

発生学学習教材としてのニワトリ胚の活用

Practical use of chick embryos as embryology learning materials

小杉山晃一、柳澤秀人、前島慎吾

KOSUGIYAMA Koichi, YANAGISAWA Hideto, MAEJIMA Shingo

概要

ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) の有精卵を利用して胚発生の過程を観察した。観察材料として、通常のホルマリン固定標本の他、透明骨格標本を併用した。この研究を通して、四肢の形成過程、長骨の骨化（硬骨化）過程などを詳細に観察することができた。ニワトリ胚を活用することにより、高等学校の生物（発生分野）でこれまで欠落していた、胚発生後期の学習に役立つ効果的なプログラムを作成できることが示された。

1. はじめに

高等学校の『生物 I』では、発生とその仕組みの理解が重要な課題としてあげられており、器官形成についても代表的な例を用いて学ぶこととされている¹⁾。この背景には、様々な生物の発生過程の学習を通して、ヒトの形態形成の過程を理解し、ひとつの受精卵からどのようにして複雑な組織や器官が形成されるのかを知るというねらいがある。特に近年は、移植医療等の進歩によって、一般市民に対しても医学リテラシーが求められる時代となっている。生きた教材を活用した学習は今後ますます重要視されることが予想される。

しかし、発生学分野に関して、実際に教科書で取り上げられている動物は、ウニ（棘皮動物門）とカエル（脊索動物門両生綱）が主であり、ヒトを含む分類群である哺乳類（脊索動物門哺乳綱）や、発生過程の似ている鳥類（脊索動物門鳥綱）の動物が教材として取り上げられることは少ない。

ウニの受精卵はヒトと同じ等黄卵であるため、初期の卵割の過程を学ぶ教材としては有効である。しかし、系統分類学的にヒトと離れた動物であるため、原腸胚以降はヒトとは全く異なる発生過程をとる。そのためウニの発生から学ぶことのできる内容は限定されている。一方、カエルは原腸胚から神経胚までの期間における胚葉分化を学ぶ教材としては有効で、三胚葉や神経管の形成などはヒトの発生過程とある程度対応している。しかし、この期間以外での対応は少ないため、教材としての活用にはやはり限度がある。

動物発生の後期に見られるダイナミックな形態形成過程を学ぶには、神経胚以降の、頭部形成、四肢

形成といった時期の胚の観察が重要である。そのためには、よりヒトに近い分類群の動物を用いることが望ましい。

胚発生後期の形態形成過程を観察するには、ヒトに近い動物であるマウスやラット（いずれも脊索動物門哺乳綱）を用いることが理想的であるが、有胎盤動物から胚や胎児を得るには、母親の子宮を切開して直接取り出す以外の方法はない。そのため、必要となる胚や胎児の個数に応じて多数の親個体を処理しなくてはならなくなる。必要な材料を準備する労力とともに、生徒が抱く心理的負担も大きいと推測される。一方、鳥類では、母親が体外に産み落とした有精卵から胚を得ることができるため、母親を処理する必要はない。特にニワトリの場合、産卵期には継続して多数の有精卵が入手できるので、教材として考えた場合これらの点でニワトリが優位となる。

本研究の背景として、著者らはニワトリを飼育し、その行動や形態を含めた文理両分野に渡る研究を行ってきた。ニワトリ胚の発生過程の観察は、これらの研究の基礎となる知見を得るために実施しているものである。今回、ニワトリ胚の教材としての優位性に注目し、高等学校のカリキュラムに適合する具体的な教育プログラムの可能性を検討した。

2. 目的

ニワトリ胚を活用することが、特に高等学校の生物科目における発生分野の学習に効果的であることを示すのが目的である。

本研究に先立ち、孵化までのすべての日齢の標本を作成し、それらの特徴を詳細に観察した。観察の方法として、卵から取り出した直後の生きた状態の形態や、固定標本による外部形態の観察だけでなく、透明骨格標本を作成し、全身の軟骨及び硬骨の形成過程も合わせて観察した。

これを元にして、教育プログラムとして有益なテーマの抽出を目指した。

3. 方法

(1) 材料の入手

ニワトリの胚を得るために、飼育している個体が産んだ有精卵を使用した。継続的にまとまった卵数を得ることができるため、採卵用の品種として主にウコッケイ（内種は白及び黒）を使用した。比較のため、フェニックス（内種赤笹）、ポーリッシュ（内種シルバー）といった品種の有精卵も使用した。表1に、最終的に標本作成に用いた品種の内訳を示した。

表1 品種別作成標本数

品種名	作成した標本数
ウコッケイ	49
フェニックス	1
ポーランド	1

※採卵した卵のうち半分近くは発生しなかったため（無精卵の可能性が高い）、実験で使用した全卵数及び品種はこれよりも多い。

（2）胚発生

得られた有精卵はできるだけ速やかに孵卵器に入れ加温を開始した。孵卵器はアニテックの小型孵卵器を使用した。孵卵器内の環境は、温度 38 度湿度 60%程度を維持し、外付けの自動転卵装置により 1 時間に 1 回の頻度で転卵した。

発生段階の確認は原則として日齢によって行った。日齢は、孵卵器に入れてから 24 時間後を 1 日胚とし、その後、できるだけ正確に 24 時間を 1 日として日齢を加算した。日齢と併用して、Hamburger & Hamilton によるニワトリ胚の発生段階表（以下 H・H ステージ）を利用した²⁾。日齢と H・H ステージの対応は表 2 の通りである。H・H ステージの各段階は、以下 st. と表記する。

なお、4 日までの初期胚及び、変化の小さな 18 日胚以降の胚は、今回の解析の対象とはしなかった。

表 2 日齢と H・H ステージの対応

日齢	H・H ステージ
5 日胚	25 ~ 27
6 日胚	28 ~ 29
7 日胚	30 ~ 32
8 日胚	33 ~ 34
9 日胚	35
10 日胚	36
11 日胚	37
12 日胚	38
13 日胚	39
14 日胚	40
15 日胚	41
16 日胚	42
17 日胚	43

（3）標本作製

a) ホルマリン固定標本

24 時間の周期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。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 ヶ月から 3 ヶ月程度処理した。透明骨格標本にしない場合、長期間保管の可能性も考慮し、ホルマリンを除去したのち、改めて 95%エタノール固定を行い保管した。12 日胚以降は、体表に羽毛が形成されており観察の障害になるため、胚に損傷を与えないよう注意しながら羽毛を除去した。

透明骨格標本にする胚は、ホルマリン固定の後、次の b) の通りに処理を進めた。

b) 透明骨格標本

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、透明骨格標本の作製においては二重染色法

を採用した。二重染色法を用いることにより、軟骨は青に、硬骨は赤紫に染め出すことができる。透明骨格標本の作製方法にはいくつかの手順や試薬による違いがあるが^{3,4,5,6)}、事前の予備実験により、ニワトリ胚の標本作製に適した条件を探し、下記の通り独自の作製手順を採用した。

作製手順は次の通りである。

- 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。
- ③ 脱色：ウコッケイの場合は、筋肉や骨にもメラニン色素を含み、骨格観察の障害になるため、11日胚以降について1%過酸化水素溶液で脱色を行った。
- ④ 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。
- ⑤ 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。
- ⑥ 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。
- ⑦ 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。
- ⑧ 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。
- ⑨ 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。
- ⑩ 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。
- ⑪ 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。
- ⑫ 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。
- ⑬ 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。

（4）胚の観察

作成した胚の標本は、双眼実体顕微鏡で観察し、すべての日齢で写真撮影を行った。顕微鏡はオリンパスのSZX-ILLD100を使用し、撮影はNIKONのCOOLPIXP6000を使用した。5日胚から7日胚までのホルマリン固定標本は、組織の透明度が高く、陰影のある写真を撮影することができなかつたため、全体を核染色用のヘマトキシリン溶液で不透明化して撮影した。11日胚以降の大きめの胚については、顕微鏡を用いなくて直接撮影した。標本撮影にあたっては、ホルマリン固定標本は落射照明を、透明骨格標本は透過照明を用いた。

4. 観察結果

（1）四肢の形成経過

胚の成長は次の通りである。特に変化の急速な5日胚から7日胚までは図1から図9として写真を示した。

① 5日胚（st.25～27） 図1から図3

前肢及び後肢の原基（肢芽）が発芽する。肢芽はドーム状で指の形は明瞭に識別できる状態にはなっていない。透明骨格標本では軟骨の形成が十分ではないため透明化の過程で形が崩れてしまうことが多い。

② 6日胚（st.28～29） 図4から図6

5日胚と比較して形態は大きく変化する。前肢及び後肢に関節（肘、膝）が形成され始め、板状の手足に指の形成が始まっていることが確認できる。頭部では嘴の先端が確認できる。透明骨格標本では関節部分は不明瞭だが、骨格の形成は進んでいる。ただし硬骨化の兆しはなくすべて軟骨である。

③ 7日胚（st.30～32） 図7から図9

頸部が細くなり、頭部の形状が明確になる。前肢、後肢ともに伸長し、尾部の形状も明確になる。将来指を形成する部分と、指間の膜状の組織が識別できるようになる。

④ 8日胚（st.33～34）

ニワトリ胚の基本的な形状が整う。指間の膜は退化し、前肢・後肢ともにはっきりとした形状を現す。この段階までで基本となる形態形成はほぼ完成する。この後のプロセスは主に肥大成長に移っていく。しかし、骨格はまだ軟骨が中心で、硬骨化は進んでいない。

（2）長骨の硬骨化過程

長骨とは長く伸びた棒状の骨を総称したもので、大腿骨、上腕骨など、四肢の枠組みを形成する重要な骨を含む。ここでは、前肢の上腕骨、橈骨、尺骨、後肢の大腿骨、脛骨、腓骨に注目し、その形成の過程を観察した。硬骨化の進行が明確に確認できるいくつかのステージについては図10から図12とし

て写真を示した。

① 5日胚 (st.25 ~ 27)

骨格の染色が明瞭になり、軟骨細胞の集積が進んでる様子が確認できる。しかし、透明化処理の影響を受けやすく、末端の組織の形状は明瞭ではない。

② 6日胚 (st.28 ~ 29) ~ 10日胚 (st.36)

軟骨の染色が明瞭になり、発生の進行する様子が詳細に観察できる。脊椎骨、肋骨、胸骨等の主要な骨格形成の進行が確認できる。しかし、この期間内で軟骨が硬骨に置き換わる様子は確認できない。

③ 11日胚 (st.37)

下腿脛骨の中心部で軟骨染色に反応しない空白が生じる。おそらく硬骨化が進行しつつあるものと推測できるが、硬骨染色にも反応しない。硬骨成分の沈着が十分ではないと考えられる。

④ 12日胚 (st.38)

脛骨の中心部が硬骨染色に反応し始める。十分な硬骨化が進んでいることが伺える。前肢では硬骨化はまだ見られない。

⑤ 13日胚 (st.39) 図10

脛骨に続いて大腿骨の中心部分でも硬骨染色が確認できる。また、足根中足骨(ふしよ部)でもわずかな硬骨が確認できる。

⑥ 14日胚 (st.40) 図11

後肢では、関節部分及びその周縁部分以外がほぼ硬骨化した。前肢では上腕骨で硬骨化が確認できるが、指骨及び中手骨部分では硬骨の染色は見られない。

⑦ 17日胚 (st.43) 図12

15日胚以降、長骨の硬骨化は中央から両端に向けて進行し、前肢では上腕骨と下腕の二つの骨で、後肢では大腿骨と脛骨において、関節以外の部分の硬骨化はほぼ終わっている。また、17日胚では、前肢・後肢ともに指の骨で硬骨化が確認できる。この状態で21日目には孵化するが、孵化直後の個体においても関節の硬骨化は進んでいないことを確認している。

(3) 前肢の手根中手骨癒合過程

鳥類の前肢は飛翔のために特殊な形態に変化していることが分かっているが、その形成の過程を観察した。特徴のわかりやすいいくつかのステージについては図13から図15として写真を示した。

① 6日胚 (st.28 ~ 29) 図13

3本の指骨及び中手骨(上から第1指、第2指、第3指)が確認できるが、指のひとつひとつは独立している。

② 7日胚 (st.30 ~ 32) 図14

第2指と第3指が癒合しつつある様子が確認できる。第1指は離れたままである。

③ 12日胚 (st.38) 図15

8日胚以降、第2指と第3指の癒合が進行し、12日胚ではほぼ一体構造の手根中手骨となっている様子が確認できる。この後、癒合した骨全体で翼を支える板状の構造になる。この時期にはまだ硬骨化は起こっていない。

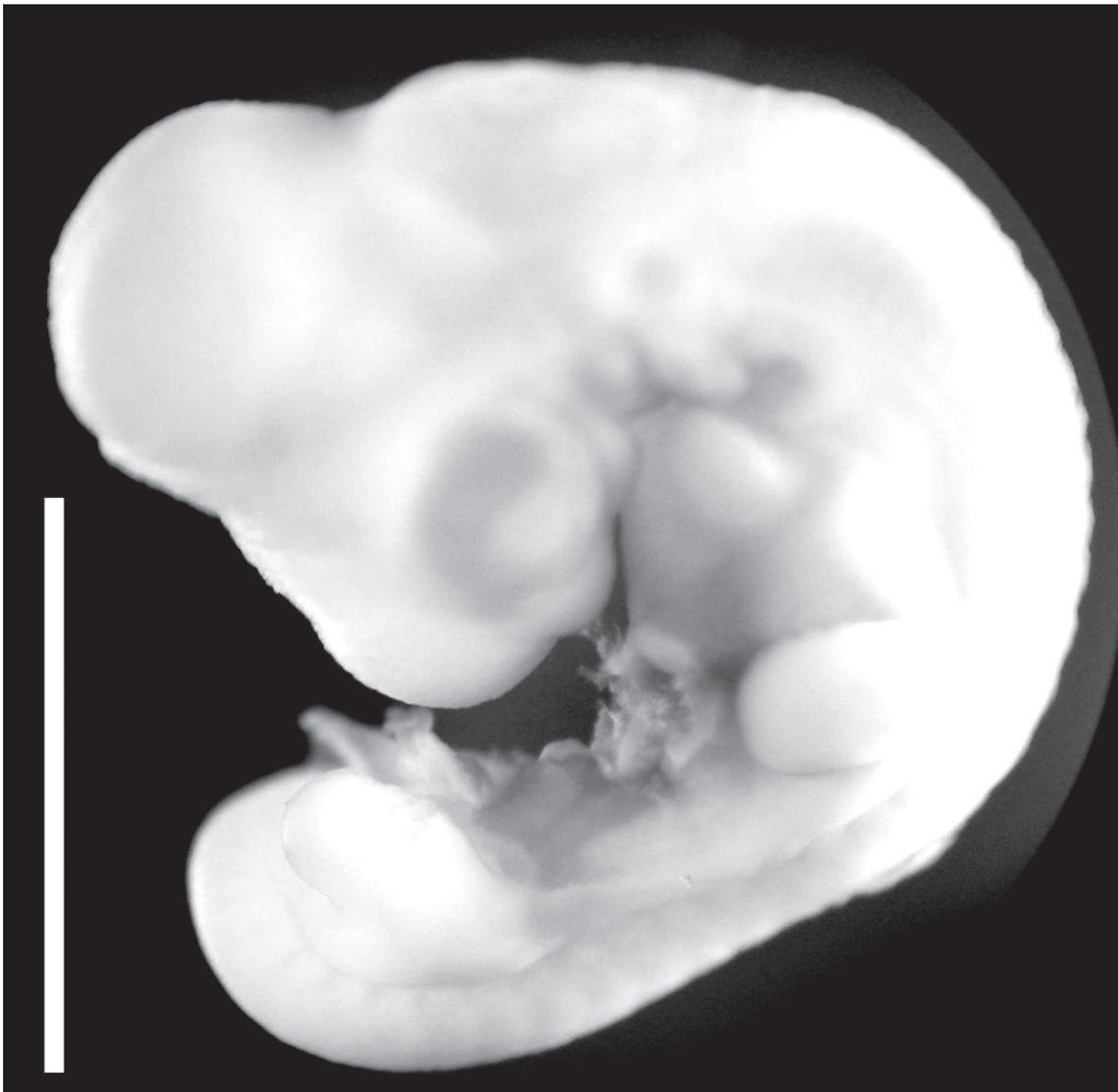


図1 5日胚の全身。前肢、後肢の発芽が見られる。白線は5mm。

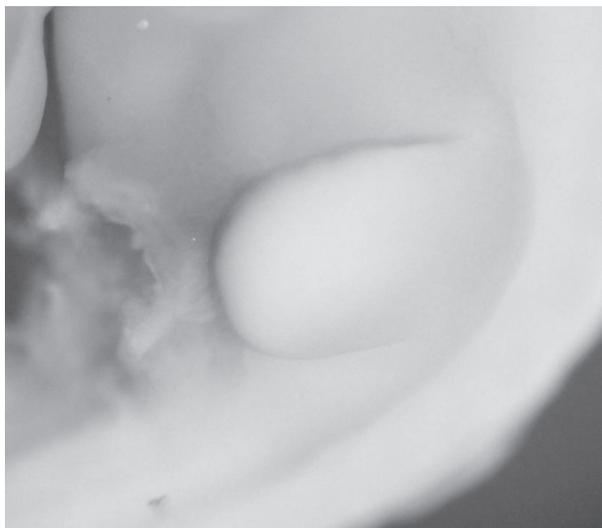


図2 5日胚の前肢芽。

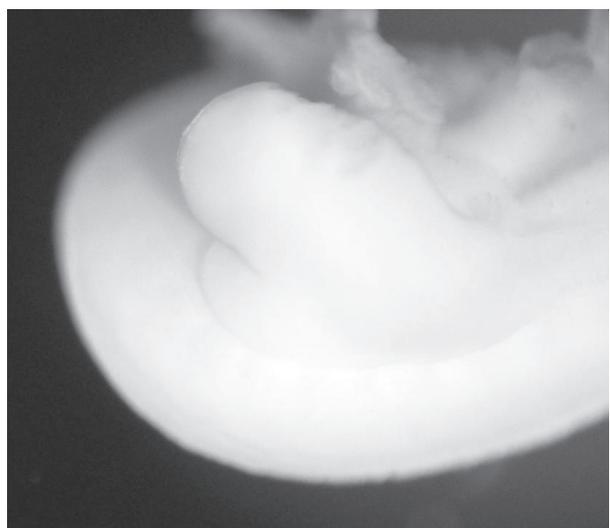


図3 5日胚の後肢芽。

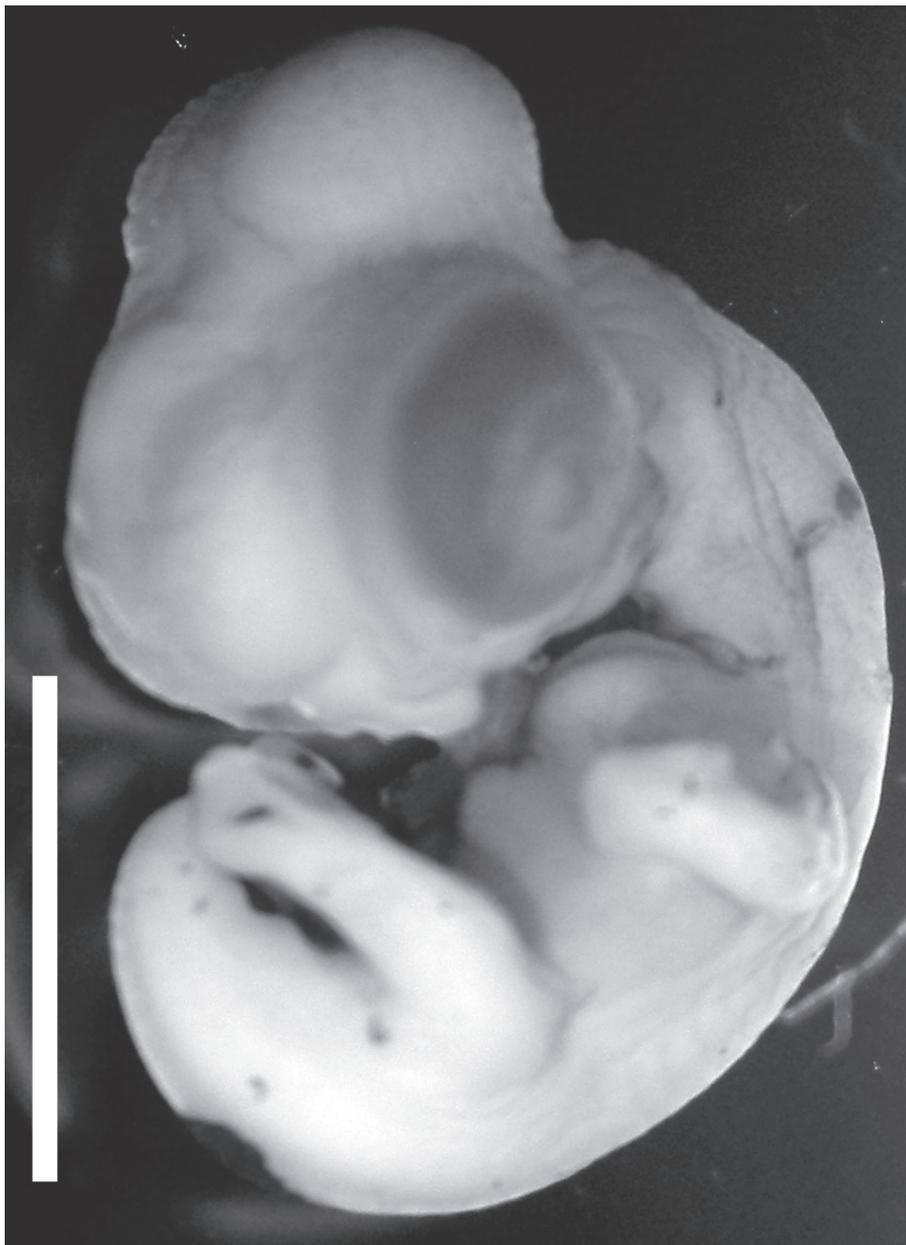


図4 6日胚の全身。前肢、後肢で関節の形成が見られる。白線は5mm。



図5 6日胚の前肢。指の形成が見られる。



図6 6日胚の後肢。指の形成が見られる。



図7 7日胚の全身。指と関節の形成が確認できる。白線は5mm。



図8 7日胚の前肢。指の形が確認できる。

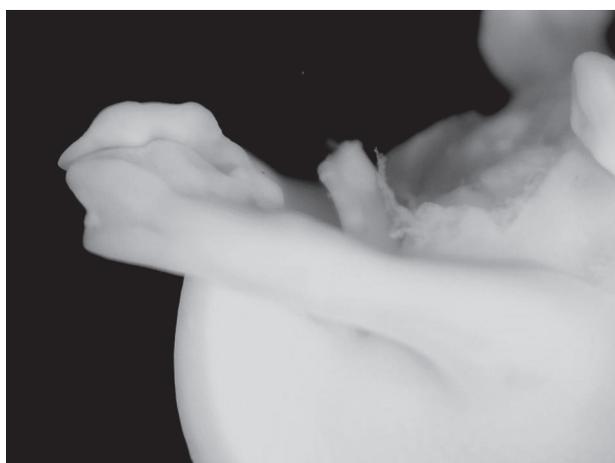


図9 7日胚の後肢。指の形が確認できる。

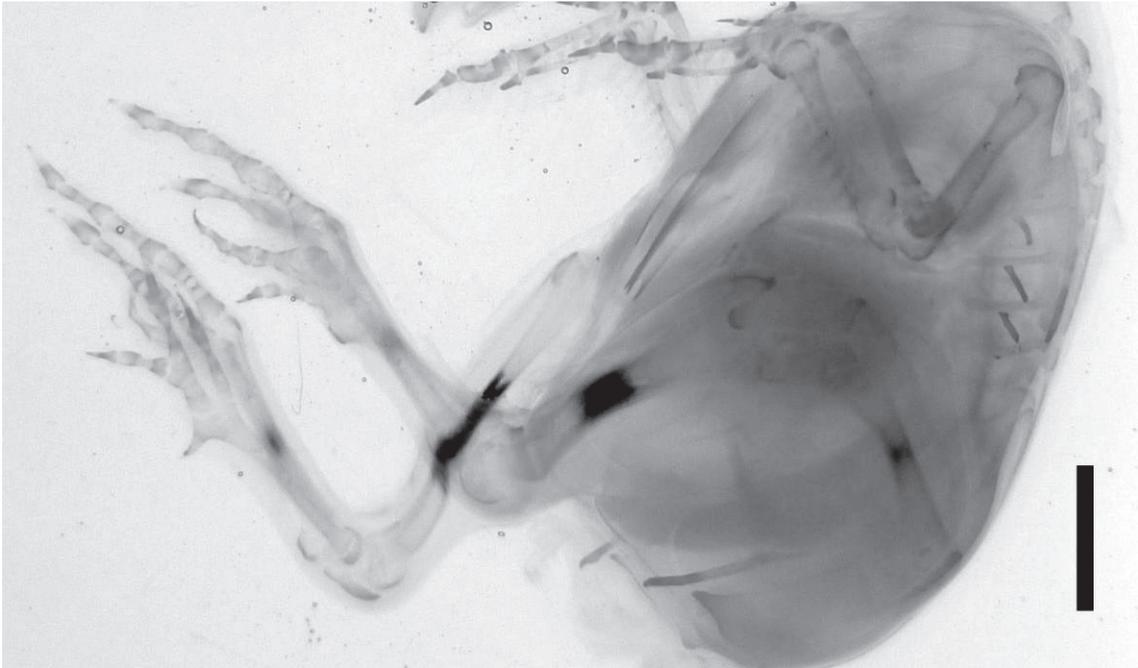


図10 13日胚の胴体。後肢の大腿骨と胫骨で硬骨の形成が確認できる（黒く見える部分が硬骨）。
黒線は5mm。



図11 14日胚の全身。前肢の上腕骨、後肢の足根中足骨での硬骨化が確認できる。黒線は5mm。

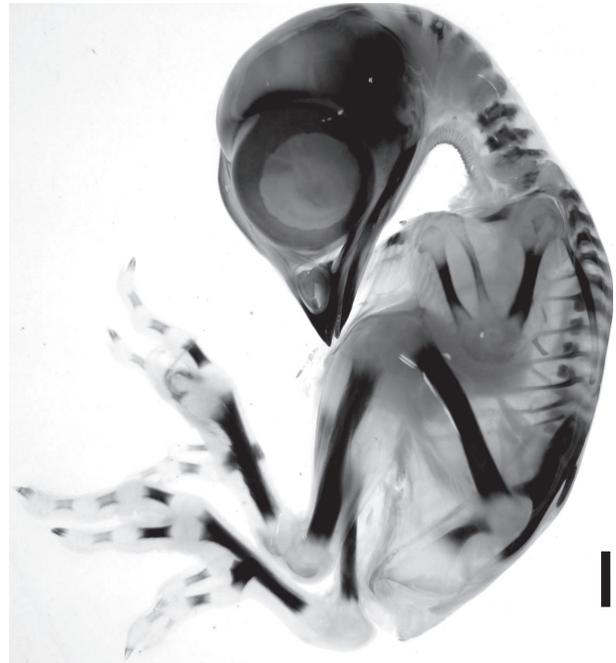


図12 17日胚の全身。前肢の中手骨、後肢の趾骨で硬骨化が確認できる。黒線は5mm。



図 13 6日胚の前肢。中手骨の軟骨が確認できる。



図 14 7日胚の前肢。中手骨の癒合が見られる。

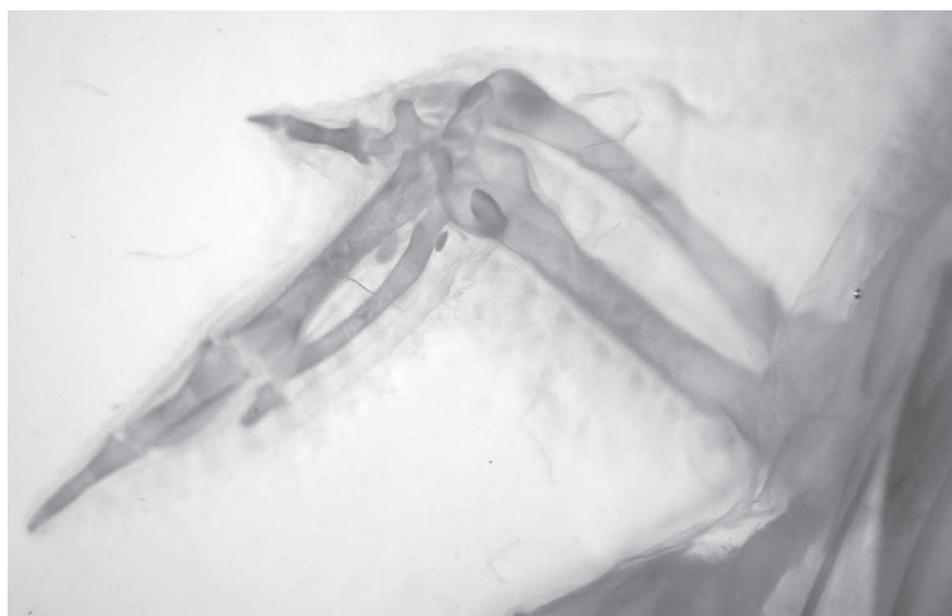


図 15 12日胚の前肢、中手骨の癒合と変形が確認できる。

5. 考 察

ニワトリ胚の発生過程について、特に、四肢形成に注目し、四肢外観の形成の様子と、四肢の長骨の硬骨化の様子を観察し、それがヒトの四肢形成の進行とよく似ていることを確認した。また、ヒトとの大きな違いのひとつである前肢の手根中手骨癒合過程についても、詳細にその経過を観察することができた。これらの観察によって、教材化を進める上での具体的な課題が明らかになった。

(1) 四肢の形成過程

鳥類はヒトを含めた哺乳類と同じ脊索動物門に属するため、形態形成過程の一部はよく似ている。ヘッケルの反復説によると「個体発生は系統発生を繰り返す」と言われるが、系統的に近縁である両者は、個体発生においてその一部を共有しているように見える。現在、反復説は評価されないことが多いが、この類似性をうまく利用することによって、ヒトの形態形成のうち、特に四肢形成の進行を観察するための有益な教材になると考えられる。

本研究では、ニワトリの発生段階は、この分野の先駆者である Hamburger & Hamilton による H・H ステージを利用した。これは産卵を第1段階 (st.1) として 孵化までを 46 の段階に区分して把握する手法である。

ヒトの発生段階は一般的に Carnegie stage⁷⁾ によって標準化されている。これは受精を st.1 とし、胚発生を 23 の段階に区分して把握する手法で、最終の st.23 は受精後約 60 日にあたり、これ以降の段階は胎児と呼ばれる。鳥類においても H・H ステージとは別に、ヒトの発生と同様に、受精からカウントする標準ステージ (Witschi stage) も用いられている。ヒトとの比較については標準ステージの併用も検討しなくてはならない。

ニワトリ胚の発生過程と同様に、ヒト胚においても、前肢芽・後肢芽の発芽、膝や肘の形成、指の形成がほぼ同じ順番で進行することが分かっている。そこで、次の段階として、ニワトリ胚のどの段階が、ヒトの発生のどの段階と対応するかをより明確に示すことで、学習に効果的な日齢を確定することが可能となる。

(2) 長骨の骨化過程

四肢動物の体躯の枠組みを形成する長骨は、前肢芽・後肢芽の細胞塊 (間葉) から形成されるが、最初は軟骨細胞の分化から始まる。図 10 から分かるように、ニワトリにおいても、骨のほとんどは初めに軟骨染色に染まる組織として確認することができる。

ヒトにおいて、軟骨から硬骨への置換は、骨化中心から周りに拡大する形で進行することが分かっている⁸⁾。今回の観察において、ニワトリでも、まず長骨の中央付近の軟骨に硬骨化の中心が生じ、それが両端に向かって拡大する様子が確認できた。これは、ヒトの骨形成を学ぶ上で有益な教材となりうる。

本研究において、透明骨格標本の作製方法で採用した二重染色法は、軟骨と硬骨を明瞭に染め分けることができるため、骨化の過程を観察するのに極めて有効な方法であることも確認できた。

この方法を用いることによって、突然変異により形態形成に異常を起こしたニワトリの品種、例えばウコッケイ (多指)、ウズラオ (尾骨欠損)、ポーリッシュ (頭骨異常) の形態形成と正常な形成過程を容易に比較できる。この比較によって、形態形成異常の進行過程を詳細に把握することが可能になる。

（3）前肢の中手骨癒合過程

ヒトの胚発生との類似性に注目した研究であったが、前肢、つまり翼の形成については、ヒトと鳥類では大きく異なる。この特殊性にも注目した。

鳥類の前肢の指は、最終的に第1指（親指）、第2指（人差し指）、第3指（中指）の3本の指以外が退化して失われ、3本のうち、第2指と第3指の中手骨が癒合して初列風切羽を支えていることが知られている。かつてはこれが、形成される位置から第2、第3、第4指であると考えられており、恐竜と鳥類の違いとされていた。ところが近年、それが間違いであることが確認された⁹⁾。この発見は、現在、恐竜と鳥類が近縁の動物であることを示す根拠のひとつとなっている。

今回の研究では、図13、14、15で示した通り、初期段階では3本の指は独立して形成されており、7日胚において癒合が始まることが確認できた。また、12日胚以降では、癒合した中手骨が平板化することも確認できた。この中手骨構造の変化は飛翔に特化した結果であると考えられる。こうした、鳥類の特殊性を観察することは、分類群による形態形成の多様性を学ぶ題材として活用することもできる。

6. おわりに

その高い教育効果を理由として、文部科学省は教育現場における動物の飼育を推奨している¹⁰⁾。しかし、実際には、学校を囲む社会的環境の変化によって、動物飼育を実施する学校は年々減少している。動物飼育の機会を増やすことは、環境教育の分野だけでなく、教育の多くの領域にとって重要であると考えられる。

動物飼育の普及を研究課題とする中で、著者らは日本鶏に注目した。その理由は、他の飼育動物にはない、文化財としての保存の現状や、食料生産に関わる環境悪化の現状を学ぶ教材としての活用が考えられるからだ。同時に、従来のカリキュラムの中での活用も検討課題としている。具体的な教材として指導手順に近いレベルに落とし込むことによって、動物飼育を実施する方向への変化に多少でも役立つのではないかと期待するからである。この研究がそのきっかけになれば幸いである。

参考文献

- 1) 文部科学省（2005）『高等学校学習指導要領解説 理科編・理数編』大日本図書印刷
- 2) Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951) "A series of normal stage in the development of the chick embryo", *Journal of Morphology*. Vol.88, pp49-92.
- 3) 河村功一・細谷和海（1991）「改良二重染色法による魚類透明骨格標本の作製」『養殖研報』20号 pp11-18
- 4) 須田透（2005）「両生・爬虫類染色骨格透明標本の有効性」『群馬県立自然史博物館研究報告』第9巻 pp121-125
- 5) 畑中恒夫（2012）「透明骨格標本の有効利用について」『千葉大学教育学部紀要』第60巻 pp447-450
- 6) 吉田治弘・松島芳文（2010）「マウスの発生・成長の透明骨格標本による観察」『専修自然科学紀要』第43号 pp1-6
- 7) M.A.Hill (2013) Carnegie stage table. <http://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index>.

- 8) T.W. サドラー (2010) 『ラングマン人体発生学 第10版』株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル
- 9) 田村宏治 (2011) 「手足の形づくりに見る普遍と多様」『季刊生命誌』71号冬
- 10) 文部科学省 (2004) 『学校における望ましい動物飼育のあり方』 http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06121213/001.pdf