

## 遺伝資源の保存へ向けた取り組み（第二報）

養鶏研究所 森圭太郎 今井士郎

### 1 はじめに

愛媛系ロードアイランドレッド種（ER）は、当所が閉鎖群育種により独自に改良した系統であり、県ブランド鶏「媛っこ地鶏」生産の重要な遺伝資源として位置付けられている。そのため、多発する感染症に対し不測の事態への備えが急務である。愛媛県としては、当面の対応として雄の遺伝資源は凍結精液、雌の遺伝資源は分散飼育による保存を目指している。そこで、簡便で特別な機器を要しない「メチルアセトアミド（MA）急速ストロー法」を活用した鶏凍結精液作製時における適正凍結保護物質添加濃度について検討した。

### 2 材料及び方法

#### 1) 供試鶏

35週齢のER雄30羽、ER雌60羽を供試し、雄は精子の耐凍性等で選別せず、混合精液を用いた。

#### 2) 凍結精液の作製方法

独立行政法人家畜改良センター岡崎牧場「鶏の繁殖技術マニュアル」<sup>1)</sup>に準じ、次のように作製した。

- ① 精液はマッサージ法により、プラスチックシャーレに採取した後、シリンジで濃厚部のみを抽出し、試験管に移し替え、ただちに5℃の冷水に静置した。
- ② 採取した精液は15分以内に5℃に冷却した一次希釈液（HS-2液：表1）を同量添加し、その後5℃条件下で30分間静置した。
- ③ 静置後、凍結保護物質であるMAを添加したHS-2液（二次希釈液）を1:1の割合で混合し、0.5mlの凍結用ストローに充填後、ストローパウダーで密閉した。
- ④ 発泡スチロール容器に、ストローホルダーを設置し、ストローホルダーに乗せるストローと液体窒素の液面が4~4.5cmとなるよう液体窒素を注ぎ入れた。
- ⑤ 希釈精液ストローをストローホルダー上に横向きに並べ、液体窒素蒸気により30分間予備凍結後、液体窒素中へ投入し凍結を完了させ、液体窒素保管容器に移し替えて保管した。
- ⑥ 融解処理は5℃の水に100秒浸漬して行い、一度に融解するストローは注入までの時間を考慮して4~5本とした。融解精液はストローから5℃に保冷した試験管に移し替えた。
- ⑦ 注入は鶏精液注入器（FHK製）を用いて、1羽あたり0.3mlを膣深部へ注入し、融解から注入終了までの時間は2分以内とした。

表1 希釈液 (HS-2液) の組成表

成分	濃度 (g/DW100ml)
グルコース	0.2
トレハロース・2H <sub>2</sub> O	3.8
グルタミン酸Na・H <sub>2</sub> O	1.2
酢酸K・無水	0.3
酢酸Mg・4H <sub>2</sub> O	0.05
クエン酸三K・H <sub>2</sub> O	0.08
BES	0.4
Bis-tris	0.4
硫酸ゲンタマイシン	0.001
PH	6.8
浸透圧 (mOsm/kg)	350

3) 試験区

2) ③のMAの添加濃度6、7、8、9%の4区を設定した。

4) 調査項目

① 精子活力

精子性状検査板 (FHK 製) を使用し、「鶏の繁殖技術マニュアル」<sup>1)</sup>に基づき判定した。

② 精子数・奇形率

血球計算盤 (Thoma) を使用し、「鶏の繁殖技術マニュアル」<sup>1)</sup>に基づき行った。

③ 受精率

ふ卵10日目に光透過法により調査した。

④ ふ化率

ふ卵21日目にふ化を確認した。

3 結果

1) 精子活力

凍結前0%区95+++、6%区70+++、7%区80+++、8%区80+++、9%区80+++に対し、融解後は、-、60++、70++、70++、70++であった。MA添加・凍結融解による精子活力の影響はあったものの、人工授精に必要な50++以上は確保された (表2)。

表2 MA濃度による凍結前・融解後の精子活力

MA濃度	凍結前精子活力	融解後精子活力
0%	95+++	-
6%	70+++	60++
7%	80+++	70++
8%	80+++	70++
9%	80+++	70++

2) 精子数・奇形率

① 精子数

凍結前0%区10.5、6%区10.0、7%区11.0、8%区10.5、9%区10.5億に対し、融解後は、10.5、9.0、10.0、11.0、10.5、10.5億であった。MA添加・凍結融解による異常は確認されなかった(表3)。

表3 MA濃度による凍結前・融解後の精子数

MA濃度	凍結前精子数(億)	融解後精子数(億)
0%	10.5	10.5
6%	10.0	9.0
7%	11.0	10.0
8%	10.5	10.5
9%	10.5	10.5

② 奇形率

凍結前0%区12.9、6%区13.0、7%区12.0、8%区12.9、9%区12.6%に対し、融解後は、12.6、14.3、13.0、12.8、13.1%であった。MA添加・凍結融解による異常は確認されなかった(表4)。

表4 MA濃度による凍結前・融解後の奇形率

MA濃度	凍結前奇形率(%)	融解後奇形率(%)
0%	12.9	12.6
6%	13.0	14.3
7%	12.0	13.0
8%	12.9	12.8
9%	12.6	13.1

3) 受精率

6%区26.8%(19/71)、7%区20.8%(15/72)、8%区24.6%(17/69)、9%区23.5%(16/68)であった(表5)。

表5 MA濃度による受精率

MA濃度	受精率(%) (受精卵/入卵個数)			
	1回目	2回目	3回目	合計
6%	26.1 (6/23)	16.7 (4/24)	37.5 (9/24)	26.8 (19/71)
7%	23.1 (6/26)	15.8 (3/19)	22.2 (6/27)	20.8 (15/72)
8%	13.6 (3/22)	29.2 (7/24)	30.4 (7/23)	24.6 (17/69)
9%	33.3 (8/24)	23.8 (5/21)	13.0 (3/23)	23.5 (16/68)

#### 4) ふ化率

受精卵のふ化率は全区 100%であった。

#### 4 考察

全ての MA 添加区において、凍結融解後も人工授精に必要な活力 (50++以上) が確保され、一定の受精率を得た。しかしながら、MA 濃度による受精率の差は認められず、家畜改良センター岡崎牧場の報告する受精率 40~80%より低い成績となった。その要因として、二次希釈液添加後の凍結保護物質の平衡時間を設けなかったことで、氷晶形成の肥大化を抑制できず、精子に障害をもたらしたと考えられる。加えて、凍結融解精液は、活力の低下から膣深部への注入が求められるが、卵管内部への損傷を懸念し注入深度を 2cm と浅くしたことで、精液の逆流が起こり、深部注入が適正になされなかった可能性がある。今後は、MA 添加後の平衡時間と融解精液の注入深度を、再検討し ER の MA 適正濃度の特定と凍結精液作製技術の確立を目指したい。

#### 5 参考文献

- 1) 独立行政法人家畜改良センター岡崎牧場：家畜改良センター技術マニュアル 16 鶏の繁殖技術マニュアル, 29~44 (2005), 愛知, 独立行政法人家畜改良センター
- 2) 独立行政法人家畜改良センター岡崎牧場ら：凍結精液による鶏遺伝資源の保存及び活用マニュアル, 1~11 (2010), 愛知, 独立行政法人家畜改良センター
- 3) 社団法人日本種鶏孵卵協会種鶏長期育種技術専門委員会：原種鶏・種鶏の長期飼育技術及び種卵の長期保存技術, 22~34 (2007), 東京, 社団法人日本種鶏孵卵協会種鶏長期育種技術専門委員会