

## 日本ウズラの近交群と無作為交配群における 初期胚に及ぼすアンティマイシンAの影響

佐藤勝紀・大西淑乃・河本泰生・猪 貴義

(家畜育種学研究室)

Received November 1, 1986

### The Effect of Antimycin A on the Early Embryos in the Full-sib and Random Mating Groups of Japanese Quail

Katsunori SATO, Yoino ONISHI, Yasuo KAWAMOTO and Takayoshi INO

(Laboratory of Animal Genetics and Breeding)

This study was conducted to determine the inhibitory effect of antimycin A, antibiotic, on the early embryos in the full-sib and random mating groups of Japanese quail, for the purpose of finding out causes of early embryonic death occurred during inbreeding. Japanese quail used in this experiment consisted of the first and six generations in the full-sib and random mating groups.

To determine the effect of LD<sub>50</sub> of antimycin A six differently diluted concentrations of antimycin A (stock solution, 25 mg/95% ethanol 5 ml) were injected in a volume of 0.015 ml into the yolk of eggs of 48 hours incubation. The concentration of LD<sub>50</sub> in the random mating group was injected into the yolk of eggs in the full-sib and random mating groups by the same method as in the case of determining LD<sub>50</sub>. Injected eggs were incubated 48 hours and embryonic mortality, embryonic development and frequencies of malformations were examined. Malformations were classified into seven categories.

The results obtained were summarized as follows.

1. 440.5 and 176.0 ng of LD<sub>50</sub> of antimycin A were found in the 1st and 6th generations of full-sib mating group and 538.7 ng in the random mating group. A marked decrease of LD<sub>50</sub> of antimycin A was found in the full-sib mating group as the generation advanced.
2. When LD<sub>50</sub> of antimycin A was used in the random mating group, embryonic mortality in the full-sib mating group increased with inbreeding and showed higher values than those in the random mating group. The remarked retardation in the embryonic development was found in the full-sib mating group. Embryo size and blood vessels formation were affected in the full-sib mating group.
3. When LD<sub>50</sub> of antimycin A was used in the random mating group, frequency of malformations was significantly higher in the full-sib mating group than in the random mating group. Among the categories of malformations, flexion malformed and poor development, dwarf showed higher frequencies in the full-sib mating group as the generation advanced.
4. These results suggest that the decrease in metabolic activity of the early embryos occurred in the full-sib mating group and was responsible for the early embryonic death as inbreeding increased.

### 緒 言

家畜・家禽の育種過程において、近親交配(以下、近交と略す)は遺伝子をホモ化する可能性が最も強く、優れた形質を急速に遺伝固定する場合の最良な方法として古くから採用されている。しかしながら、近交を継続していくと、産卵率、受精率、孵化率などが低下する

いわゆる近交退化が発現してくる。このように近交退化は家畜・家禽の生産にとって重大な影響を及ぼすことから、近交退化の解明、原因の追究は育種学上重要な課題である。この近交退化の原因は、現在集団遺伝学の面から説明されているが、その本質についてはほとんど解明されていない。

本研究に用いた日本ウズラは近交退化が非常に発現しやすいことから近交退化に関する研究が多く報告されている<sup>3-6,8-13)</sup>。これまでの報告によると、孵化率は特に近交に伴い急激な低下がみられることが明らかにされている。またこの孵化率の低下は胚死亡の増加に起因することが認められている。

日本ウズラの近交に伴う胚死亡の増加は SITTANN *et al*<sup>13)</sup> によっではじめて検討が加えられたが、それによると、全きょうだい交配によって近交世代を進めた場合、発生前期での胚死亡率は近交に伴い急激に増加することが認められている。その後、新城ら<sup>12)</sup>、LUCOTTE<sup>5)</sup>、NARAYAN<sup>6)</sup>、SATO *et al*<sup>11)</sup> によっても検討がなされ、いずれも発生前期での胚死亡率は近交に伴い急激に増加することが報告されている。しかしながら、これらの報告では胚死亡について発現頻度の面から検討を加えたものであり、胚死亡の原因についてはほとんど解明されていない。

本研究は、代謝拮抗物質として知られているアンティマイシン A を用い、まず近交群と無作為交配群におけるアンティマイシン A の LD<sub>50</sub> を検討した。次に無作為交配群の LD<sub>50</sub> 値を使用して、近交群と無作為交配群での胚死亡率、胚発育、胚奇形の出現率について比較検討した。これらの結果から、近交による発生前期での胚死亡の原因について考察した。

## 材 料 と 方 法

本研究に用いた日本ウズラは、岡山大学農学部家畜育種学研究室で無作為交配によって維持してきた閉鎖集団から、近交群と無作為交配群に分け維持したものである。近交群は全きょうだい交配によって作出し、近交世代を 1 世代および 6 世代進めた。一方無作為交配群は近交を避けた 40 家系の循環交配方式により作出、維持した。上記の近交群と無作為交配群の作出、維持にあたってはそれぞれの交配群から得た種卵を孵卵温度 38.1±0.2°C、湿度 70% に調整された孵卵器に入卵した。孵化したヒナは 4 週齢まで育雛器（温度 32±2°C、24 時間点燈）で育成し、それ以後は産卵用飼育ケージに移し、自然温度環境下（14 時間点燈）で飼育した。飼料は市販のウズラ産卵用飼料を不断給餌した。

実験には上記の交配群から得られた種卵を用い、まずアンティマイシン A の LD<sub>50</sub> 値を検討した。この検討では、アンティマイシン A の原液（25 mg/95% エチルアルコール 5 ml）をリンゲル液で 6 段階（2<sup>2</sup>、2<sup>4</sup>、2<sup>6</sup>、2<sup>8</sup>、2<sup>10</sup>、2<sup>12</sup> 倍）に希釈し、これらの希釈量をそれぞれ孵卵後 48 時間目の種卵の卵黄中に 0.015 ml 注入した。注入後は注射針の穴を石膏で埋め、石膏を乾燥させた後、種卵はさらに 48 時間孵卵した。孵卵終了後、種卵は直ちに割卵し、受精の有無、胚の生死について肉眼的に観察した。胚はすべて取り出し、プアン液で固定し、10% ホルマリン液で保存した後、顕微鏡下で観察した。近交群と無作為交配群の LD<sub>50</sub> 値は、それぞれプロビット法<sup>14)</sup> によって求めた。

次に無作為交配群の LD<sub>50</sub> 値を使用して、近交群と無作為交配群での胚死亡率、胚発育、胚奇形の出現頻度について検討した。この場合の検討方法は前述の LD<sub>50</sub> 値検討の場合と同様とした。

胚死亡率は〈死亡胚数/受精卵数〉で求め、死亡胚数は死亡が確認された胚の総数から孵卵後 48 時間以前に死亡したとみられる胚の数を差し引いて求めた。また受精卵数は肉眼的な判定によって受精卵と確認された卵数から孵卵後 48 時間以前に死亡したとみられる卵数を差し引いて求めた。

胚発育は発育段階、胚の長さ、明域、暗域および血管域の長さ、血管の分布について検討した。発育段階は胚の形態的特徴に基づき、鶏胚の発育段階<sup>1)</sup>を用いて分類した。胚の長さ、明域、暗域および血管域の長さはいずれも接眼レンズにとりつけたマイクロメーターを用いて計測した。血管の分布は肉眼的な判定により一からⅢまでの範囲で示した。すなわち、血管が全く認められない場合および孵卵後 48 時間以前の胚に相当する場合一、孵卵後 48 時間の胚に相当する場合+、孵卵後 60 時間目の胚に相当する場合Ⅱ、孵卵後 72 時間目以降の胚に相当する場合Ⅲとした。

胚奇形は Poor development, dwarf (発生不全, 矮小), Dicephalus (2 頭体), Flexion malformed (屈曲), Tortion malformed (捻転), Wing-buds malformed (翼外翻), Leg-buds malformed (肢趾外翻), Tail-buds retarded or undeveloped, rumplessness (尾芽の発育遅延・発育不全, 無尾) の 7 種類に分類し、胚奇形の出現率は〈胚奇形数/受精卵数〉で表わした。

## 結 果

### 1. 近交群と無作為交配群におけるアンティマイシンAの LD<sub>50</sub> 値

まず近交群と無作為交配群での胚死亡率、胚発育、胚奇形の出現率の検討に使用するアンティマイシンAの LD<sub>50</sub> 値について検討した。

Table 1 は近交群と無作為交配群におけるアンティマイシンAの LD<sub>50</sub> 値を示した。LD<sub>50</sub> 値は近交群では 1 世代目 440.5 ng, 2 世代目 176.0 ng となり、近交の世代が進むにつれて急激に低下した。一方無作為交配群では 538.7 ng となり、近交群での LD<sub>50</sub> 値は無作為交配群のものに比較して低く、特に近交群 6 世代では無作為交配群の 1/3 の値であった。このように、近交群におけるアンティマイシンAの LD<sub>50</sub> 値は無作為交配群のものに比較して低く、特に近交の進んだ世代ではその差が顕著になることが明らかとなった。

Table 1 LD<sub>50</sub> of Antimycin A in the full-sib and random mating groups

Mating group	Generation	LD <sub>50</sub> (ng)
Full-sib	1	440.5
	6	176.0
Random	1, 6	538.7

### 2. 無作為交配群のLD<sub>50</sub> 値を使用した場合の近交群と無作為交配群での胚死亡率、胚発育、胚奇形の出現率

次に、前述した無作為交配群の LD<sub>50</sub> 値 (538.7 ng) を使用して、近交群と無作為交配群での胚死亡率、胚発育、胚奇形の出現率について検討した。

#### 1) 胚死亡率

Table 2 は無作為交配群でのアンティマイシンAの LD<sub>50</sub> 値を使用した場合の近交群と無作為交配群における胚死亡率について示した。近交群の対照集団である無作為交配群での胚死亡率は 48.19% となり、50% に近い値を示した。これに対して、近交群での胚死亡率は近交世代に伴い増加し、無作為交配群のものに比べて高い傾向が認められた。特に近交群 6 世代と無作為交配群との間には有意差が認められた。

#### 2) 胚発育

Fig. 1 は無作為交配群でのアンティマイシンAの LD<sub>50</sub> 値を使用した場合の近交群と無作為交配群における胚の発育段階と、その発育段階に含まれる胚の出現頻度を図示した。近交群

Table 2 Embryonic mortality in the full-sib and random mating groups at LD<sub>50</sub> of Antimycin A in the random mating group

Mating group	Generation	Embryonic mortality (%)
Full-sib	1	51.65 (94/182) <sup>a)</sup>
	6	65.96*(31/47)
Random	1, 6	48.19 (160/332)

a) No. of dead embryos/No. of fertile eggs.

\* P < 0.05.

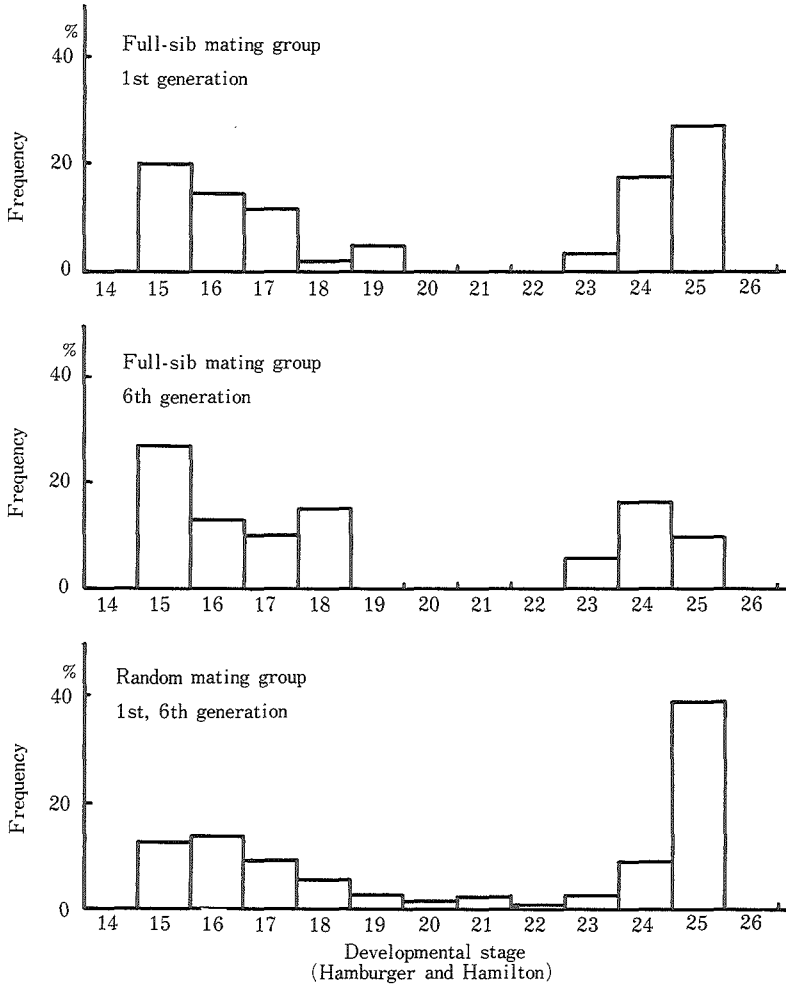


Fig. 1 Distribution of embryos in each developmental stage in the full-sib and random mating groups at LD<sub>50</sub> of Antimycin A in the random mating group.

と無作為交配群における胚の出現頻度は Fig. 1 に示した通りであるが、近交群では無作為交配群に比べて、発育段階 25 の発育の進んだ胚の出現頻度は低く、一方発育段階 15~18 の発育の遅延した胚の出現頻度は高くなる傾向がみられた。特に近交群 6 世代目では発育の遅延した胚の顕著な増加が認められた。

Table 3 は無作為交配群でのアンチマイシン A の LD<sub>50</sub> 値を使用した場合の近交群と無作

為交配群における胚の長さ、明域、暗域および血管域の長さを示した。近交群と無作為交配群での胚の長さ、明域、暗域および血管域の長さは Table 3 に示した通りであるが、いずれも近交群が無作為交配群に比較して短くなる傾向が認められた。特に6世代では明域以外はいずれも両群間で有意差が認められた。

Table 4 は無作為交配群でのアンティマイシンAのLD<sub>50</sub>値を使用した場合の近交群と無作為交配群における胚の血管分布の範囲とその範囲に含まれる胚の出現頻度を示した。近交群では無作為交配群に比較して、Ⅲ段階の胚の出現頻度が低く、一方一段階の胚の出現頻度が高くなる傾向がみられた。特に近交群6世代では無作為交配群との間に有意差が認められた。このように、近交群では無作為交配群に比較して血管の発達した胚が減少し、一方血管の未発達な胚が増加することが明らかとなった。

Table 3 Length of embryo, width of area pellucida, width of side of area vasculosa and diameter of blastoderm in the full-sib and random mating groups at LD<sub>50</sub> of Antimycin A in the random mating group

Mating group	Generation	Length of embryo (mm)	Width of area pellucida (mm)	Width of side of area vasculosa (mm)	Diameter of blastoderm (mm)
Full-sib	1	6.48 ± 0.15 <sup>a)</sup>	7.42 ± 0.24*	5.70 ± 0.30	19.08 ± 0.71
	6	5.94 ± 0.29*	7.58 ± 0.62	4.05 ± 0.54*	15.35 ± 1.35*
Random	1, 6	6.76 ± 0.09	8.25 ± 0.17	6.13 ± 0.23	20.57 ± 0.47

a) Mean ± S.E.

\* P < 0.05.

Table 4 Blood vessels formation in the full-sib and random mating groups at LD<sub>50</sub> of Antimycin A in the random mating group

Mating group	Generation	Blood vessels formation grade <sup>a)</sup>			
		-	+	++	+++
Full-sib	1	37.4 <sup>b)</sup> (68/182) <sup>c)</sup>	8.8 (16/182)	5.0 (9/182)	48.9 (89/182)
	6	48.9* (23/47)	12.8 (6/47)	4.3 (2/47)	34.0* (16/47)
Random	1, 6	33.7 (112/332)	9.0 (30/332)	4.2 (14/332)	52.4 (174/332)

a) - Negative, Slight, + Weak, ++ Moderate, +++ Strong.

b) Percentage of graded embryos.

c) No. of graded embryos/No. of fertile eggs.

\* P < 0.05.

### 3) 胚奇形の出現率

Table 5 は無作為交配群でのアンティマイシンAのLD<sub>50</sub>値を使用した場合の近交群と無作為交配群における胚奇形の出現率および胚奇形の種類とそれらの出現率を示した。胚奇形の出現率は近交群では1世代目48.4%、6世代目63.8%となり、近交世代に伴い増加した。一方無作為交配群では36.1%となり、近交群が無作為交配群に比べて高く、両群間には危険率1%で有意差が認められた。胚奇形の種類とその出現率はTable 5に示した通りとなり、近交群、無作為交配群ともにFlexion malformed (屈曲), Poor development, dwarf (発生不全, 矮小)の胚奇形の出現率は高い値を示した。また、これらの胚奇形の出現率は近交群が無作為交配群に比較して高く、また近交世代を進めた場合増加する傾向が認められた。

以上、無作為交配群でのアンティマイシンAのLD<sub>50</sub>値を用いて近交群と無作為交配群で

**Table 5** Malformations of embryos in the full-sib and random mating groups at LD<sub>50</sub> of Antimycin A in the random mating group

Mating group	G <sup>a)</sup>	Percentage of malformed embryo	Categories of malformations <sup>b)</sup>						
			I	II	III	IV	V	VI	VII
Full-sib	1	48.4** (88) <sup>c)</sup>	15.9 (29)	0.5 (1)	19.2** (35)	6.0 (11)	1.6 (3)	2.7 (5)	2.2 (4)
	6	63.8** (30)	19.1 (9)	0.0 (0)	27.7** (13)	6.4 (3)	4.3 (2)	4.3 (2)	2.1 (1)
Random	1, 6	36.4 (120)	10.3 (34)	0.0 (0)	10.3 (34)	6.4 (21)	2.7 (9)	3.6 (12)	3.0 (10)

a) Generation.

b) I: Poor development, dwarf, II: Dicephalus, III: Flexion malformed, IV: Tortion malformed, V: Wing-buds malformed, VI: Leg-buds malformed, VII: Tail-buds retarded or undeveloped, rumplessness.

c) No. of malformed embryos.

\*\* P < 0.01.

の胚死亡率, 胚發育, 胚奇形の出現率について検討したが, その結果, いずれも近交群では無作為交配群に比較して胚死亡率の増加, 胚發育の遅延および胚奇形の出現率の増加が認められた。

## 考 察

本研究は近交による発生前期での胚死亡の原因追究に関連して, 代謝拮抗物質として知られているアンティマイシンAを用いて検討した。まずアンティマイシンAのLD<sub>50</sub>値について検討した結果, 近交群のLD<sub>50</sub>値は無作為交配群の値に比較して低く, 特に近交の進んだ世代ではその差が顕著になることが明らかとなった。このことは近交群の初期胚ではアンティマイシンAに対する感受性が高く, 近交世代を進めた場合にはその感受性が高まってくることを示している。このような近交群でのアンティマイシンAに対する感受性の増加は近交によるホモ性の増加とヘテロ性の減少により, 胚の活力が減退したことに起因したものと考えられる。

次に, 上記の検討によって得られた無作為交配群のLD<sub>50</sub>値すなわち無作為交配群の胚が50%死亡する用量を使用して, 近交群と無作為交配群での胚死亡率, 胚發育, 胚奇形の出現率について検討した。その結果, 近交群では無作為交配群に比較して胚死亡率の増加, 胚發育の遅延および胚奇形出現率の増加が認められた。

近交群での胚死亡率の増加は, 前述したアンティマイシンAのLD<sub>50</sub>値が近交群では低いことを支持するものであり, この原因としては上記の場合と同様に発生過程での胚の活力減退が考えられる。

近交群では胚發育の遅延が増加し, また近交世代に伴いその發育遅延は著しくなることが認められている。アンティマイシンAはエネルギー生成に関連する電子伝達系経路の酸化的リン酸化反応を阻害するものとみられている<sup>2)</sup>。本実験の結果と以上のことから推察して, アンティマイシンAによる近交群での發育遅延胚の増加は発生過程での細胞分裂・増殖およびエネルギー生成の抑制, 阻害に起因したものと考えられる。

本実験では發育遅延胚について發育段階の面から検討したが, その結果, 近交群, 無作為交配群ともに發育遅延胚は胚發育段階15~18に集中して出現した。これまでの鶏胚の報告によると, 胚發育段階15~18の時期は脳・心臓の分化, 頭屈曲・頸屈曲などの中枢神経系の発達および循環系の発達など胚発生過程において急激な変化がおきるものとみられている。こ

のような胚発育段階での胚出現率の増加は胚発生過程での転換期における胚の代謝活性の低下とそれに伴う形態形成の障害によるものと考えられる。またこの時期で近交群と無作為交配群の間に出現頻度の差がみられたが、この差は両群での胚の物質代謝ならびに形態形成過程における胚の調節機能の差異に起因したのと考えられる。

本実験では、胚の発育遅延に関連して近交群においては血管の未発達な胚が多く認められた。このことはアンティマイシンAが近交群の胚体のみならず胚体外にも強く作用したことを示している。

一般に、血管および血管を流れる血液は胚の生存、発育に必要な酸素、栄養物質を供給する上で重要な役割を果たすことが知られている。本実験で認められた血管の発育遅延、阻害は胚死亡をひきおこす原因と考えられるが、この点については今後さらに検討を加える必要がある。

さらに、近交群と無作為交配群における胚奇形の出現率について検討した結果、近交群での胚奇形の出現率は無作為交配群のものに比較して高いことが認められた。これまでの鶏胚の報告<sup>7)</sup>によると、初期培養胚にアンティマイシンAを与えた場合、脳、背髄、心臓、体節などの器官、組織で形態異常の起こることが明らかにされている。本実験においても上記の器官、組織での形態異常が観察されており、鶏胚の場合と同様の原因によって胚奇形が誘発されたのと考えられる。本実験では特に近交群において屈曲と発生不全・矮小の胚奇形が多く認められたが、この理由としては発生過程にある胚の中樞神経系および細胞の分裂・増殖が抑制、阻害されたことによるものと考えられる。

以上、本実験では代謝拮抗物質であるアンティマイシンAを用いて、近交群と無作為交配群における初期胚の代謝活性について間接的に検討を加えたが、それらの結果から、近交群では無作為交配群に比較して初期胚の代謝活性が低く、また近交世代を進めた場合にはその代謝活性はさらに低下したのと考えられる。これらの近交による初期胚での代謝活性の低下は胚の発生と分化に必要な細胞分裂・増殖を抑制させるとともにエネルギー生成を阻害し、発生前期での胚死亡をひきおこしたものと考察した。

## 摘 要

本研究は近交による発生前期での胚死亡の原因に関する情報を得るために、代謝拮抗物質であるアンティマイシンAが日本ウズラの近交群と無作為交配群における初期胚に及ぼす影響について検討した。実験に使用した日本ウズラは近交群1世代と6世代および無作為交配群である。

アンティマイシンAのLD<sub>50</sub>値の検討にあたっては、原液(25mg/95% エチルアルコール 5ml)の6段階希釈濃度が孵卵後48時間目の種卵の卵黄中に0.015ml注入された。次に無作為交配群でのLD<sub>50</sub>値が近交群と無作為交配群の種卵の卵黄中に注入された。なお、注入方法はLD<sub>50</sub>値検討の場合と同様とした。注入された種卵はさらに48時間孵卵し、胚死亡率、胚発育、胚奇形の出現率について検討した。胚奇形は7種類に分類した。

得られた結果は要約すると以下の通りである。

1. アンティマイシンAのLD<sub>50</sub>値は近交群では1世代目440.5ng、6世代目176.0ng、一方無作為交配群では538.7ngとなり、近交群でのLD<sub>50</sub>値は近交世代に伴い急激な低下が認められた。
2. 無作為交配群のLD<sub>50</sub>値を使用した場合、近交群での胚死亡率は近交に伴い増加し、無作為交配群のものに比較して高い値を示した。また、近交群では発育の遅延した胚、体の小さい胚および血管の未発達な胚が多く認められた。

3. 胚奇形の出現率について  $LD_{50}$  値を使用して検討した結果、近交群では無作為交配群に比較して有意に高い出現頻度を示した。分類された胚奇形の中で、屈曲と発生不全・矮小の胚奇形の出現頻度は近交世代を進めるにつれて高くなった。
4. 以上の結果から、近交群では初期胚の代謝活性が低下し、そのために発生前期での胚死亡が増加したものと考察した。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金 (No. 58480074) の援助を受けて行なった。

## 文 献

- 1) HAMBURGAR, V. and H.L. HAMILTON : *J. Morphol.*, **88**, 49-92 (1951)
- 2) J.D. イバート : 発生—そのメカニズム (岡田 瑛・岡田節人訳) 167-168, 岩波書店, 東京 (1967)
- 3) KULENKAMP, A.M., C.M. KULENKAMP and T.H. COLEMAN : *Poultry Sci.*, **52**, 1240-1246 (1976)
- 4) KAWAHARA, T. : *Annual Report of National Institute of Genetics*, **23**, 126-127 (1976)
- 5) LUCOTTE, G. : *Ann. Biol.*, **14**, 167-182 (1975)
- 6) 前田芳実・伊集院正敏・橋口 勉・武富萬次郎 : *家禽会誌* **18**, 86-97 (1981)
- 7) MCKENZIE, J. and J.D. EBERT : *J. Embryol. exp. Morphol.*, **18**, 314-320 (1960)
- 8) NARAYAN, A.D. : *SABRAO Journal*, **7**, 201-210 (1975)
- 9) 岡本 悟・松尾昭雄 : *佐賀農彙* **46**, 9-16 (1979)
- 10) SATO, K., T. YAMAMOTO, S. ITO, H. KOBAYASHI and T. INO : *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **55**, 789-791 (1984)
- 11) SATO, K., T. YAMAMOTO, S. ITO, H. KOBAYASHI and T. INO : *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **57**, 694-702 (1986)
- 12) 新城明久・水間 豊・西田周作 : *家禽会誌* **8**, 231-236 (1971)
- 13) SITTMANN, K. and H. ABPLANALP : *Genetics*, **54**, 371-379 (1966)
- 14) 吉田 実 : 畜産を中心とする実験計画法, 374-381, 養賢堂, 東京 (1975)