

# 「鳥取地どりピヨ」の遺伝資源保存技術の開発

福間規夫・森田憲嗣・石倉可奈美

## Development of gene preservation techniques of

## Tottori-jidori "PIYO"

Norio FUKUMA, Kenji MORITA, Kanami ISHIKURA

### 要 約

高病原性鳥インフルエンザ等の発生により、発生農場の鶏は種鶏も含めて全廃棄されるため、試験場で発生すれば鳥取県で長年開発、改良してきた「鳥取地どりピヨ」は消滅することになる。そこで「鳥取地どりピヨ」の遺伝資源を保存するため凍結精液保存技術を開発し、「鳥取地どりピヨ」の種鶏の遺伝子を雄側で保存する方法を検討した。

その結果、精液の凍結に用いる耐凍剤としてメチルアセトアミド (MA) が優れており、そのストロー内最終濃度は 8% が最適であることが判明した。また人工授精に際しては雌腔深部への授精がより成績が高くなることも判明した。

### 緒 言

「鳥取地どりピヨ」は 1987 年からシャモを主体に横斑プリマスロック、白色コーニッシュ、白色プリマスロック、ロードアイランドレッドとのいろいろな組み合わせの中から 5 年間の試験研究を経て 1992 年に開発された鳥取県の地鶏である。交配様式は三元交配でシャモ♂にロードアイランドレッド♀をかけてできた F1♂に白色プリマスロックをかけて生産されるものであり、2016 年度で 13,000 羽程度が出荷されている。

一方、平成 16 年に山口県において 79 年ぶりに発生した高病原性鳥インフルエンザは、その後全国各地で毎年のように発生報告がされ、これまでに 22 道府県で約 1,200 万羽もの鶏が殺処分されている。発生は国外での発生に関与したウイルスが国内に侵入することによりおきていると考えられているが、養鶏農場の必死の防疫対策にもかかわらず、いつどこで発生してもおかしくない状況が続いている。

このような情勢のなか、万一場で高病原性鳥インフルエンザが発生すれば、飼養鶏は全て淘汰となり、「鳥取地どりピヨ」は消滅することになる。

これに対応すべく、生鶏を県内農業高校に委託飼育するなどリスク分散に努める一方、不幸にも発生してしまった場合、地鶏を復活させることが可能な体制を構築することを検討した。即ち凍結精液を用い、戻し交配による「鳥取地どりピヨ」の復活である。

凍結精液技術については牛及び豚においてグリセリンを用いる凍結手法が主流であるが、鶏の場合希釈精液中に一定濃度以上のグリセリンが含まれていると、受精率が顕著に低下すると言われている。このため融解後速やかに希釈除去する必要があり、その技術的煩雑さから新しい手法が模索されてきた。

近年、家畜改良センター岡崎牧場がアミド類である MA を耐凍剤とした簡便な手法を用い高い受精率を得たと報告している<sup>1)</sup>。その一方、必要な耐凍剤の濃度は用いる品種や系統により異なることも併せて言及しており<sup>2)</sup>、この報告を手がかりとして今回「鳥取地どりピヨ」の種鶏の凍結精液製造技術の開発を行うこととした。

### 材料と方法

#### 1. 試験 1 (MA 濃度が受精に与える影響)

##### 1) 供試材料

GSR (シャモ♂×ロードアイランドレッド♀)♂ (H25.6.25 孵化) を 36 週齢到達後、マッサージ法にて採精し 0.5ml ストロー計 462 本の凍結精液を作成し供試した。また GSR♀ (H25.6.25 孵化) を 58 週齢で 12 羽ずつ程度を各試験区に供試し、週 2 回人工授精を行いながら 14 日間集卵した。

##### 2) 試験区分

- MA6%区: 二次希釈液に MA を最終濃度 6% となるよう加えたもので凍結処理を行った区。
- MA7%区: 二次希釈液に MA を最終濃度 7% となるよう加えたもので凍結処理を行った区。

- ・MA8%区：二次希釈液にMAを最終濃度8%となるよう加えたもので凍結処理を行った区。
- ・MA9%区：二次希釈液にMAを最終濃度9%となるよう加えたもので凍結処理を行った区。

3) 試験手法

家畜改良センター岡崎牧場のメチルセアミド添加法<sup>1)</sup>

による凍結手技(表1)を用い、各濃度区(最終濃度6、7、8及び9%)の凍結精液を作成し、雌鶏に人工授精を行い、受精率および孵化率の比較を行った。

4) 調査項目

受精率・孵化率・孵卵残渣

表1. 鶏精液の凍結及び融解・注入の方法

工程	採精	一次希釈	静置	二次希釈	凍結・保存	融解・注入
内容	精液濃厚部のみ採取し、5℃保存した一次希釈液で直ちに希釈	5℃30分		5℃環境下において、濃度設定した耐凍剤を主成分とした希釈液で二次希釈。その後0.5mlストローに充填。	液体窒素酸化蒸気で30分間急速凍結	5℃冷水に100秒間浸漬し融解。2分以内に羽当たり0.3mlそのまま人工授精。

2. 試験2(各種耐凍剤が受精に与える影響)

1) 供試材料

第1期：GSR♂(H26.6.24 孵化)を48週齢到達後、マッサージ法にて採精し、0.5mlストロー計164本の凍結精液を作成し供試した。またGSR♀(H26.6.24 孵化)を62週齢で15羽ずつ程度各試験区に供試し、週2回人工授精を行いながら14日間集卵した。

第2期：GSR♂(H27.6.23 孵化)を36週齢到達後、マッサージ法にて採精し0.5mlストロー計338本の凍結精液を作成し供試した。またGSR♀(H27.6.23 孵化)を68週齢で15羽ずつ程度各試験区に供試し、週2回人工授精を行いながら11日間集卵した。

2) 試験区分

第1期：

- ・DMF区：二次希釈液にジメチルホルムアミド(DMF)を最終濃度8%となるよう加えたもので凍結処理を行った区。
- ・DMA区：二次希釈液にジメチルアセトアミド(DMA)を最終濃度8%となるよう加えたもので凍結処理を行った区。
- ・MA区：二次希釈液にMAを最終濃度8%となるよう加えたもので凍結処理を行った従来区。

第2期：

- ・DMSO区：二次希釈液にジメチルスルホキシド(DMSO)を最終濃度4%となるよう加えたもので凍結処理を行った区。
- ・EG8%区：二次希釈液にエチレングリコール(EG)を最終濃度8%となるよう加えたもので凍結処理を行った区。
- ・EG12%区：二次希釈液にEGを最終濃度12%となるよう加えたもので凍結処理を行った区。
- ・MA区：二次希釈液にMAを最終濃度8%となるよ

う加えたもので凍結処理を行った従来区。

3) 試験手法

家畜改良センター岡崎牧場の手法に準じて、各種耐凍剤を各濃度に調整した凍結精液を作成し、雌鶏に人工授精を行い、受精率および孵化率の比較を行った。

4) 調査項目

受精率・孵化率・孵卵残渣

3. 試験3(精液の深部注入が受精に与える影響)

1) 供試鶏

GSR♂(H27.6.23 孵化)を46週齢到達後、マッサージ法にて採精し、凍結精液を作成し供試した。またGSR♀(H27.6.23 孵化)を68週齢で25羽ずつ程度各試験区に供試し、2回人工授精を行い、5日間集卵した。

2) 試験区分

- ・8cm区：使い捨て注射器の先端にプラスチックカテーテルを装着し雌膣内挿入長8cmとなるように調整した注入器を用いて人工授精した区。
- ・4cm区：使い捨て注射器の先端にプラスチックカテーテルを装着し雌膣内挿入長4cmとなるように調整した注入器を用いて人工授精した従来区。

3) 試験手法

家畜改良センター岡崎牧場の手法に準じて凍結を実施した後、各区異なったカテーテルを用いて雌鶏に人工授精を行い受精率および孵化率の比較検討を行った。

4) 調査項目

受精率・孵化率・孵卵残渣

## 結果

### 1. 試験1

MAを最終濃度6~9%に濃度設定して凍結精液を作成し、授精試験を行ったところ8、7、9、6%の順で高い受精率、孵化率を示した。MA8%区の受精率は73.8%、孵化率は44.1%であった。一段階濃度の高

いMA9%区の受精率は65.2%、孵化率は39.2%、一段階濃度の低いMA7%区の受精率は67.1%、孵化率は40.3%で、さらに濃度の低いMA6%区の受精率は42.8%、孵化率は30.4%と試験区中最も低い値であった。(表2)また発生したヒナのうち、MA7~9%区において数羽ずつの不良ヒナが見られたがMA6%区では見られなかった。(表3)

表2. MA各濃度下における受精成績(試験1)

区分	供試羽数 (羽)	入卵個数 (個)	無精卵 (個)	受精率 (%)	発生ヒナ	
					羽数(羽)	孵化率(%)
MA6%区	10	96	52	42.8	31	30.4
MA7%区	11	103	35	67.1	43	40.3
MA8%区	11	98	29	73.8	44	44.1
MA9%区	13	114	36	65.2	50	39.2

表3. MA各濃度下における発生ヒナの内容(試験1)

試験区	発生ヒナ(羽)			健康ヒナ
	発生ヒナ	不良ヒナ	内容	
MA6%区	31	0		31
MA7%区	43	3	虚弱:1 臍障害:2	40
MA8%区	44	2	虚弱:1 臍障害:1	42
MA9%区	50	4	虚弱:1 臍障害:3	46

### 2. 試験2

第1期:これまで耐凍剤として用いてきたMA区が受精率65.6%、孵化率52.4%と最も高く、DMF区が受精率55.7%、孵化率44.9%、DMA区が受精率38.1%、孵化率26.5%で受精率および孵化率ともMA>DMF>DMAの順に高い値が得られた(表4)。また発生ヒナの内容に差は見られなかった(表5)。

第2期:これまで耐凍剤として用いてきたMA区が受精率67.0%、孵化率60.5%と最も高く、DMSO区が受精率49.4%、孵化率31.2%とこれに次いたが、EGを耐凍剤に用いた区は8%区が受精率5.4%、孵化率2.9%、12%区が受精率7.7%、孵化率3.8%と低い値であった(表6)。また発生ヒナの内容に差は見られなかった(表7)。

表4. 各種耐凍剤を用いた場合の受精成績(試験2・第1期)

区分	供試羽数 (羽)	入卵個数 (個)	無精卵 (個)	受精率 (%)	発育中止卵(個)			嘴打 (個)	発生ヒナ	
					初期	中期	後期		羽数(羽)	孵化率(%)
DMF区	15	115	46	55.7	3	3	7	0	56	44.9
DMA区	14	105	61	38.1	5	5	2	0	32	26.5
MA区	12	106	32	65.6	12	0	3	0	59	52.4

表5. 各種耐凍剤を用いた場合の発生ヒナの内容(試験2・第1期)

区分	発生ヒナ(羽)			健康ヒナ
	発生ヒナ	不良ヒナ	内容	
DMF区	56	2	臍障害:2	54
DMA区	32	2	臍障害:2	30
MA区	59	3	虚弱:1 臍障害:2	56

表6. 各種耐凍剤を用いた場合の受精成績(試験2・第2期)

区分	供試羽数 (羽)	入卵個数 (個)	無精卵 (個)	受精率 (%)	発育中止卵(個)			嘴打 (個)	発生ヒナ	
					初期	中期	後期		羽数(羽)	孵化率(%)
DMSO区	15	106	55	49.4	12	0	3	1	35	31.2
EG8%区	15	125	118	5.4	3	0	0	0	4	2.9
EG12%区	15	102	94	7.7	4	0	0	0	4	3.8
MA区	14	101	29	67.0	4	0	0	3	65	60.5

表7. 各種耐凍剤を用いた場合の発生ヒナの内容(試験2・第2期)

区分	発生ヒナ(羽)			
	発生ヒナ	不良ヒナ	内容	健康ヒナ
DMSO区	35	2	虚弱:1 臍障害:1	33
EG8%区	4	1	臍障害:1	3
EG12%区	4	2	虚弱:1 臍障害:1	2
MA区	65	1	臍障害:1	64

表8. 精液の深部注入が受精に与える影響(試験3)

区分	供試羽数 (羽)	入卵個数 (個)	無精卵 (個)	受精率 (%)	発育中止卵(個)			嘴打 (個)	発生ヒナ	
					初期	中期	後期		羽数(羽)	孵化率(%)
8cm区	27	71	25	66.4	9	0	5	0	32	48.8
4cm区	25	80	33	56.1	5	1	2	1	38	45.9

### 3. 試験3

カテーテル長を8cmに調整した区の受精率66.4%、孵化率48.8%と従来の4cm長の区の受精率56.1%、孵化率45.9%より高い値が得られた(表8)。

#### 考察と今後の展開

鶏における遺伝資源の保存法として、生鶏の分散管理とならんで凍結精液による雄側遺伝子の保存はコスト面を含めて有効な手段の一つとして考えられる。

今回、家畜改良センター岡崎牧場の手法に準じ凍結精液を製造したところ、高い受精率及び孵化率が得られた。耐凍剤として使用したMAは最終濃度8%時に最も高い値であったものの、受精雌個体別にみると0~100%と大きくばらつき、受精成立に雌側の要因も大きいことが推測された。

また授精に使用したプラスチックカテーテルの長さは従来用いていた4cm長のものより8cm長の方が良好な成績であった。雌生殖器に2カ所ある精子貯留腺のうち、一つは子宮膈移行部に存在し<sup>1)</sup>、膈長は7cmであることから<sup>3)</sup>、8cm長のカテーテルがより確実に精子貯留腺に近くに精子を送っていること、

また試験に際して4cm長時に比較して、人工授精後の精子の漏れが少なかったことから、この長さの有効性が推定できた。

本試験において、凍結保存精液を用いた遺伝子保存技術が実用化の域に達したことから、万一の際の備えとして、凍結精液ストローの貯蔵による雄側因子の保存が有効な手法であると考えられた。

#### 謝辞

鶏精液凍結技術に関する研修を快く受け入れてくださった独立行政法人 家畜改良センター岡崎牧場に感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 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. 2005.
- 2) 独立行政法人 家畜改良センター岡崎牧場 (編). 凍結精液による鶏遺伝資源の保存及び活用マニュアル. 2010.
- 3) 加藤 嘉太郎. 家畜比較解剖図説 下巻. 1961. 養賢堂 pp. 388.