

ニワトリ胚を用いた骨の成長促進に関与する物質の分析

6年A組 瀬古 薫奈

指導教員 櫻井 昭

1. 要約

脊椎動物の身長差には、遺伝以外にも外的要因が関係しているといわれている。そこで本研究では、胚発生を観察しやすいニワトリ胚を用いて、骨の形成にかかわっているといわれている物質を、有精卵に直接与え骨形成がどのように変化するか調査した。研究成果として、人工的に物質を加えるより、もともと備わっている養分で育てる方が速く正常に成長できるという結果が得られた。

キーワード 身長促進, ニワトリ胚, 透明骨格標本, 軟骨細胞

2. 研究の背景と目的

骨では、骨幹と骨端の間にある軟骨細胞が増えることで、伸長成長がおこることが知られている。その為、身長差には骨の形成にかかわっており、遺伝情報以外にも軟骨細胞の増殖にかかわる物質の成分が影響を及ぼすのではないかと考え、胚発生時に与える物質の成分の違いと骨の形成速度の関係を調べることにした。本実験では、骨の形成速度をニワトリ胚の発生時期における骨格形成量を比較することで計測できないかと考え、骨格を染色し比較する実験を行った。また、ニワトリ胚に加える物質としては、カルシウムとビタミンDとした。カルシウムは骨の主成分のため、カルシウムを加えて発生させると通常の条件下より、骨の成長が促進されると期待したからである。ビタミンDは、腸管からのカルシウムの吸収を促進し、血液に入ったカルシウムを骨まで運ぶ働きがあることが知られているため、カルシウムとともに加えることでより効果が期待できると考えたからである。

3. 研究内容

3.1 研究材料

本研究に用いたニワトリ胚は、竹内孵卵場で実験用に販売している白色の有精卵を使用した。37℃～38℃に設定したインキュベーターで、乾燥を防ぐために蒸留水を入れたビーカーをそばに設置し湿らしたティッシュの上に乗せて発生させた。参考文献²⁾より15日胚以降は前肢と後肢において関節以外の部分の硬骨化はほぼ終わっているとのことだったため、実験では最長で14日胚まで発生させた。5日胚辺りからは図1の様目や血管、そして心臓が動いている様子が確認できた。その後体が大きくなると共に、短い肢が四本伸びてきて成長する様子が確認できた。

3.2 研究方法

3.2.1 予備実験

本研究で用いたニワトリの有精卵の通常条件下での、胚の成長速度を調べるための予備実験を行った。有精卵5個をそれぞれ違う日数発生させ、胚を取り出す操作を3

回実施した。実施条件は以下の2つを採用した。

(1) 成長の進度を適宜確認するために卵の殻に穴をあけ、ラップで蓋をした状態で胚発生させ、観察した(図1)。

(2) 有精卵15個のうち2個はパラフィルムやプラコップを利用して人工殻を作り^[1]、卵から胚を取り出しその中で胚発生を行った。

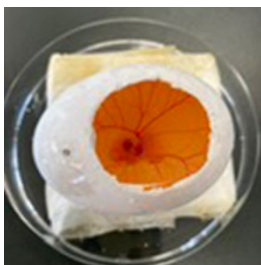


図1 有精卵の殻を一部取り除いた様子
予備実験では発育の観察を行うためにこの方法を採用したが、既存のデータより発育が遅かったため、研究では採用しなかった。

3.2.2 本実験

3.2.2.1 ニワトリ胚への物質注入

産卵されてから4日目の有精卵に、表1に示す物質を、注射器を用いて注入し、注射器によってあけられた穴はセロテープで留め、胚発生をつづけた。

サンプル番号	物質
1	水 0.5mL
2	水0.5mLに乳酸カルシウム0.05gを溶解したもの
3	水0.5mLに乳酸カルシウム0.05gとビタミンD0.001gを溶解したもの

表1 有精卵に注入した物質

水とカルシウムの分量は参考文献^[1]に記載の分量を使用した。ビタミンDの分量は調べても見当たらなかったため人間の摂取目安量を調べ、0~5か月の乳児の摂取目安量がカルシウム250 μ Lに対し5 μ Lであったため、そこから比を求めて使用した。

その後同じ発生日数(15日胚)の段階で孵卵器から有精卵を取り出して発生を中止し、速やかに卵を割って胚を取り出した(図2, 図3)。取り出した胚は、卵黄や胚膜を除去した後10%ホルマリン溶液で2か月~3か月間固定処理した。

3.2.2.2 透明骨格標本の作製

四肢の形態形成過程を観察するのに有効であることから、軟骨は青に、硬骨は赤紫に染め出すことができる二重染色法^[2]を用いた。

以下、染色方法を記す。

- ① 固定液洗浄：ホルマリンを除去するために、半日から1日程度蒸留水に浸した。
- ② 表皮剥離及び内臓の除去：骨格観察の障害になる表皮及び内臓器官を除去した。必要に応じて眼球の除去も行った(図4)。
- ③ 脱水：軟骨染色処理の下処理としてエタノールによる脱水を行った。脱水処理のために、標本を25%、50%、75%のエタノール溶液に低濃度から順に各1時間程度浸し、最終的に95%エタノールで1晩置いた。
- ④ 軟骨染色：軟骨染色にはアルシャンブルーを用いた。染色液として95%エタノール：氷酢酸=4:1で調整した溶液にアルシャンブルーを2%になるように加えたものを用意した。作製した染色液は長期間の使用で劣化するため、使用は3回程度とした。軟骨染色の進行は比較的ゆっくりと進むため、標本の大きさによって異なるが、2日間から5日間の処理を行った(図5)。
- ⑤ 染色液除去：次の処理のために、エタノールを除く処理を行った。この過程で軟骨以外の組織に含まれる余分な染色液を除くことができる。処理は75%、50%、25%のエタノール溶液に高濃度から順に、標本

を各 1 時間程度浸し、最終的に蒸留水に 1 晩置いた。

⑥ 蛋白質分解前処理：次のトリプシン処理のため、標本をアルカリ処理した。処理には四ホウ酸ナトリウム飽和溶液を使用し、1 日程度浸した。

⑦ 蛋白質分解：30%四ホウ酸ナトリウム溶液に、0.5 から 1%になるように粉末のトリプシンを溶かし酵素液とした。処理には TAITEC のウォーターバスシェイカーを使用し、水温 37.5 度の条件下で軽く震盪させた。処理時間は標本の大きさによって加減したが、若い胚ではすぐに標本が崩壊したため、トリプシン処理は 7 日胚以降に限定した。

⑧ 透明化：トリプシン処理により十分に透明化が進む標本もあったが、次の硬骨染色の下処理も兼ね、アルカリ溶液による透明化を併用した。溶液は 2%水酸化カリウム溶液を使用した。

⑨ 硬骨染色：アリザリン溶液により硬骨の染色を行った。染色液は事前に調合したアリザリン原液（1% 包水クロラール 120ml, グリセリン 20ml, 氷酢酸 10ml を混合し、アリザリン粉末 100mg を溶解させる）を 2%水酸化カリウム溶液に 6%程度になるように加えたものを使用した。硬骨染色は進行が速く、長い時間漬けることにより筋肉などの染色も起こるため、長くても 1 日程度の処理とした(図 6)。

⑩ 染色液除去：余分な染色液を除去するために 50%エタノールに 1 日程度浸した。

⑪ 脱脂：白く残る脂肪組織を除去する目的で必要に応じてキシレンによる脱脂を行った。しかし、事前に手作業で脂肪組織の除去を行うことによりこの工程は省くこと

ができるため、最終的にこの工程は省略した。脱脂した場合はキシレンを除去するために 70%程度のエタノールに 1 晩浸した。

⑫ グリセリン置換：標本は最終的に 100%グリセリンに包埋するが、十分な浸透を行うため、25%、50%、75%のグリセリンに、低濃度から順に、各 1 時間程度浸した。グリセリン溶液は 2%水酸化カリウムによる希釈で作成したが、この工程の前半でさらに透明化が進み、余分な染色液を除去することもできた。



図2 卵から取り出した胚

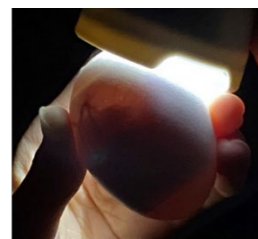


図3 卵内の胚の様子

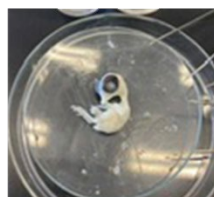


図4 眼球除去の様子

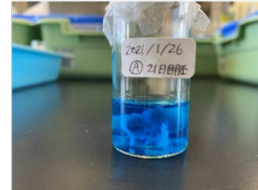


図5 軟骨染色



図6 硬骨染色

4. 結果

きれいに骨格標本が得られたのは予備実験を除く二十二個体のうち次の 4 個体のみだった。また、図 7 の骨格標本のような骨格が明らかにわかるような染色ができなかった個体は図 8 のように染色され、身体の形や骨の染色の区別がつかなかった。

2021.6.3 生注入サンプル 1 の個体は、背骨から 2 つに分かれていた。原因は注射器を刺す際に胚に傷が入ったか水によって何らかの影響がでたのではないかと予想した。



2021.6.20生
注入サンプル 1



2021.6.20生
注入サンプル 1

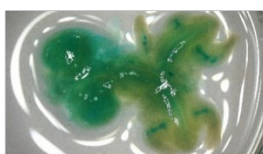


2021.5.13生
注入サンプル 1

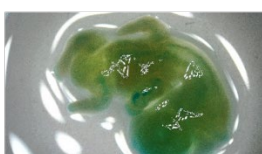


2021.5.13生
注入サンプル 2

図7 染色が鮮明な標本例



2021.6.3 生
注入サンプル 1



2021.6.3 生
注入サンプル 2



2021.6.3 生
注入サンプル 3

図8 染色が鮮明ではない標本例

5. 考察

身長は骨の端にある骨端線（成長軟骨板）という部分で伸びていく。そのため、軟骨と硬骨の量を比較して与えた物質と成長量の関係を調査しようと考えていたが、実際得られたデータでは、硬骨まで成長が進んだものがなく軟骨のみが染色されたため、軟骨と硬骨の比較はできなかった。また、

より多くの個体の結果が得られたら比較できたものの、同じ条件下でも成長が進まない個体の方が多く、比較対象にできたのは上記の4個体のみだったため個体同士の比較はうまくいかなかった。

しかし、その4個体のうち3個体が水のみ条件であったことと、全体的に見てカルシウムやビタミンDを加えた個体は水のみ個体より成長が止まっていたり遅れていたりする個体が多かったことから、人工的に物質を加えるより、もともと備わっている養分で育てる方が速く正常に成長できるという考察が得られた。

6. 今後の展望

得られた透明標本から、頭～尾までの関節の数や面積を数え、物質の及ぼす影響をさらに比較していきたい。軟骨（成長軟骨板）の軟骨内骨化（骨に置き換わる現象）によって骨は長軸方向に伸びていくことを利用して、硬骨と軟骨の染色分けの検討を重ね、軟骨と硬骨の物質とのかかわりや成長段階を比較していきたい。

7. 参考文献

- [1] 田原豊「鳥類胚の無殻培養法の開発と教材化」
- [2] 小杉山晃一, 柳澤秀人, 前島慎吾「発生学学習教材としてのニワトリ胚の活用」

8. 謝辞

今回の研究を行うにあたり、指導教員の櫻井先生には多大なご指導を賜りました。深くお礼申し上げます。