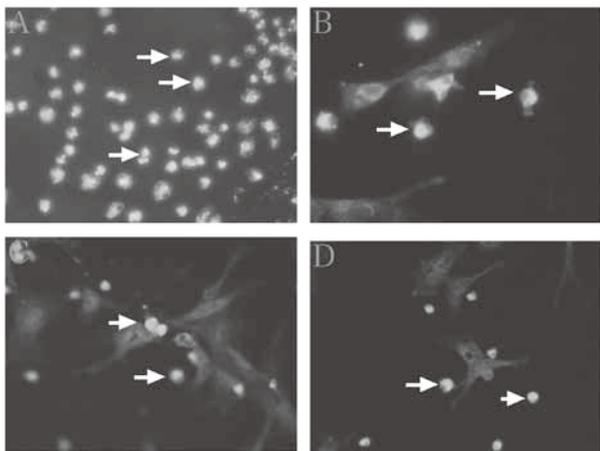
## 3. 仮キメラの後代検定

性成熟に達した仮キメラから順に後代検定を実施した。その結果、方法1で孵化したNo.12(♂)とWL(♀)の交配による後代検定では、13週間で237個の卵が得られうち183個が有精卵であり、106羽が孵化し(孵化率57.9%)、うち8羽に黒い刺毛をもつF<sub>1</sub>が確認さ



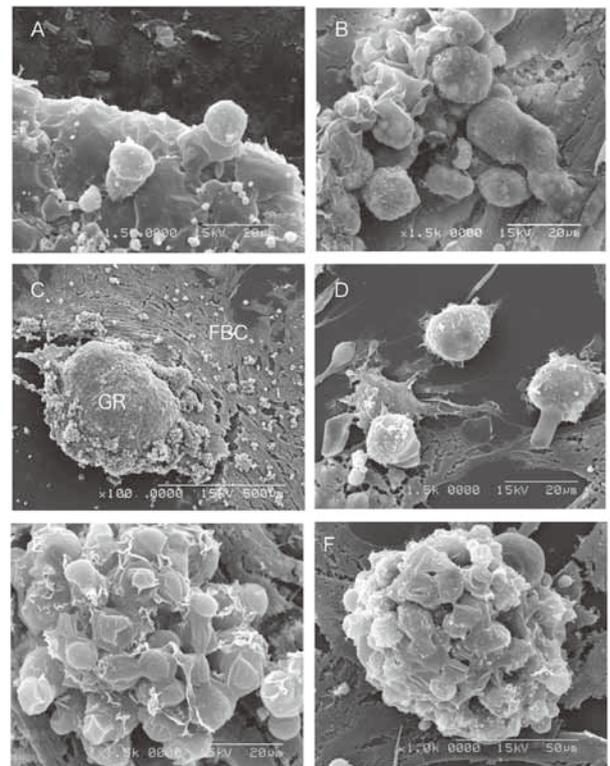
**Fig. 3.** Observation by Anti SSEA-1 antiserum of gPGCs cultured for 3, 7, 14, 21 days.

A: day 3 ( $\times 200$ ), B: day 7 ( $\times 200$ ), C: day 14 ( $\times 200$ ), D: day 21 ( $\times 400$ ), arrows: SSEA-1 positive gPGCs



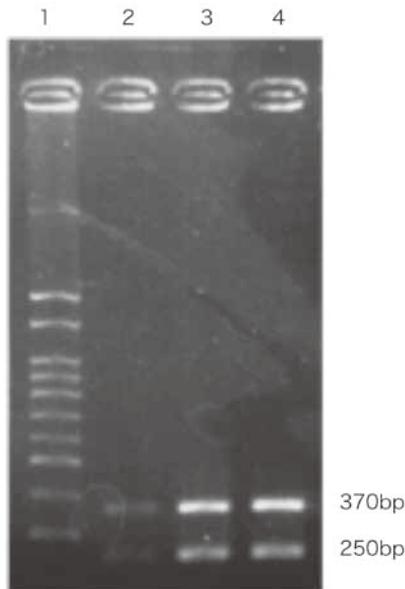
**Fig. 4.** Observation by FITC-Anti mouse 12.5dpc PGC IgG of gPGCs cultured for 3, 7, 14, 21 days.

A: day 3 ( $\times 200$ ), B: day 7 ( $\times 400$ ), C: day 14 ( $\times 400$ ), D: day 21 ( $\times 400$ ), arrows: mouse 12.5 dpc PGC IgG positive gPGCs



**Fig. 5.** Changes of cultured genital ridge observed by SEM.

A: gPGCs came out from GR after cultured for 1 day. B: gPGCs gathered the surface of GR after cultured for 3 days. C: gPGCs and fibroblast (FBC) spread from GR cultured for 7 days. D: gPGCs on FBC of 7 days culture. E, F: Colony of gPGCs on FBC of 14 days culture.



**Fig. 6.** Sex determination of three donor embryos by PCR method.

1: size marker, 2~4: three donor embryos were female. 250bp is common band and 370bp is W chromosome specific band.

れた(キメラ率7.5%)。また、No.16(♂)の後代検定では11週間で161個の卵が得られ、うち125個が有精卵であり、81羽が孵化し(孵化率64.8%)、うち2羽に黒い刺毛をもつF<sub>1</sub>が確認された(キメラ率2.5%)。したがって、これら2羽のキメラ率は平均で5.0%であった。方法2のNo.24は20週間で302個の卵を生産し、うち251個が有精卵であり、194羽が孵化し(孵化率77.3%)、うち1羽に黒い刺毛をもつF<sub>1</sub>が確認された(キメラ率0.52%)。方法1のNo.18と方法3の3羽の雄(No.34,36,38)からは、黒い刺毛をもつF<sub>1</sub>を確認することはできなかった(Table 2)。なお、雌の仮キメラ10羽は、雄WLと人工授精したが、試験期間9~17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(データは示していない)。後代検定の結果生まれた黒い刺毛を持つF<sub>1</sub>に異常は認められず、順調に成長し50日を経ても黒い刺毛は消えなかった(Fig.7)。

**Table 1** Transplant situation of chimera chickens produced by manipulation

Method	Manipulated chicken No.	Remove of thin albumen (ml)	Removed blood of recipient embryo (μl)	Transferred stage of recipient embryo	Transplant situation of gPGC	Sex
1	11	0	bloodletting	13	8embryos	♀
	12	0	blood 2μl	2	18embryos	♂
	13	1.5	blood 1μl	4	♀*	♀
	14	1.5	blood 1μl	4	♀*	dead
	15	1.5	blood 1μl	4	♀*	♀
	16	1.5	blood 1μl	4	♀*	♂
	17	1.5	bloodletting	14	♀*	♀
	18	1.5	bloodletting	14	♀*	♂
	19	1.5	blood 1.5μl	4	♀*	♀
2	21	2-		14	12embryos	dead
	22	2-		14	12embryos	♀
	23	2-		14	12embryos	♀
	24	2	blood 1μl	4	15embryos	♂
	25	2	blood 0.5μl	4	15embryos	dead
	26	2	blood 2μl	4	15embryos	dead
	27	2-		14	14embryos	♀
3	31	0	bloodletting	14	3embryos	♀
	32	0	bloodletting	14	3embryos	dead
	33	0	bloodletting	14	3embryos	dead
	34	0	bloodletting	14	3embryos	♂
	35	0	bloodletting	13	3embryos	dead
	36	0	blood 2.5μl	2	2embryos	♂
	37	0	blood 0.5μl	2	2embryos	♀
	38	0	bloodletting	13	2embryos	♂

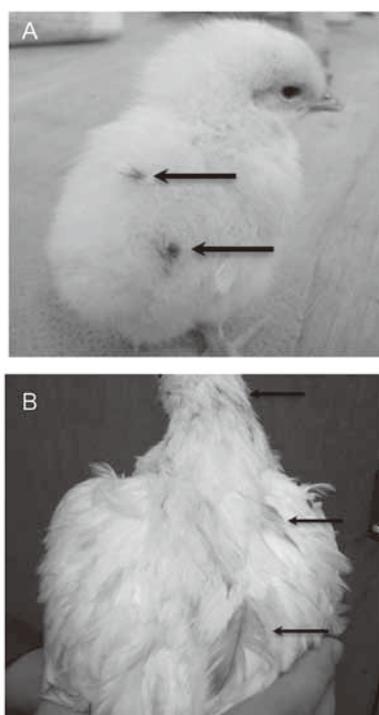
※Sex determination by PCR method, Method1: gPGCs were collected from JR-GR and transplanted into recipient WL embryos, immediately. Method2: Frozen JR-gPGCs were transplanted into recipient WL embryos. Method3: gPGCs cultured for 48hr were transplanted into WL recipient embryos.

**Table 2** Results of progeny test for male chickens produced by manipulation

Method	Manipulated chicken No.	Test periods (weeks)	Number of produced eggs	Number of fertilized eggs (%) <sup>*</sup>	Number of hatched chicks (%) <sup>**</sup>	Number of F <sub>1</sub> chicks (%)
1	12	13	237	183(77.2)	106(57.9)	8(7.5)
	16	11	161	125(77.6)	81(64.8)	2(2.5)
	18	11	136	102(75.0)	44(43.1)	0
22	42	0	302	251(83.1)	194(77.3)	1(0.52)
3	34	4	104	92(88.5)	69(75.0)	0
	36	47	2	69(95.8)	58(84.0)	0
	38	47	6	75(98.7)	64(85.0)	0

<sup>\*</sup> The rate of fertilized eggs is number of fertilized eggs / number of produced eggs.

<sup>\*\*</sup> The rate of hatched chicks is number of hatched chicks / number of fertilized eggs.



**Fig. 7.** Result of progeny test.

A chick was produced from chimeric chicken (No.12, male) × WL female. This chick had the black stinging feather. A: 1day old chick, B; chicken after 50 day old, arrows are black stinging feather.

## 考 察

本研究では後代検定の結果、No.12、16、34の3羽の雄が生殖系キメラであることが証明され、その生殖系キメリズムは0.52～7.5%であった。Naitoら(1994)は、ドナーとレシピエントの品種間の産卵性が生殖系キメリズムに影響していると報告した。WLのcPGCsを横斑プリマスロック(YP)へ移植した場合、WLに由来する個体は77～95%の確率で生まれたが、その逆の組み合わせでは、YPに由来する個体は2.0～46%と低い確率であった。その原因は、両品種の産卵性によるもので、YPへ移植されたWLの生殖細胞の増殖が、YPの

生殖細胞の増殖を上回ったため、多くのドナー由来の後代が生まれてきたと推察している。本実験で使用したJRは、おそらくYPの産卵性より劣っていると考えられ、産卵性の高いWLへ移植していることから、移植されたJRのgPGCs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。JRのような貴重なニワトリを使用した報告(Kuwanaら, 2006)では、KDのcPGCsをWLに移植し、雌の移植鶏6羽の後代検定を行ったところキメラ率は0～5.3%で雄は確認されず、本報告と同様生殖系キメリズムは低いものであった。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PGCsでも優先的に生殖巣へ導入され、分化する方法を検討する必要がある。Naitoら(1999)は、レシピエント胚とドナー胚の性をDNAから決定し、その性に基づいて同性キメラと異性キメラを作出し、その生殖系キメリズムについて検討した。その結果、同性キメラの方が異性キメラと比較して生殖系キメラになる確率が高く、さらにその生殖系キメリズムも高いことを示唆した。本研究では、No.13～19がドナー胚の性が雌であったことから、No.16は異性キメラである。したがって、No.16のキメリズムがNo.12と比較して低かった可能性がある。Naitoら(1999)は、生殖系キメラ雄の精子からW精子の存在を確認した。これは、W染色体を有する雌PGCsが、雄個体内でW染色体をもつ精子にまで分化したことを示唆している。残念ながら、No.16はW精子の存在を検討する前に死亡した。しかし、JR雌のPGCsがWL雄の精巣に入って、JRの精子に分化したことは間違いない。

Tajimaら(1998)は、WL5日目胚のgPGCsを液体窒素で保存し、YPに移植して生殖系キメラを得ている。その雄2羽の生殖系キメリズムは3.17%と18.09%、雌2羽のそれは0～9.33%であった。また、Kuwanaら(2006)は凍結融解したKDのcPGCsをWLに移植し、

その生殖系キメラは最大でも5.3%と報告している。本研究の方法2では、gPGCを凍結して移植したNo.34(♂)の生殖系キメラは0.52%と低かった。しかし、gPGCsを凍結融解してもキメラを作出することは可能であった。このことから、JRから採取したgPGCは、凍結・融解後もWL胚の血管に移植することによってGRに到達し、生殖能力を有する精子へと分化したことが示唆された。ニワトリ種卵の凍結保存が確立しない現状では、伊藤ら(2011)が報告しているようにPGCsを凍結保存するバンクは、絶滅品種の遺伝資源の保存に有効と思われる。

交配後125日目のマウス胚から採取したGRをラット血清添加DMEM培地で培養すると、GRからアルカリフォスファターゼ陽性のgPGCが移動するが、FCS添加では確認されない(Mayanagiら, 2003)。本研究においても、マウスと同様にニワトリGRからPAS陽性、抗SSEA-1抗体陽性、FITC-ウサギ抗マウス12.5dpcPGC IgG陽性のgPGCsがFBC上を移動したが、FCS添加では観察されなかった。この細胞は培養21日目でも、PAS陽性、SSEA-1陽性、FITC-ウサギ抗マウス12.5dpcPGC IgGにも反応することからPGCの特徴を保ったまま培養されることが示唆された。しかし、アメーバー状に分化した細胞も認められることから、抗Oct3/4などの他の分化指標となる抗体との反応を詳細に検討する必要がある。またSEMの観察では、FBC上に散らばったgPGCsが、培養14日目にはコロニーを形成し、細胞表面の構造が変化することが観察された。ニワトリPGCsは、卵黄周縁動静脈から胚のGRに入り込み定着するため、球状やアメーバー状に形態を変化することが知られている。したがって、本研究の体外培養においてもPGCsは体内と同じ振る舞いをしたものと推察される。

本研究では、培養48時間目のJRのgPGCsをWL胚の卵黄周縁動静脈に移植したが、生殖系キメラを作出することはできなかった。しかし、成長因子を添加しなくともPAS陽性、SSEA-1陽性、抗マウス12.5dpcPGC IgG陽性のgPGCsを21日まで培養することは可能であった。Parkら(2003)は、各種成長因子を添加した培地で培養したgPGC由来EG細胞を移植し、生殖系キメラを作出した。彼らは、GRから取り出したgPGCsをEG細胞化する場合、培養期間を長くすることで、GRから取り出された環境変化によるダメージが回復する可能性を示唆した。したがって、移植した培養48時間のgPGCsはダメージを受けたまま移植されたと考えられる。菊池ら(2000)は、ニワトリcPGCsの表面構造は孵卵開始54時間では凹凸が激しく、60、70時間では凹

凸がなくなることをSEMで観察した。本研究でも、培養14日のgPGC表面の凹凸は7日目と比較して少なくなることから、cPGCsに近い状態のgPGCsを移植することによって、生殖系キメラが作出できる可能性がある。

## 謝 辞

本研究は、財団法人さんりく基金・共同研究シーズ指向型の研究助成(2004～2006)をいただき実施した。また、岩手県農業研究センター畜産研究所の鶏舎の職員の皆様に多くのご協力を頂いた。ここに記して謝意を申し上げる。

## 引用文献

- Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stage in development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92. 1951.
- Itoh Y, Suzuki M., Ogawa A., Munechika I., Murata K. and Mizuno S. Identification of the sex of a wide range of carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. *J. Here.*, 92: 315-321. 2001.
- 伊藤なつき、川越雄太、斉藤靖史、佐藤直人、斉藤美緒、力丸宗弘、辻本恒徳、斉藤文也、松原和衛. 地鶏や野鶏等の貴重家禽から分離した始原生殖細胞(PGCs)の凍結保存の試み. *日本家禽学会誌* 48: J6-J13. 2011.
- 菊池あやこ、松原(伊藤)和衛、高橋壽太郎、川畑享子、後藤太一. ニワトリ始原生殖細胞の同定と観察. *東北畜産学会報*, 50: 24-30. 2000.
- Kuwana T, Kawashima T, Naito M, Yamashita H, Matsuzaki M and Takano T. Conservation of a threatened indigenous fowl (*Kureko Dori*) using the germline chimeras transplanted from primordial germ cells. *J. Poult. Sci.*, 43: 60-66. 2006.
- Mayanagi T, Ito K and Takahashi J. Association of culture of mouse urogenital complexes in media containing rodent sera with the appearance of primordial germ cell-like cells. *Reproduction*, 125: 519-526. 2003.
- Naito M, Nirasawa K and Ohishi T. Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *J. Exp. Zool.*, 254: 322-326. 1990.
- Naito M, Tajima A, Yasuda Y and Kuwana T. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mole. Reprod. Dev.*, 39: 153-161. 1994.

- Naito M, Tajima A, Yasuda Y and Kuwana T. Donor primordial germ cell-derived offspring from recipient germline chimaeric chickens: absence of long term immune rejection and effects on sex ratios. *Bri. Poult. Sci.*, 39:20-23. 1998.
- Naito M, Matsubara Y, Harumi T, Tagami T, Kagami H, Sakurai M and Kuwana T. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *J. Reprod. Fert.*, 117: 291-298. 1999.
- Park TS, Jeong DK, Kim JN, Song GH, Hong YH, Lim JM and Han JH. Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol. Reprod.*, 68: 1657-1662. 2003.
- Rikimaru K, Ito N, Nakamura Y, Takahashi D, Ono M, Komatsu M and Matsubara K. Identification of germline chimeric chickens produced by transfer of primordial germ cells using a Hinai-dori-specific microsatellite marker. *J. Poult. Sci.*, 48: 281-291. 2011.
- Simkiss K, Rowlett K, Bumstead N, Freeman BM. Transfer of primordial germ cells DNA between embryos. *Protoplasma*, 151: 164-166. 1989.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y and Kuwana T. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology*. 40: 509-519. 1993.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y. and Kuwana T. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *J. Exp. Zool.*, 280:265-267. 1998.
- Vick L, Li Y and Simkiss K. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 251: 179-182. 1993.
- Walsh PS, Metzger DA and Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10: 506-513. 1991.
- Wentworth BC, Tsai H, Hallett JH, Gonzales DS and Rajcic-Spasojevic G. Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differentiation. *Poult. Sci.*, 68: 999-1010. 1989.
- 安永千秋, 豊坂加奈, 辻本恒徳, 斎藤靖史, 大澤健司, 三宅陽一. 動物園鳥類および野生鳥類における PCR 法による雌雄判別法の検討. *日本野生動物医学会*, 11: 43-48. 2006.
- 吉田 登, 岩本 渉, 吉田啓記, 松原和衛, 斎藤靖史, 御領政信, 小松繁樹, 高橋壽太郎, 萱野裕是. 岩手地鶏の始原生殖細胞移植による生殖系キメラ個体作出の可能性. *東北畜産学会報*, 56: 21-26. 2006.

## **Production of germ line chimera by transplantation of primordial germ cells derived from a local native breed, *Iwate Jidori***

Kazuei MATSUBARA<sup>1</sup>, Keiki YOSIDA<sup>1</sup>, Yuta KAWAGOE<sup>1</sup>, Noboru YOSIDA<sup>2</sup>, Yasushi SAITOH<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

<sup>2</sup>Iwate prefecture government, Morioka 020-8570, Japan

<sup>3</sup>Cryobiofrontier Reserch Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

Correspondence: Kazuei MATSUBARA (Tel&Fax: +81-19-621-6160; E-mail: kazuei@iwate-u.ac.jp)

### **Abstract**

*Iwate Jidori* of local native chicken is the Japanese protected species that the extermination is felt uneasy about. In this study, we transplanted primordial germ cells (gPGCs) isolated from a genital ridge (GR) of *Iwate Jidori*, *Japanese Red (JR)* in *white Leghorn (WL)* and produced germ line chimera. We transplanted JR gPGCs of 6.5 days (stage 28-29) to an egg yolk circumference blood vessel of WL by three following methods. We transplanted the isolated gPGCs immediately (Method 1), after freeze thaw (Method 2), after culturing it with the culture media which added chick serum or FCS for 48 hours (Method 3). As the results, 24 chicks hatched from an operation embryo, and 17 chicks reached the sexual maturation. We performed a progeny test by crossbreed of these temporary chimera and WL which reached the sexual maturation. In Method 1, ten progeny with black stinging hair was produced by crossbreed of two temporary chimeric males and WL (♀). The chimerism was 5.3%. In Method 2, one progeny with black stinging hair was produced by crossbreed of one temporary chimeric male and WL (♀). The chimerism was 0.5%. In Method 3, the chick with black stinging hair was not produced from temporary chimeras. Therefore, gPGCs isolated from JR and transplanted into WL differentiated in WL embryos normally, and it was confirmed to get the function as the sperm. We crossbred similarly nine female temporary chimera and WL (♂), but were not able to produce the chimera. Also, chicken gPGCs moved from a GR similar to a mouse, and formed colonies by culturing a GR with chick serum. But, this phenomenon was not confirmed with addition of FCS. Furthermore, gPGCs of the culture 21th day was PAS positive and SSEA-1 positive. Therefore, we succeeded to culture chicken gPGCs without growth factors.

**A keyword:** *Iwate Jidori*, primordial germ cells, germ line chimera, culture