

「おおいた冠地どり」の安定生産技術の確立 ～精液の凍結保存技術の研究～

波津久 香織・阿南 加治男・利光 昭彦・村上 裕見・黒木 勝巳・後藤 憲信
大分県農林水産研究指導センター畜産研究部

要 約 「おおいた冠地どり」(以下、冠地どり)の生産に供される三元雄系統の雄を供試し、メチルアセトアミド(以下、MA)濃度2%から9%の間において1%間隔で凍結精液を作製したところ、MA濃度6%から9%の間の凍結融解後の精子活力・運動性が50++から70++と良好であり、MA濃度6%で作製した凍結精液を用いた人工授精の結果、54.8%～69%の受精率を得られた。しかし、二次希釈までの時間を延長すると受精率は低下した。

(キーワード:冠地どり,凍結精液,メチルアセトアミド,遺伝資源保存)

緒 言

冠地どりは大分県が開発した特産地鶏で、平成28年度の出荷羽数は114,000羽と着実に生産が拡大している。

冠地どりの種鶏維持及び種卵の生産は当部で担っており、生産規模の拡大に伴い鳥インフルエンザなどの不測の事態に備え、安定的な生産や供給体制の拡充が必要である。そこで、人工授精用精液の凍結技術の確立と、保存管理の検討を行うとともに、人工授精業務の省力化や孵化技術の向上による安定的な地鶏生産を目的とする。

材料および方法

1. 試験1：精液性状検査

三元雄系統の雄11羽を供試し、個体別に精液性状検査を行った。

精液の採取方法は鶏の胴体を脇に挟み、総排泄腔の両側を軽く押しながら指でつまみ搾る腹部マッサージ法で行った。採精した精液は3.5cmのプラスチックシャーレに取り、濃厚部のみを1.5mlのマイクロチューブに移し、精液性状検査を行うまで5℃の冷水に静置した。精子総数は、血球計算板を用いて顕微鏡で精子数のカウントを行った。精子運動性の判定については非常に活発な運動を行うものを+++、活発な運動をするものを

++、緩慢な運動のものを+とし、精子活力は精子が生存している割合を100から0までに区分した。精液採取時に目視にて精液の濃さ、採取量の判定も同時に行った。

2. 試験2：耐凍剤濃度の検討

三元雄系統の雄12羽を供試し採精を行った。鶏の精液量は1回の射出で0.5ml程度、精子数は40億/mlと採取量が少ないため^り、個体毎の精液保存ではなく、複数羽の精液を採取した混合原精液を使用した。凍結方法は、独立行政法人家畜改良センターの技術マニュアル16に従って、ダイレクト注入が可能である耐凍剤MAを使用した急速ストロー法で凍結を行った。一次希釈液および二次希釈液にはHS-2液を使用した(表1)。

採精は15分以内に行い、精液の濃厚部のみを回収した混合原精液を一次希釈液で2倍希釈、更にMAを混合した二次希釈液で2倍希釈したのち、MA最終希釈濃度(以下、MA濃度)2%～9%間の1%間隔で8濃度の希釈精液を作製し、液体窒素蒸気で30分間仮凍結後、液体窒素中に投入し本凍結を行った。融解後の精子運動性および精子活力判定は試験1と同様の方法で行い、採精から希釈までの行程はすべて5℃の冷水の中で行った。

表1 HS-2希釈液の組成 単位：g/DW100ml

試薬名	使用量
グルコース	0.2
トレハロース・2H ₂ O	3.8
グルタミン酸Na・2H ₂ O	1.2
酢酸K・無水	0.3
酢酸Mg・4H ₂ O	0.08
クエン酸三K	0.05
BES	0.4
Bit-tris	0.4
硫酸ゲンタマイシン	0.001
pH	6.8
浸透圧 (mOsm/Kg)	350

作製した MA 濃度 2%～9%の 8 濃度の凍結精液を 5℃の冷水に 1 分 40 秒浸漬し、融解後の精子活力検査を行った。

精子活力検査で融解後の運動性が良い MA 濃度 6, 7, 8 および 9%の 4 濃度を用いて凍結精液を作製し、各濃度の凍結精液を三元雄系統の雌 5 羽に人工授精した。凍結精液は 5℃の冷水に 1 分 40 秒浸漬融解し、水分を拭き取ったストローから試験管に移し 0.3ml ずつ人工授精用に改良したガラスメスピレットで雌の膣深部へ注入した。

初回人工授精の翌日から 13 日間採卵し、その間 4 日に一度人工授精を実施し、14 日目に孵卵器へ入卵した。

入卵から 14 日目に検卵器を卵の鈍端に当てて透視し、受精卵の判定を行った。

3. 試験 3：冠地どり種鶏を用いた授精確認

精液採取は、三元雄系統の雄 40 羽を供試し試験 1 同様の方法で行ったが、試験 3 では精子の耐凍性を高める²⁾ため、凍結予定日の 2 週間前から一日おきに採精を実施した。精子運動性および精

表2 精子総数と性状の比較

区分	総数 (億/ml)	精液量	精液濃度	活力・ 運動性
雄1	36.7	多	濃	80+++
雄2	23.4	少	濃	60++
雄3	34.4	多	濃	80+++
雄4	38.5	多	濃	90+++
雄5	28.1	多	濃	50+
雄6	33.8	多	濃	30+
平均	32.5			
区分	総数 (億/ml)	精液量	精液濃度	運動性
雄7	12.4	多	薄	90++
雄8	23.0	少	薄	90+++
雄9	20.1	多	薄	90++
平均	18.5			

子活力の判定は試験 1 と同様の方法で行った。凍結については試験 2 と同等の方法で行った。

試験 2 で受精率の確認を行っていなかった MA 濃度 4%と 5%および良好な受精率が得られた MA 濃度 6%の 3 濃度を、試験 2 同様の方法で凍結精液の作製を行った。

一次希釈から二次希釈までの静置時間を延長した場合の受精率を確認するために、MA 濃度 5%と 6%で一次希釈後の静置時間を独立行政法人家畜改良センターの技術マニュアル 16 より 30 分長くした凍結精液を作製した。

冠地どり種鶏雌 6 羽づつを供試し、MA 濃度 4%, 5%, 6%の 3 濃度と、二次希釈までの静置時間を延長した凍結精液（計 5 種類）を人工授精した。融解方法は試験 2 と同様の方法で行った。

初回人工授精の翌日から 13 日間採卵し、その間 4 日に一度人工授精を実施（合計 4 回）し、14 日目に孵卵器へ入卵した。

入卵から 14 日目に検卵器を卵の鈍端に当てて透視し、受精卵の判定を行った。

結 果

1. 試験 1：精液性状検査

採精の結果 11 羽中 2 羽精液採取ができなかったが、精液の採取された 9 羽の中で精液濃度が濃いと判断された 6 羽の平均精子総数は 32.5 億/ml、薄いと判断された 3 羽の平均精子総数は 18.5 億/ml であった。精子運動性および精子活力は 90+++ から 30+まで個体差が認められた（表 2）。

2. 試験 2：耐凍剤濃度の検討

MA 濃度 2%～9%において、凍結前と凍結融解後の精子活力及び運動性を比較したところ、MA 濃度 6%～9%で融解後の精子活力及び運動性が 50++以上と良好に維持されていた（表 3）。

MA 濃度 6～9%の凍結精液の受精率は 6%が

表3 MA濃度と精子活力及び運動性の比較

MA濃度 (%)	凍結前活力・運動性	融解後活力・運動性
2	90++	10+
3	90++	10+
4	90++	20+
5	90+++	40++
6	90+++	60++
7	90+++	50++
8	80++	70++
9	80++	70++

最良で 69%であった（表 4）。試験 2 の供試鶏と同様の雄および雌の群で原精液を用いた人工授精の受精率は 70.7%であり、これとほぼ同等の成績であった。

3. 試験 3：冠地どり種鶏雌を用いた授精確認

一次希釈から二次希釈までの静置時間 30 分での受精率は、MA 濃度 4%で 20%、MA 濃度 5%で 31.3%、MA 濃度 6%で 54.8%であった（表 5）。

一次希釈から二次希釈までの静置時間 60 分での受精率は、MA 濃度 5%で 9.9%、MA 濃度 6%で 23%であった（表 5）。

表4 MA濃度と受精率の比較

MA濃度 (%)	産卵数 (個)	授精卵個数 (個)	受精率 (%)
6	26	18	69
7	32	15	47
8	19	4	21
9	19	7	37

表5 MA濃度および静置時間別の受精率の比較

区分	MA濃度	凍結前活力・運動性	融解後活力・運動性	受精率 (%)
静置時間30分	4%	90++	70++	20.0
	5%	90+++	60+	31.3
	6%	80++	60+	54.8
静置時間60分	5%	80+	60+	9.9
	6%	80++	60+	23.0

考 察

通常、鶏の精液量は 1 回の射出で 0.5 ml、精子総数は 40 億/ml という報告¹⁾があり、本試験において冠地どりも同等の精液量および精子総数を確認することができた。しかし、1 羽当たり採精量が少なく個体毎の凍結は困難であるため複数羽を採精し、混合原精液として凍結を行ったが、凍結前や融解後の精液性状に混合による影響は見られなかった。また、須藤ら²⁾の報告にあるように耐凍剤への感受性は鶏種や系統により異なり、ロードアイランドレッド種が MA 濃度 7%、みえ特産鶏が MA 濃度 9% と鶏種²⁾³⁾によりばらつきがある。本研究において冠地どりの生産に供される三元雄系統の雄では MA 濃度 6% 時の受精率が 54.8% から 69% と高く、凍結精液作製に最適な耐凍剤濃度であることが明らかとなった。

本試験を行ったウインドレス鶏舎では、年間を通して環境の変動が少ないように設定されており、自然交配や人工授精での受精率に季節による影響は出にくい。精液の凍結保存では精液を低温で維持し作業するため、温度感作が少ない秋から春にかけてが精液をより良い状態に保つことができることが示唆された。また、鶏の精子は哺乳類の精子に比べ、低温ショックに対する感受性が強く⁴⁾、採精後 15 分以内に一次希釈し、5℃の冷水で静置することで耐凍性が高められる⁵⁾と報告がある。しかし、本試験を行ったウインドレス鶏舎と凍結作業を行う場所は異なるため、一次希釈から二次希釈までの時間が延長する可能性が考えられた。そのため、二次希釈までの時間を延長して凍結精液を作製したが、受精率は MA 濃度 5% では 9.9%、MA 濃度 6% では 23% に低下した。この結果は独立行政法人家畜改良センター岡崎牧場³⁾の結果と同等であった。このことから、三元雄系統の雄の凍結精液作製においては、独立行政法人家畜改良センターの技術マニュアル¹⁶⁾どおりの凍結方法が適当であると考えられた。

文 献

- 1) William O. Reece 著，明解哺乳類と鳥類の生理学 第 4 版，p414 ～ p416，鈴木勝士監修，学窓社
- 1) 須藤正巳，地鶏の遺伝資源保存等に影響を及ぼす阻害因子に関する試験（鶏の凍結精液利用技術の確立），茨城畜産研究報告 44 号，2011
- 3) 独立行政法人家畜改良センター岡崎牧場，凍結精液による鶏遺伝資源の保存及び活用マニュアル
- 4) 西山久吉，雄鶏の生殖器と精液および受精，日本家禽学会誌 15 巻 1 号，1978
- 5) 独立行政法人家畜改良センター，鶏の繁殖技術マニュアル，家畜改良センター技術マニュアル 16