ニワトリ胚を生きたまま観察する

東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 教授 和田（わだ） 直之（なおゆき）

1. 実験のねらい

動物が発生する過程を観察する材料として、教科書ではカエル卵やメダカ卵が定番である。これに対して、ニワトリ卵を温めて観察するのはあまり一般的とは言えないが、両生類卵や魚類卵に比べて以下のような利点がある。①形が哺乳類（ヒトを含む）の胚に近い、②心臓の拍動を直接観察できる、③血管内の血流を観察できる。特に、心臓の拍動は生理現象としてはごく自然であっても、目にすることがないためか、初めて観察する人には強い印象を与えるようである。実際、オープンキャンパスのデモ実験でニワトリ胚の観察の場を設けると、顕微鏡を覗いたほぼ全員が感嘆の声をあげる。筆者はそのため、ニワトリ胚は「生命を可視化する材料」として最適であると考えている。ニワトリ胚の観察法を掲載している教科書や参考書も見かけるが、多くが胚を卵外に取りだして観察する実験であり、心拍や血流の観察は難しい。以下、卵内にいる胚を生きたまま観察する手順をまとめる。

2. 準備

(1) 有精卵：「有精卵」を扱っている養鶏場はネットで検索できるので、直接連絡して新鮮な卵を入手する。発生率は通常60-80％なので、多めに購入する。卵は表面を消毒用エタノールで拭いて数日なら室温（20-25℃）で、それ以上は10-15℃で維持する（一週間以内に使用）。卵を収めている「トレイ」（多くは紙製）は、そのまま孵卵や卵操作時に用いる。

(2) 孵卵器：実験室にある恒温器で、庫内の広さが30cm × 30cm × 40cm（幅×奥行×高さ）以上あり、38 ～ 40℃で安定して維持できるものがよい。庫内高さが確保できると作業がしやすくなる。

(3) ピンセット**（写真 1A, B）**：100円ショップで入手可能な「先端が丸いもの」を1本と、微細工作用の「先のとがったもの」を1―2本用意する。
いずれも先端の合わせがずれていないことを確認しておくことと、後者は先端が曲がりやすいので丁寧に扱う点に注意する。

(4) 生理食塩水：蒸留水1LにNaClを9g溶かし、可能なら煮沸滅菌する。

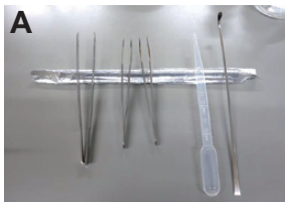
(5) 実体顕微鏡と照明装置：双眼式のものがあるとよい。照明はLED式の懐中電灯で問題ないが、明るいものを選ぶ。

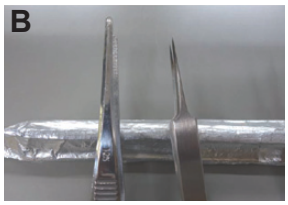
(6) その他：消毒用エタノール綿、スポイト、直径10cmくらいのシャーレ、卵処理用のプラビーカー、ビニール袋など**（写真 1A）**。

写真 1. 準備する器具類。

A：左から、殻剥き用ピンセット（1本）、微細操作用ピンセット（2本1対で準備）、スポイト、（必要に応じて）胚取り出し用スプーン（微細薬さじを曲げたもの）。

B：ピンセットの先端形状の違い。目的が違うので、必ず2種類用意する。





3. 操作と観察

(1) 孵卵：孵卵器は実験を始める数日前から温めておく。庫内に棒温度計を入れ、実際の温度が38.0 ～ 38.5℃になるように調節する（37℃では発生が遅くなる）。機械の設定温度（あるいは表示温度）はあくまでも参考とし、棒温度計での実測値に従う。実験日から逆算して孵卵を始める。卵の中で観察するには4日胚が観察しやすい。これ以降はトリの形が明瞭になるが、胚**（写真 2G–H）**が卵黄の中に埋まってしまうので、卵内で全身を観察するのは難しい。孵卵器の大きさにもよるが、多数の卵を同時に入れると庫内の温度がなかなか上がらず、予定より発生が遅れることがあるので、孵卵時間を長めにするなどの調整は必要である。

(2) 観察の実際**（写真 2）**

① 卵を、鈍端（気室側）を上にして卵立て（トレイを切ったものなど）に載せ、エタノール綿で汚れを拭く。

② 先の丸いピンセットを通常と逆に持ち、ヒンジの

部分で卵の鈍端を軽くたたき、卵にひびを入れる**（写真 2A）**。薬匙などの先端や、ハサミの握りの部分などでもよい。

③ 先の丸いピンセットを通常通りに持ちかえ、卵殻をむく。直径 2cm ほどの丸い孔をあける**（写真 2B）**。

④ 気室の膜（卵殻膜）が見えるので、スポイトで生理食塩水を 3 滴ほど滴下する**（写真 2C-D）**。

⑤ 先の尖ったピンセットに持ちかえ、卵殻膜を少しつつく。生理食塩水が卵殻膜の下にしみこむので、卵殻膜だけを丁寧にはぐ**（写真 2E–F）**。卵殻膜直下の胚や血管、卵黄を傷つけないようにする（ここは慣れが必要）。

⑥ 胚と周辺の血管が見える**（写真 2G–H）**。可能なら、胚を包んでいる透明な膜（羊しょう膜）を丁寧に破る。見えにくければ、うすい「ナイルブルー液」を 1 ～ 2 滴添加すると、膜や胚の輪郭が見やすくなる。

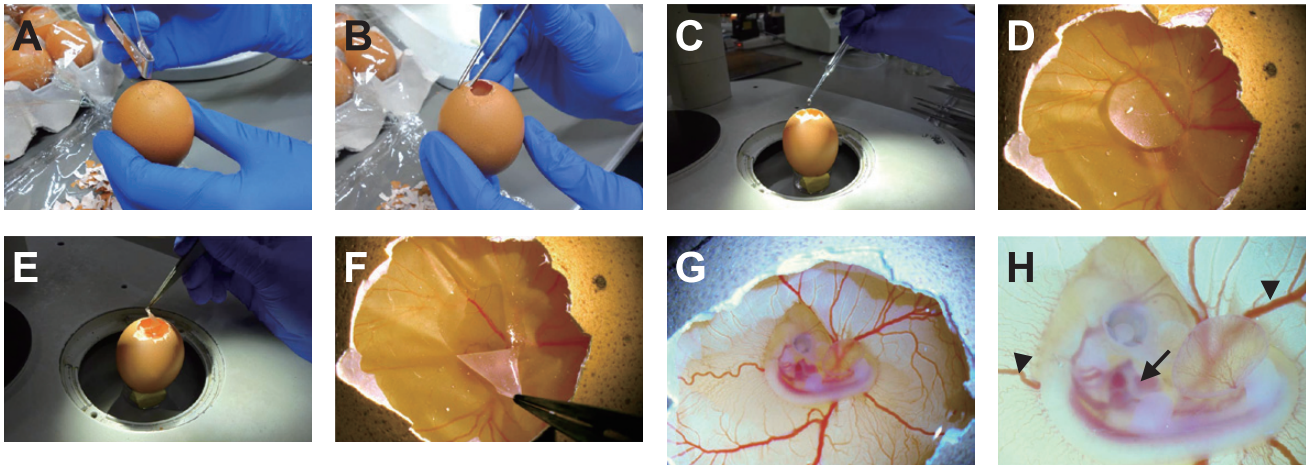
⑦ 心臓の拍動はすぐに観察できる**（写真 2H 矢印）**。顕微鏡の倍率を高くすると、胚の外にある太い血管の中に血流（赤血球の粒の流れ）が観察できる**（写真 2H 矢じり）**。

⑶ 関連した実験

① 胚を取り出して観察する：⑵ - ⑥の**写真 2G** のあとに、卵の内容物を全てシャーレに取り出す。あらかじめ、大きめの孔をあけておく。大抵の場合、卵黄の袋が破れて卵黄顆粒が広がり、胚を観察しにくいので、生理食塩水で洗ってから観察する。食塩水の入ったシャーレを複数用意し、耳かきサイズの薬さじの先端を曲げたもの**（写真 1A 右）**で胚をすくい上げ、別のシャーレに移す。卵黄を洗い、さらに別のシャーレに移して観察する。

② 翌日まで発生させる：⑵ - ⑦で観察した胚を孵卵器に戻して、翌日観察することも可能である。この場合は、予め操作器具や食塩水を全て滅菌しておき、また作業台の上もエタノールで拭くなどする。観察後は、卵殻の孔をセロテープで密封して孵卵器に戻して発生させる。市販の培養用抗生物質（例：富士フイルム）を食塩水に加えると、カビやバクテリアの増殖を抑え、胚の生存率の向上が期待できる。ただし万能ではないので、翌日の観察時に異臭がするようならそのまま廃棄すること。

写真 2. 操作手順　詳細は本文参照。



A：卵の鈍端にヒビを入れる。**B**：殻剥き用ピンセットで, 殻に孔をあける。**C, D**：スポイトで生理食塩水を滴下する。顕微鏡下では**D**のように見える。**E, F**：微細操作用ピンセットで卵殻膜を除去する。**F** は顕微鏡下での様子。**G, H**：卵殻膜を除去した時の顕微鏡下での様子。**H** は拡大したもの。実際には, 心臓の拍動（矢印）や, 胚外の血管内では血流を観察できる（矢じり）。

4. 指導のポイント

細かい作業が続くため、操作の段階ごとに一定の慣れは必要である。しかし、最初にも述べたように、心臓の拍動は一見の価値があり、ルーペでも観察できるので、温度管理ができる機器があれば是非試してほしい。

発生時の胚や肢芽の形態変化、そこに至る時間や日数については、「ニワトリ胚の発生段階表[*1,*2]」があり、ニワトリ研究者は常にこれを用いている。英文だが、写真が多数掲載され、形の変化を知るには不可欠である。

＊[1] 論文 URL：https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aja.1001950404

＊[2] 発生段階ポスター（上記論文のうち、写真をまとめたもの）：
https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/pb-assets/assets/10970177/pdf/Chick_stage_poster-1629379840910.png