

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

独立行政法人 家畜改良センター

はじめに

独立行政法人家畜改良センター岡崎牧場では、能力の優れた卵用鶏を作り出すため、系統造成を中心とした育種改良業務に取組んでいます。その一環として、凍結精液利用技術やキメラ鶏作出技術の開発・実用化も手がけています。こうした技術開発の現状と成果を取りまとめ、関係者の業務の実施、技術の向上に役立ててもらうことを主目的に、「鶏の繁殖技術マニュアル」を作成しました。

このマニュアルの作成者は、鶏の生殖器官の構造を手始めに、精子の神秘的な生命現象や性決定のメカニズム等を学術的なクールなタッチで解説してくれています。読み進めていくうちに出てくるであろう素朴な疑問にも、脇道コラムで解説しています。脇道コラムは、普段鶏に関わっている方も、全く鶏のことを知らない方も興味をもって読んで頂けるような内容になっています。

岡崎牧場で開発・実用化を手がけている技術に関しては、写真やイラストを多用して分かりやすく説明しています。ひとつひとつの作業が写真によって説明されており、初心者でもとてもイメージがしやすくなっています。また、これらの技術について、経験からしか分からぬ事が多く書かれており、実際に取り組もうとしたときに役立つ情報が沢山あります。

一般の養鶏農家の方々にとって、このマニュアルで解説されている事項は、馴染みの無い事項であったり、日常の鶏の飼育管理とは無縁の事項であるかもしれません。しかし、このマニュアルを一読してもらうと、自ら飼育している鶏が、いかに神秘的な生き物であるか、また、能力の優れた鶏を作り出すためには、幅広い知識と技術に裏打ちされた弛まぬ取り組みが必要となるかを理解していただけると思います。

鶏の育種改良を進めるためには、鶏の育種に関する知識・技術をはじめ、鶏の繁殖のメカニズムや鶏飼育に関する総合的な技術の蓄積と活用が求められます。本書は、これから繁殖技術を学ぼうとする方、学生の方、養鶏農家の方など、幅広い範囲の方々に活用して頂ける内容になっております。ぜひ多くの方に読んで頂き、日本の養鶏関係技術の更なる発展に役立っていくことを期待しております。

独立行政法人 家畜改良センター岡崎牧場
場長 山本達雄

目 次

I. 生殖器官と生殖細胞	1
1. 雄の生殖器官	1
(1) 精巣	1
(2) 精巣上体	3
(3) 精管	4
(4) 副生殖器官	4
(5) 交尾器	4
脇道コラム 去勢技術	5
2. 精液と精子	6
(1) 精液の特性	6
(2) 精子の形態	8
(3) 精子の運動性	9
脇道コラム 体外受精	10
3. 雌の生殖器官	11
(1) 卵巣	11
(2) 卵管	12
脇道コラム 卵は鋭端と鈍端のどちらから産まれてくるか	13
4. 受精と分割	14
(1) 精子の移動と貯留	14
(2) 受精	14
(3) 受精卵の分割	15
脇道コラム 偽受精	17
5. 性分化	18
(1) 生殖細胞の分化	18
(2) 性決定と性分化	19
脇道コラム 性決定あれこれ	20
II. 人工授精と自然交配	21
1. 人工授精	21
(1) 精液採取	21
(2) 精液注入	24
(3) 種卵採取	28
(4) 精液の液状保存	28
脇道コラム 雄の毛刈り	28

2. 精子検査法	29
(1) 精子活力検査	29
(2) 精子数の測定	30
(3) 奇形精子率	32
脇道コラム 雄の強制換羽	33
脇道コラム 肉斑（ミートスポット）	33
3. 自然交配	34
(1) 大群交配	34
(2) 単雄交配	34
(3) 群飼ケージ交配	35
(4) 性行動	36
脇道コラム 属間交配と種間交配	38
III. 凍結精液技術	39
1. 凍結精液作製に当たって	39
(1) 凍結に対する精子の特性	39
(2) 凍結精液作製のための採精	39
(3) 膨深部注入	40
脇道コラム 凍結方法の種類	41
2. 凍結精液作製法	42
(1) 家畜改良センター岡崎牧場の方法 (MA、急速ストロー法)	42
(2) Lake の方法 (Gly、プログラムフリーザー法)	45
(3) Sexton の方法 (DMSO、プログラムフリーザー法)	46
(4) Terada の方法 (Gly、ペレット法)	47
(5) Hujihara の方法 (DMSO、急速ストロー法)	48
(6) 農業生物資源研究所の方法 (Gly、急速ストロー法)	49
脇道コラム 精子の低温ショック	50
3. 精液希釈液	51
(1) 必要成分	51
(2) 代謝基質	51
(3) 緩衝剤	51
(4) pH 調整剤	52
(5) 凍結保護物質	52
(6) 抗菌剤	53
(7) その他の成分	53
(8) 既存の精液希釈液の特徴	53
(9) 新希釈液の試作法	54

IV. ふ卵技術	58
1. ふ卵	58
(1) ふ卵器の種類	58
(2) ふ卵温度	58
(3) ふ卵湿度	59
(4) 換気	59
2. 貯卵	60
(1) 貯卵温度	60
(2) 貯卵湿度	60
(3) 貯卵中の種卵の向き	60
(4) 予備加温	62
(5) 長期貯卵	62
3. ふ卵管理	63
(1) 集卵	63
(2) 種卵選別	63
(3) 種卵消毒	63
(4) 入卵	64
(5) 検卵	64
(6) ハッチャー移し	66
(7) 発生作業	67
(8) 加温処理技術 (マイコプラズマ対策)	68
[脇道コラム] 卵は何度で固まるか?	71
[脇道コラム] ゆで卵の卵黄の色	71
[脇道コラム] ホルマリン薰蒸	71
4. 伴性遺伝子を利用した雌雄鑑別	72
(1) 遅羽性遺伝子	73
(2) 銀色遺伝子	73
(3) 横斑遺伝子	76
[脇道コラム] 羽色に関する遺伝について	77
V. キメラ関連技術	78
1. キメラの利用	78
[脇道コラム] キメラとは	81
2. 体外培養法	82

3. 体外培養法を用いた胚盤葉キメラの作出方法	83
(1) 水溶性卵白採取	84
(2) ドナーとする胚盤葉細胞の採取方法	85
(3) レシピエント胚へのドナー細胞の注入	87
(4) 体外培養法システムⅡ	88
(5) 体外培養法システムⅢの卵殻移し替え	91
(6) 体外培養法システムⅢの発生までの作業	93
脇道コラム 窓開け受精卵法	95
4. 始原生殖細胞 (PGC) 関連技術	98
(1) PGC の採取方法	98
(2) 血液中の PGC の計測法	99
(3) PGC の PAS 染色	100
VI. 統計処理 (受精率、ふ化率などの検定方法)	101
1. 数値変換を行ってパラメトリック検定で行う方法	101
(1) 検定の順序	101
(2) 正規性と等分散性の検定	101
(3) アークサイン変換	102
(4) t 検定	102
(5) 分散分析	102
(6) 多重比較検定	106
(7) 統計モデル	106
2. ノンパラメトリック検定	107
(1) ノンパラメトリック検定の種類	107
(2) ノンパラメトリック検定での多重比較検定	107
3. 分割表などによる検定 (カイ 2 乗検定)	108
(1) 2×2 の分割表による独立性の検定	108
(2) $2 \times m$ 、 $m \times n$ による分割表による検定	108
(3) 適合度の検定	108
参考図書	109

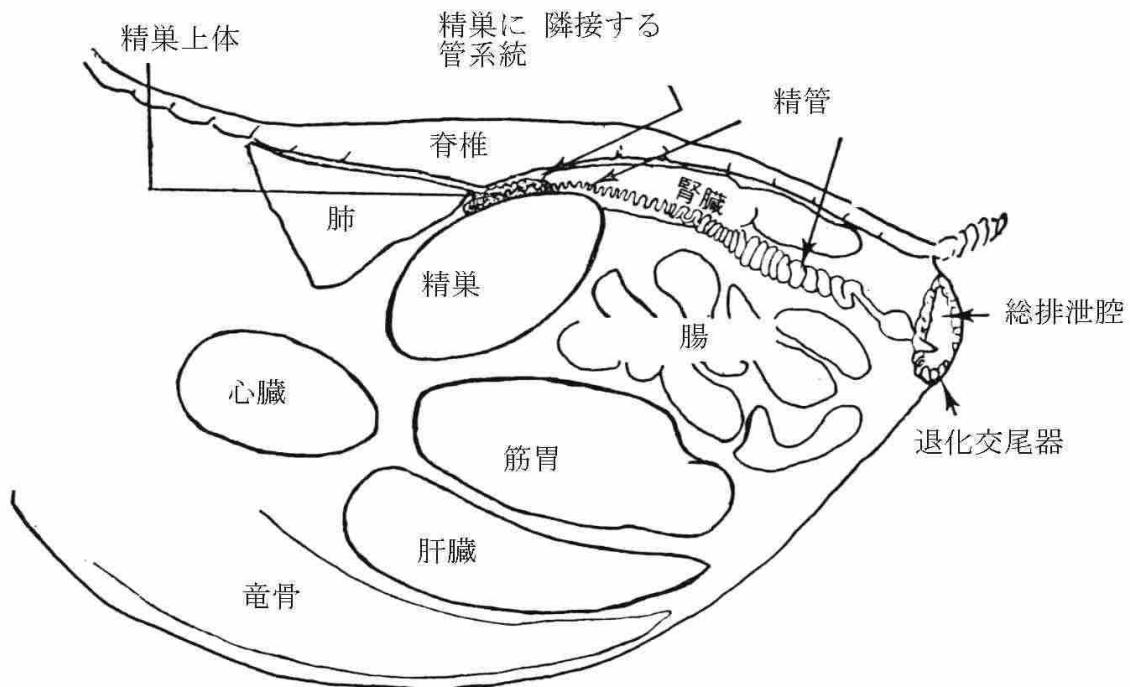
I. 生殖器官と生殖細胞

1. 雄の生殖器官

雄鶏における生殖器官は、精巣、精巣上体、精管、副生殖器官、退化交尾器からなる。哺乳類の雄に見られる前立腺、カウパー腺、精囊腺、尿道球腺などの副生殖腺はなく、総排泄腔旁脈管体（脈管豊多体）からなるリンパ様液（透明液）によって精管を通ってきた精液は射精の際に希釈される。

（1）精巣

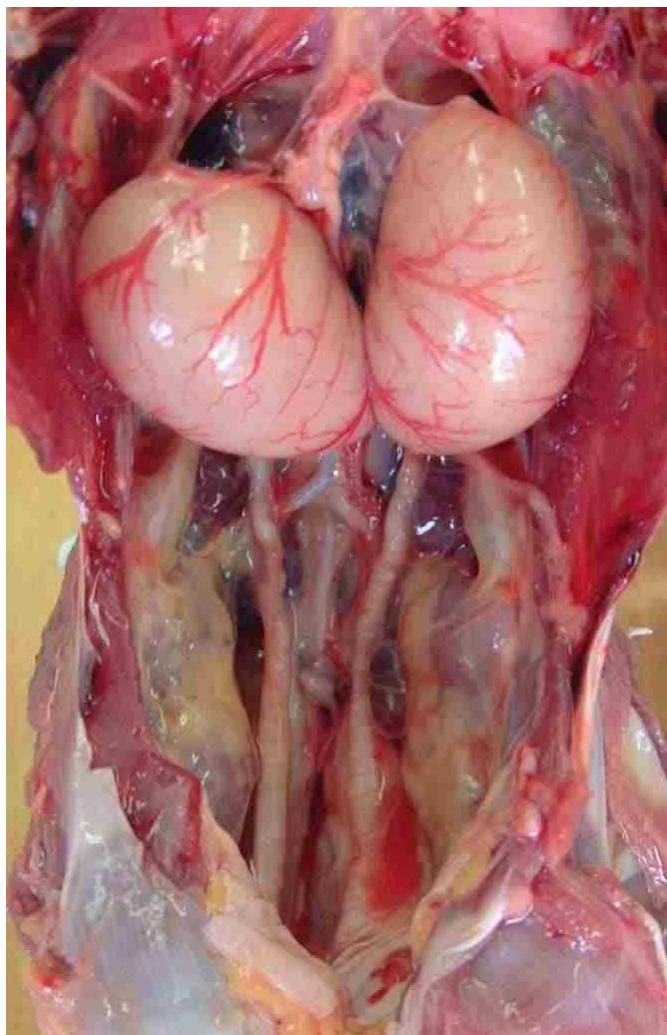
位置：ニワトリの精巣は、多くの哺乳類の精巣に見られる精巣下降がおこらないので、発生の原位置すなわち腎臓の前縁に隣接し、背壁から吊り下がっている。精巣は腹腔内にあり、他の内臓に取り囲まれているので、43°Cの深部平均体温に近い温度で機能を果たしている。



雄鶏の胸部と腹部の断面図による内臓の位置関係

(鶏の繁殖と産卵の生理、国立出版、1977. より)

形態：ニワトリの精巢は卵円形で、通常乳白色をしている。しかし、時には一部あるいは全部が黒色のことがある。重さは、14~60g であって品種や個体によって変異が大きい。鳥類は元々季節繁殖動物であるため、育種改良の進んだ鶏の場合においても、通常の繁殖季節（1月~4月）では精巢の長さは25~60mmであるが、非繁殖季節（9~12月）では10~15mmまで減少し、それに伴って精液量も減少する。繁殖季節を持つ鳥類においては鶏以上に大きな変化を示す。この性機能の旺盛な時期における精巢の増大は間細胞の増加と精細管の太さおよび長さの増大であり、性機能の旺盛な時期では精巢重量は体重の6~8%である。換羽などで造成機能が中止され萎縮した精巢の色は、乳白色から黄白色へと変化する。



細部構造：哺乳類と同様に精巢は白膜に包まれているが、鶏の白膜は2層に分かれ、外層は薄く内層はやや厚い。内層の白膜は分岐し、精巢実質の支柱となるが、哺乳類のように実質を小葉に区分することはない。精細管も哺乳類と異なり、互いに吻合し網状を呈し、その末端は盲管とならず、白膜に接するだけで他の精細管と連絡している。精細管と精細管の間には、結合組織からなる間質組織が存在し、血管、神経纖維、間細胞（ライディッヒ細胞）などが含まれ、間細胞からはアンドロジエンが分泌される。成鶏では精細管が大きく発達しているため間質組織はあまり目立たない。

成鶏雄の精巢と精管

精細胞：未成熟あるいは非繁殖季節の鳥類の精細管は精祖細胞とセルトリ細胞からなる一層の上皮でおおわれている。性的活動期にはセルトリ細胞のほか、精祖細胞、精母細胞（一次精母細胞）、精娘細胞（二次精母細胞）、精子細胞および精子からなる数層の上皮になる。セルトリ細胞の微細構造は、他の脊椎動物と基本的に一致し、鳥類精巢にも血液精巢閥門が存在する。これによって、血液由来の物質がセルトリ細胞、精祖細胞および精母細胞には直接的に輸送されるが、精娘細胞以後の精細胞にはセルトリ細胞の細胞質を介して運ばれる。精子形成において血液精巢閥門は重要な役割を果たしており、この機構が障害を受けると精子形成は行われなくなる。

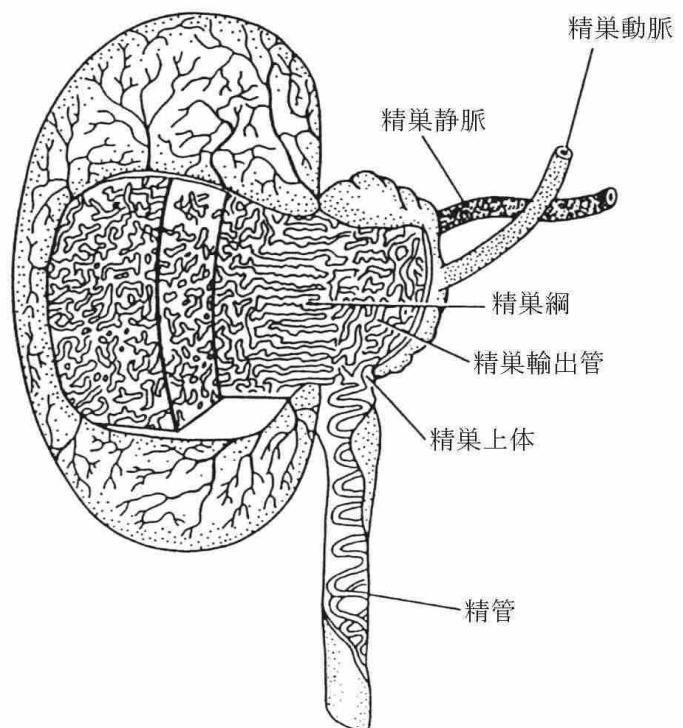
精子形成：精祖細胞は有糸分裂によって精母細胞に、精母細胞は減数分裂の第一分裂によって精娘細胞に、精娘細胞は減数分裂の第二分裂によって精子細胞となり、その後、変態過程を経過して精子がつくられる。精母細胞から精子になるまでに要する日数は約 12 日と推定されている。

（2）精巢上体

精巢上体は、哺乳類のものに比べると非常に小さく、頭、体、尾の区別ができる。その大部分は結合組織によっておおわれており、哺乳類の精巢網と精巢輸出管にあたる管系と精巢上体管からできている。精巢輸出管の内側に重層の上皮細胞からなる粘膜ヒダのあるのが特徴で、

輸出管の数カ所が精巢上体管の側面に結合している。この短い精巢上体管は哺乳類の精巢上体頭に相当すると考えられている。

精巢上体は精巢において生産された精子を成熟させ、受精能力を与える機能をもつ。精巢で生産された精子は、形態的には完成した精子であるが、ほとんど受精能力をもたず、精巢上体と精管を通して受精能を獲得する。



ニワトリの精巢と精巢上体

（家畜繁殖、朝倉書店、1994. より）

(3) 精管

精管は、哺乳類のように直線状ではなく、屈曲した長い管で、腎臓の腹側に沿って走り精管乳頭突起から総排泄腔に達している。精管は後部ほど太くなっている。末端では内腔が広がっている。この部分を精管膨大部とよんでいる。精管は哺乳類の精巢上体の体と尾に相当するものと考えられており、精子のほとんどは精管後部に貯留されている。精管内の精子は3~4週間生存できるといわれている。しかし、通常精子が精巢から出て射精されるまでの時間は、交尾が頻繁に行われている場合では約24時間である。

(4) 副生殖器官

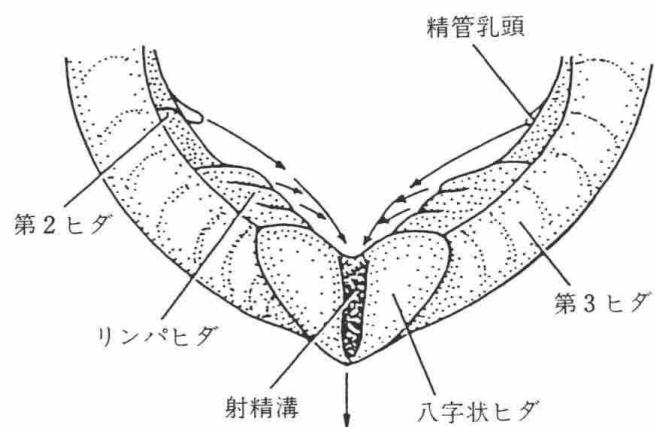
副生殖器官として総排泄腔旁脈管体（脈管豊多体）とリンパヒダある。総排泄腔旁脈管体は、総排泄腔の両側にある精管乳頭の外側にある赤色の小体で、毛細血管の集合した組織小体である。この器官で生成されるリンパが交尾器の勃起を惹起する。このリンパは、総排泄腔旁脈管体に続くリンパヒダの粘膜上皮の細胞間隙から浸出して透明液となり、精管乳頭から射出される精液と混合して射出精液となる。

リンパヒダは八字状ヒダに隣接する2~3本のヒダで、少し盛り上がった外観をしており、粘膜表面は薄い桃色を呈している。リンパによって交尾器が勃起すると、リンパヒダが大きく膨大するため区別ができるようになる。さらに膨大した八字状ヒダによって、総排泄腔中央部に一時的に射精溝が形成される。

(5) 交尾器

ニワトリの交尾器は、総排泄腔の腹壁中央に位置し、退化交尾器と呼ばれる小さな生殖突起と八字状ヒダからなる。常時は総排泄腔に隠れて見えないが、性的刺激を受けるとリンパの流入により

勃起し、ハート状に突出する。鳥類は全てが退化交尾器ではなく、アヒルは10cm程度の陰茎を持ち、ホロホロチョウは大突起を、ウズラは小突起を、七面鳥は鶏と同様の退化交尾器を、ハトは退化交尾器さえ無いなど様々である。



雄鶏の交尾器（性的刺激を受けた状態）

（家畜繁殖、朝倉書店、1994. より）

肠道コラム 去勢技術

鶏の去勢雄は、フランス語で *chapon* (シャポン)、英語で *capon* (ケーポン) と呼ばれ、半年程度飼育した去勢雄の鶏肉はフランスでは最高級の肉となります。去勢は、3～4週齢が行いやすく、精巣は腹腔内にあるため開腹手術で去勢します。去勢方法は色々あると思いますが、岡崎牧場での方法は、まず内腿の皮を切った後で、第7肋骨（肋骨のいちばん後ろ）に沿って太い血管を切らないように切開し、内臓を指でどかして精巣が見えるようにして、先の曲がったピンセットで精巣を摘んで取り出します。縫合は、Dr.STICHES 縫合器 (C-29、夏目製作所) を用いています。



① メスで肋骨の一番後ろにそって切開。



② 内臓をどかして、精巣を先の曲がった
ピンセットで摘んで取り出す。



③ Dr.STICHES 縫合器 (C-29) を用いて
2～3ヶ所縫合する。



④ 縫合完了。翌日には瘡蓋でふさがり、
1週間後には完治している。

2. 精液と精子

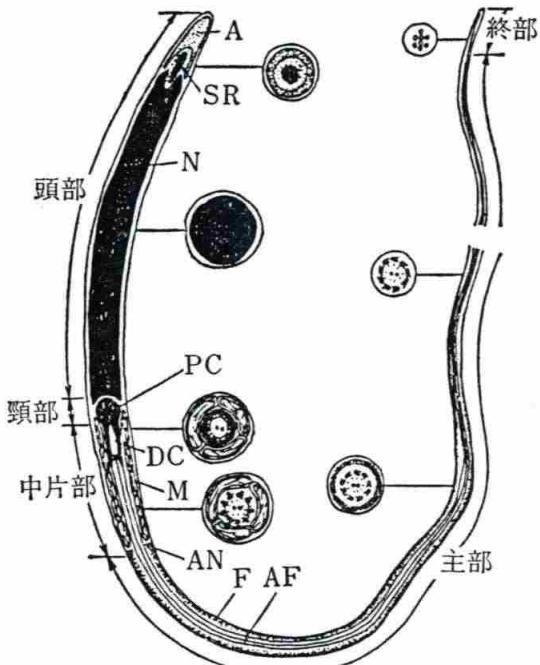
(1) 精液の特性

精液の性状：精液は精子と精漿とからなっている。精漿は精巣、精巣上体、精管からの分泌液と透明液とが混合したものであり、精液の性状（精子濃度、活力、pHなど）および量は透明液の混入割合によって大きく影響される。さらに、透明液の混入割合は品種、系統、個体、季節、年齢、飼養方法、精液採取方法、採取頻度などによって大きく異なる。

通常の射出精液は粘稠で乳白色であり、精液量は0.1～0.5ml、1ml当たりの精子数は30～50億で、pHは7.0～7.6の範囲である。

精液の化学的組成：鶏精液の大きな特徴は、家畜精液中に多く含まれる糖がフルクトースであるのに対し、鶏ではグルコースであることと、家畜ではクエン酸が多く含まれるのに対して、鶏ではグルタミン酸が多く含まれる点である。グルタミン酸は、精液の浸透圧やpH維持の役割を果たすとともに、代謝基質として精子に利用されATPを産生する。無機イオンとしては、Na、Cl、K、Ca、Mg、Cu、Zn、Feなどが存在し、pHや浸透圧の維持に関与している。

その中で、NaとClの濃度は比較的高く、K、Ca、Mg、Cu濃度は低く、Zn、Fe濃度はきわめて微量である。Clイオンは鶏精子の呼吸および好気的解糖を促進し、鳥類特有の頸曲がり精子を増加させる。また、鶏精液にはトリプシンインヒビターが多く含まれている。そのトリプシンインヒビターは、死滅精子や障害を受けた精子の先体から放出されたアクロシンの活性を失わせ、正常精子に害を及ぼすことを防ぐのに役立っていると考えられている。



ニワトリ精子の構造

A:先体, AF:軸糸, AN:終輪, DC:遠位中心体, F:線維鞘, M:ミトコンドリア鞘, N:核, PC:近位中心体, SR:先体桿

(新家畜繁殖学、朝倉書店、1988. より)

家畜精液の性状と精漿の化学組成

(参考：鶏の繁殖と産卵の生理、精子学等)

	ウシ	ヒツジ	ヤギ	ウマ	ブタ	ニワトリ			
						全精液	精子	精漿	
								透明液を含む	透明液を含まない
精液量 (ml)	2~10	0.5~2	0.2~2.5	20~300	150~500	0.1~0.5	—	—	—
精子濃度 (億/ml)	3~20	15~50	10~50	0.3~8	0.3~3.5	30~50	—	—	—
pH	6.4~7.8	5.9~7.3	6.4~7.4	6.2~7.9	6.9~7.9	7.0~7.6	—	7.2~7.6	7.0
冰点降下度 (°C)	0.53~0.73	0.55~0.70	0.55~0.70	0.58~0.62	0.54~0.63	0.64~0.81	—	0.63	0.593
Na (mg/100ml)	140~370	110~250	60~183	70~275	290~850	350	335	340	270~380
K (mg/100ml)	50~387	50~190	76~255	60~103	80~410	60	166	30	50~188
Ca (mg/100ml)	24~60	6~15	5~15	20~26	2~6	10	18	17	4~10
Mg (mg/100ml)	7~12	2~13	1~4	3~9	5~14	14	40	—	12
Cl (mg/100ml)	110~430	86~180	82~215	80~448	260~430	150~200	—	190~220	130
グルコース (mg/100ml)	—	—	—	—	—	7.7~92	—	74~108	なし
フルクトース (mg/100ml)	26~981	40~980	10~1590	0~10	3~50	4	—	2	なし
ソルビトール (mg/100ml)	10~136	26~120	—	20~60	6~18	—	—	10	—
グルセロリン酸コリン (mg/100ml)	70~970	1101~2170	890~1970	38~240	40~200	—	—	—	—
イノシトール (mg/100ml)	25~90	7~41	—	11~47	380~750	—	16	20	10
クエン酸 (mg/100ml)	200~1700	110~800	60~710	8~53	36~325	なし	—	—	なし
エルゴチオネイン (mg/100ml)	痕跡	痕跡	0	4~16	6~30	—	—	—	2
アスコルビン酸 (mg/100ml)	3~24	2~8	—	5	2~5	—	—	—	3
乳酸 (mg/100ml)	15~50	35~40	12~90	9~25	20~27	13~40	—	77.4	34.0
ピルビン酸 (mg/100ml)	45	10	—	3	—	—	—	—	2.9
グルタミン酸 (mg/100ml)	35~41	76	—	—	—	—	—	407~1178	1300
タンパク質 (g/100ml)	3~8	5~6	—	1~2	4	1.82~2.8	—	0.7~0.93	0.8

(2) 精子の形態

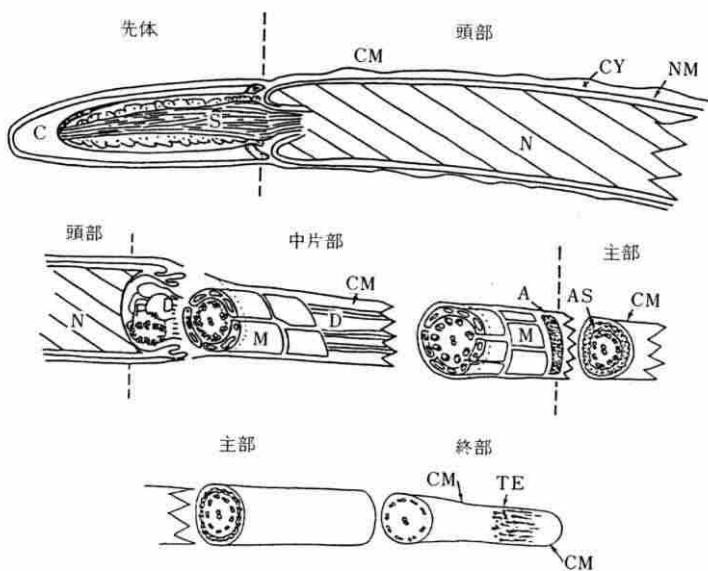
大きさ：ニワトリ精子は、細長い糸状の形をしており、わずかに屈曲した円柱状の頭部（長さ $12.5 \mu\text{m}$ 、最大幅 $0.5 \mu\text{m}$ ）と、その後方に比較的長い尾部（長さ $90\sim100 \mu\text{m}$ ）とからなり、精子の体積は約 $9 \mu\text{m}^3$ である。頭部は長さ $2.5 \mu\text{m}$ の先体（アクロソーム）の部分と長さ $10 \mu\text{m}$ の核の部分からなり、尾部は頸部、中片部（長さ $4 \mu\text{m}$ ）、主部（長さ $80 \mu\text{m}$ ）、終部に分けられる。

家禽精子の大きさ (μm)

種類	頭部	尾部	全長
ニワトリ	13	87	100
シチメンチョウ	19	71	90
ウズラ	22	217	239
ホロホロチョウ	18	63	81
アヒル	16	81	97
ハト	21	112	133

(家禽学、朝倉書店、2000. より)

細部構造：先体は、円錐状で内部に刺状突起がある。中片部には遠位中心子と軸糸の周辺を板状のミトコンドリアが取り巻いており、その数は約 30 個で家畜精子よりかなり少ない。軸糸の $9+2$ 構造は家畜精子と同様であるが、その外側の粗大纖維はなく、主部においては無定形の鞘が軸糸を直接取り巻いている。

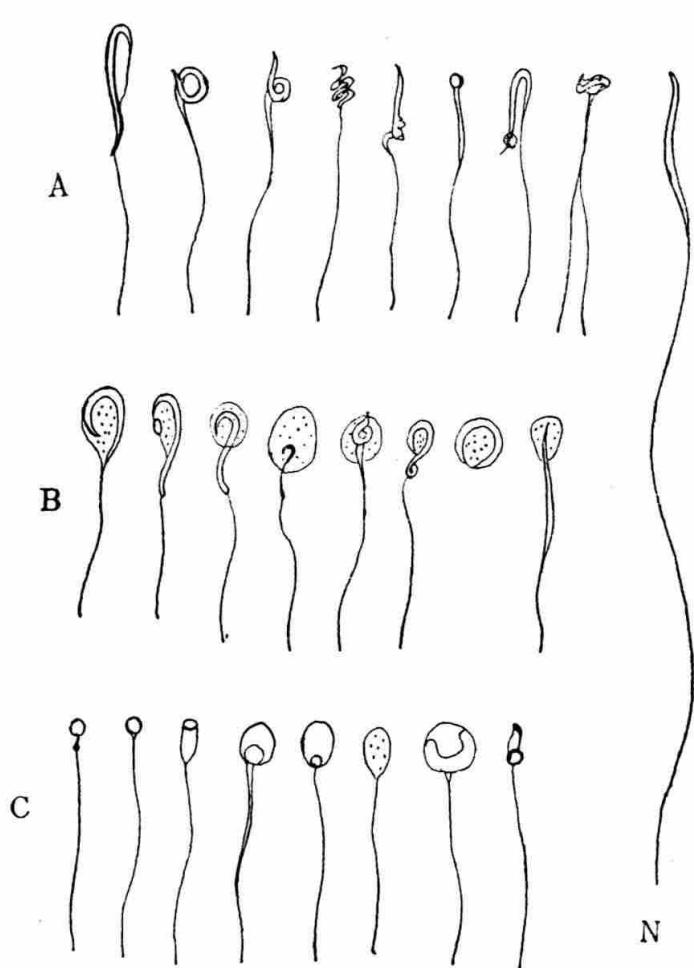


ニワトリ精子の細部構造

C：先体、S：先体刺状突起、N：核、CM：細胞膜、CY：細胞質遺残物、NM：核膜、

P：近位中心子、D：遠位中心子、M：ミトコンドリア、A：終輪、AS：無定型鞘

奇形精子：ニワトリの奇形精子は 5~15% 程度といわれており、奇形の種類としては頸の部分では 180 度折れ曲がった頸曲がり精子が最も多く、その他として、尾曲がり精子、尾切れ精子、未成熟精子などがある。頸曲がり精子は、低倍率の観察では正常精子と区別がつかないが受精能力を欠いている。



奇形精子

N：正常精子、A：頭部湾曲、B：成熟異常、

C：形成異常

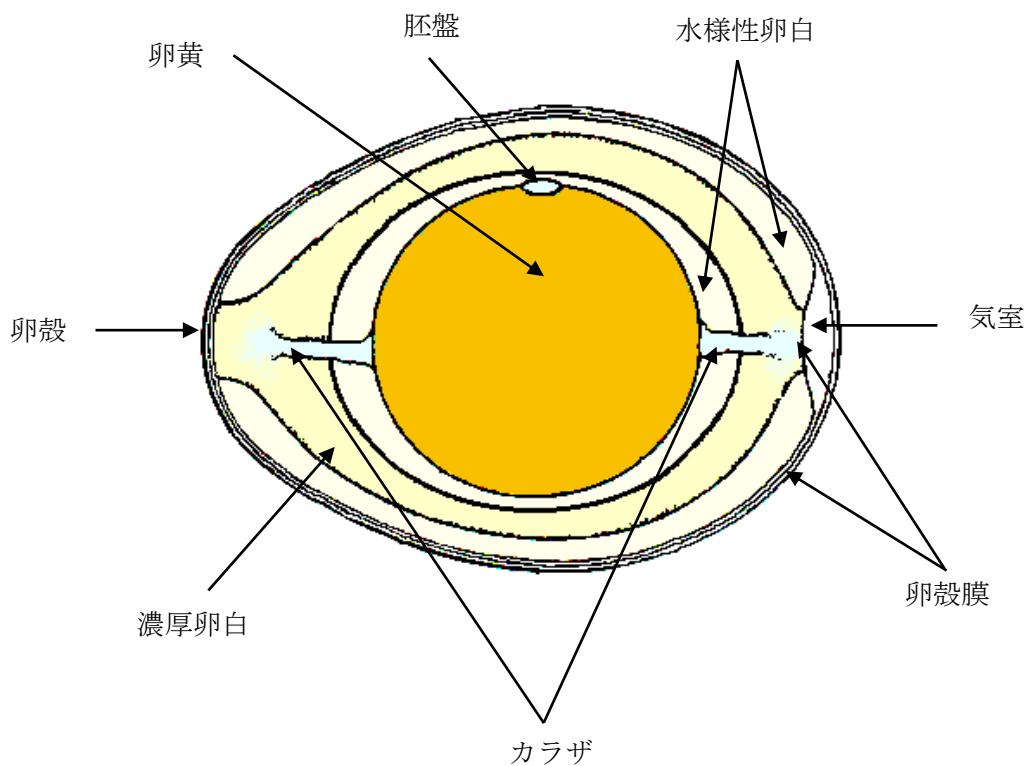
(養鶏マニュアル、養賢堂、1966. より)

精子の運動性は温度によって大きく影響される。鶏精子は 5°C 以下の低温ではほとんど運動を停止し、20~35°C で活発な運動を行う。

しかし、体温付近の 40~41°C になると運動は停止する。この高温時の運動停止は可逆的で、温度を下げる再び活発になる。ただし、高温時の運動停止状態に数時間おくと精子は死滅する。

このほか、希釈液の pH、浸透圧、気相、無機イオンなども、精子の代謝や運動性に対して影響をおよぼしている。

ニワトリでも哺乳類と同様に体外受精が行えます。ただし、有効な使い方はまだありません。哺乳類では受精能獲得や多精子進入の問題がありますが、ニワトリでは採精された時点で受精能が獲得されており、多精子進入が通常の受精なので、これらの問題はありません。卵子は放卵後の卵では受精しませんが、卵管子宮部に入ったばかりであればまだ受精可能です。腹部圧迫法と呼ばれる方法で、卵殻形成が出来ていない卵を取り出し、濃厚卵白を除去して、精液の入った BPSE に卵黄を浮かせてしばらく保温すると受精が完了します。濃厚卵白を除去してしまうため、体外培養法は利用できないので腹腔内に開腹手術で戻し雌鶏に卵として産ませます。雌鶏の左腹を切開し卵管部が見えるようにして受精した卵黄を入れると卵管漏斗部に吸い込まれるように入っていきます。この時、開腹場所に蒸気を当て続けながら行うのがポイントで、乾燥すると卵黄は吸い込まれなくなります。



卵の断面図

3. 雌の生殖器官

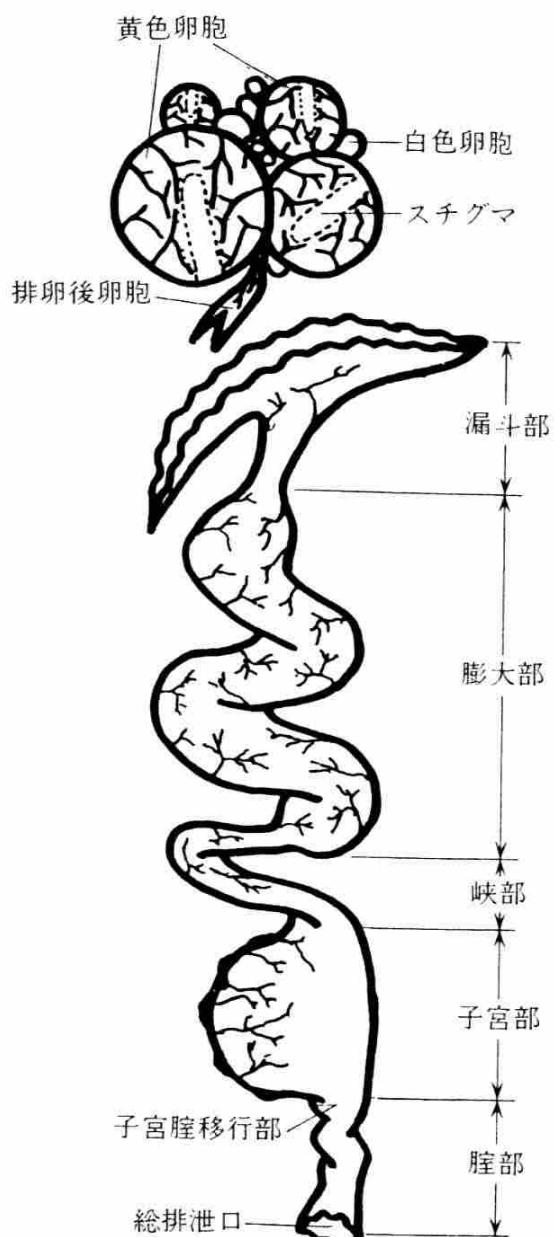
鳥類ではタカ類を除いて、卵巣と卵管は左側だけにある。発生の途中までは左右平等に発達するが、ふ化期が近づくと右側の発育は止まり、左側だけが発達する。

(1) 卵巣

形態：産卵鶏の卵巣には、直径 6~35mm 程度までの種々の大きさをした数個の黄色卵胞、直径 6mm 以下の多数の白色卵胞および 2~4 個の排卵後卵胞が存在し、卵巣の重量は 40~60g 程度である。

卵胞の成長：直径 1~2mm の小卵胞は蛋白含量の比較的高い白色卵黄をごく少量ずつ集積し、直径 6mm 程度の大きさになるまで成長する。排卵の時期が近づくと白色卵胞は急速に成長を始め、白色卵黄の周囲に同心円的に黄色卵黄を蓄積し直径 30~35mm にまで達する。急速成長の開始から排卵までの日数は 7~12 日で、8~9 日が最も多い。卵黄の前駆物質は肝臓で合成され、血流を通って卵胞へ運ばれ卵黄成分として蓄積する。

排卵：卵胞壁には血管がきわめて豊富に分布するが、一部帶状に血管分布を欠いている部分がある。この部位はスチグマと呼ばれ、排卵時にはここが破裂して卵が排出される。家畜の卵胞と異なり、家禽の卵胞には卵胞腔は存在せず、また黄体も形成されない。

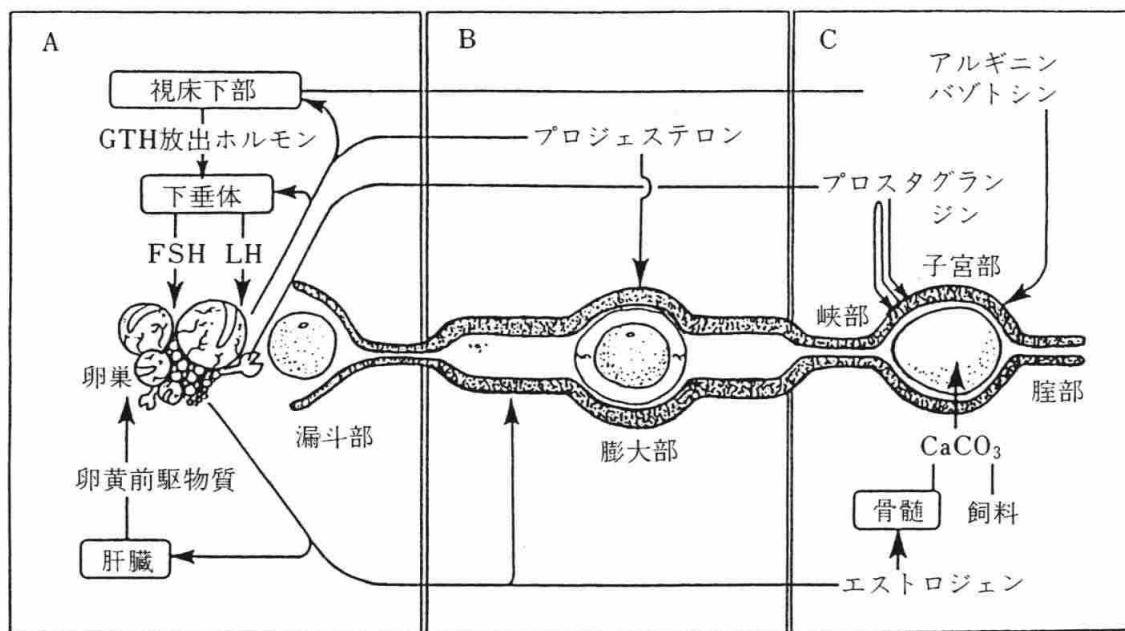


ニワトリの雌性生殖器の構造

(家畜繁殖、朝倉書店、1994. より)

(2) 卵管

卵管は、漏斗部、膨大部、峡部、子宮部および臍部からなる。受精は漏斗部で行われ、膨大部では卵白形成が、峡部では卵殻膜の形成が、子宮部では卵殻形成が行われる。卵が子宮部に移行後各種イオンを含んだ液 (plumping fluid) が分泌され卵殻膜を通して吸収され、卵白の容積は約 2 倍となる。



卵の形成と内分泌調節、A:卵胞発育・排卵、B:卵白形成、C:卵殻形成・放卵

(家畜繁殖、朝倉書店、1994. より)

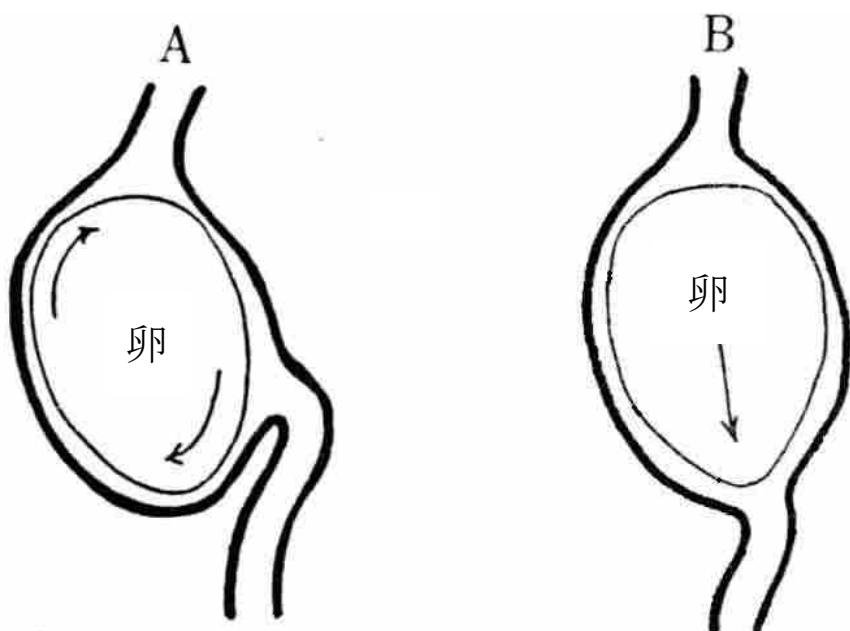
ニワトリの卵管各部における卵の滞留時間

卵管の部位	卵の滞留時間
漏斗部	約 15 分
膨大部	約 3 時間
峡部	約 1.5 時間
子宮部	約 20 時間
臍部	数分
合計	24~27 時間

(家畜繁殖、朝倉書店、1994. より)

脇道コラム 卵は鋭端と鈍端のどちらから産まれてくるか

卵は、鋭端と鈍端のどちらから生まれてくるかですが、観察している限りでは普通の卵はほとんど鈍端から産まれており、二黄卵だけは鋭端から産まれている様です。卵形成の時には鋭端が排泄腔側を向いていますが、Aの状態の時は、クルッと回転して鈍端から産まれてくるのだそうです。二黄卵は、ほとんど鋭端から生まれてきますが、大きすぎて回転できないためと思われます。教科書を見ると70~80%が鋭端から生まれてくるとしていますが、観察した結果ではこれとは異なりました。日齢によっても異なるのかもしれません。野鳥などは鋭端から産まれてくるそうで、毎日の産卵によって卵管子宮部の形が変形してしまうためかもしれません。



放卵時の卵の回転

卵が卵管子宮部内でAの状態で入っている時に、卵管臍部に移行する時に回転して鈍端から産み落とされる。Bの状態では鋭端から産まれる。

(養鶏マニュアル、養賢堂、1966. より)

4. 受精と分割

(1) 精子の移動と貯留

卵管に入った精子は、精子自身の鞭毛運動で卵管腔部を上昇し、子宮腔移行部の精子貯留腺に達し、一部は貯留され一部は卵管を上昇して漏斗部に達する。卵が放卵されると貯留腺から一部の精子が放出し、産卵直後におこる卵管の逆蠕動運動によって10分程度で卵管漏斗部にあるもう一つの貯留腺へ運ばれる。この精子は、排卵直後に放出されて、卵胞から排卵後10~15分で受精する。受精に関与しなかった健常な精子は再び精子貯留腺に蓄えられる。

鳥類は1回の交尾や人工授精で長期間にわたって受精卵を産む。その期間は、ニワトリで2~3週間、ウズラやアヒルで10日前後、シチメンチョウでは50日間におよぶ。ただし、期間の経過に従い受精率は低下する。

雌の卵管（精子貯留腺）内における受精能力保持期間

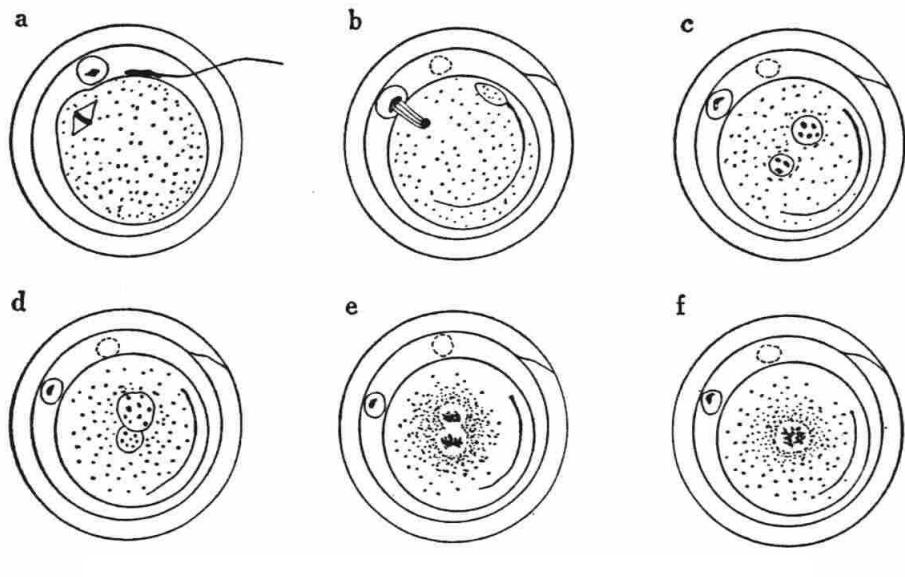
種類	受精能力保持期間（日）
ニワトリ	10~14
シチメンチョウ	46~52
ウズラ	8
キジ	22
アヒル	7~10
ガチョウ	10
ハト	8

（家禽学、朝倉書店、2000. より）

(2) 受精

受精は、排卵直後の卵子を取り囲んでいる卵黄膜内層と精子が結合することから始まる。精子は卵黄膜内層に接近到達した時に、精子頭部のアクロソームからアクロシンと呼ばれるトリプシン様のタンパク質分解酵素が放出されて卵黄膜内層に直径0.02mm前後の穴が開けられる。精子はこの穴を通り抜け、卵原形質膜に達し精子の先端部分が融合し、原形質膜を欠いた精子が頭部から尾部まで卵子内に入る。卵子に入った精子の頭部は雄性前核へと変化していくが、尾部はこの間に分解消失する。一方、卵子では精子が進入すると第2成熟分裂が開始され第2極体を放出し、雌性前核の形成が行われる。受精は精子に由来する雄性前核と卵子に由来する雌性前核の融合

合体により完了する。鳥類の場合、卵子内に複数の精子が進入する多精子進入が通常行われており、ニワトリでは通常3～5個の精子が進入する。この時、受精に関与するのは1つの精子のみで、他の精子は胚盤の周辺へ移動し消失する。多精子進入は、正常発生に関与しており少ない場合や異常に多い場合は胚の初期の死亡率を高める。



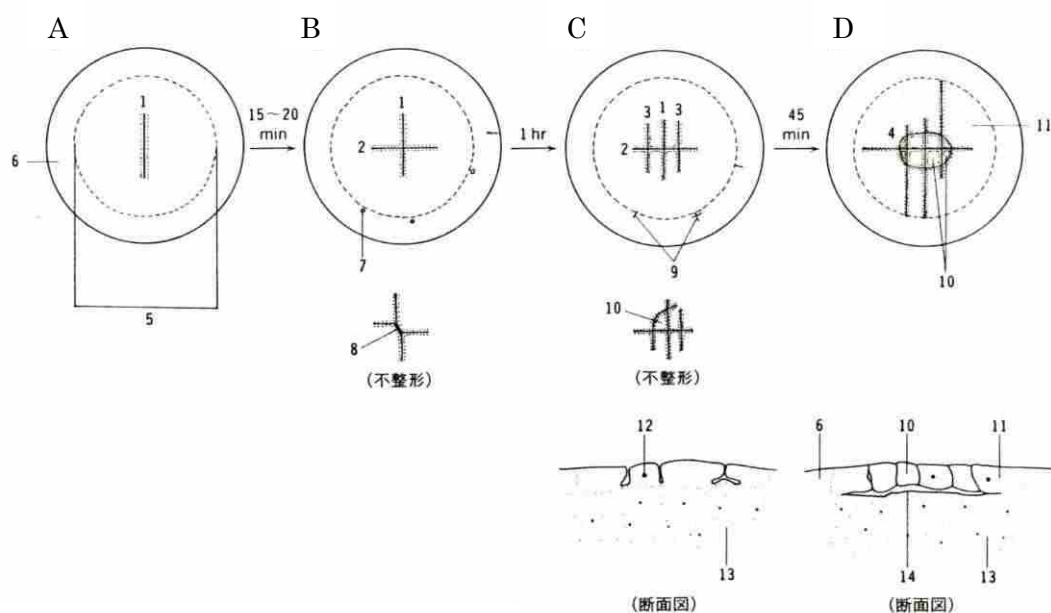
受精過程

a: 卵細胞質内への精子の侵入と第二成熟分裂の再開, b: 精子頭の膨大と第二極体の放出, c: 雌雄の前核の形成, d: 前核の成長と中央への移動, e: 染色体の出現, f: 核の合体(第一卵割前期)

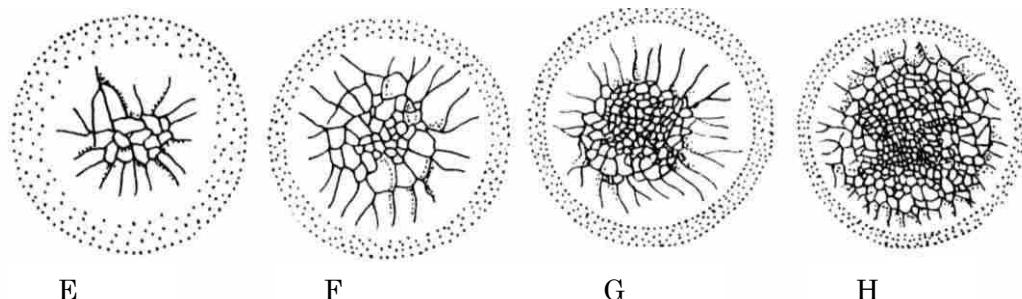
(新家畜繁殖学、朝倉書店、1988. より)

(3) 受精卵の分割

一般に総排泄腔から卵が放卵されてから15分後に排卵が起こり、卵管に取り込まれた卵子は10～15分で受精する。鶏の卵割型は盤割であり胚盤部分でのみ細胞の分割が進む。最初の分割は、排卵後4時間30分頃の卵が卵管狭窄部に滞留している時に起こり、卵管狭窄部で4～8細胞期に達する。卵管子宮部に移行後は、4時間以内に256細胞期まで発生が進む。卵子は75分に1回の割合で放卵までに16回の分割が行われ、放卵されるときには細胞数約6万の胚盤葉期(ステージX)と呼ばれるステージに達している。ステージX胚盤葉はその形態から内側の明域と外側の暗域に分けられドーナツ状となっており、明域はさらに中心部と周辺部に分けられる。



a. 第一卵割, b. 第二卵割, c. 第三卵割, d. 第四卵割.
 1: 第一卵割溝, 2: 第二卵割溝, 3: 第三卵割溝, 4: 第四卵割溝, 5: 胚盤の領域, 6: 周縁質, 7: 副精子核, 8: 交さ溝, 9: 副卵割, 10: 中心細胞, 11: 周縁細胞, 12: 核, 13: 卵黄, 14: 胚下腔,



胚の初期発生

(脊椎動物の発生 (上) 培風館、1989. と 最新家畜家禽繁殖学、養賢堂、1982. より)



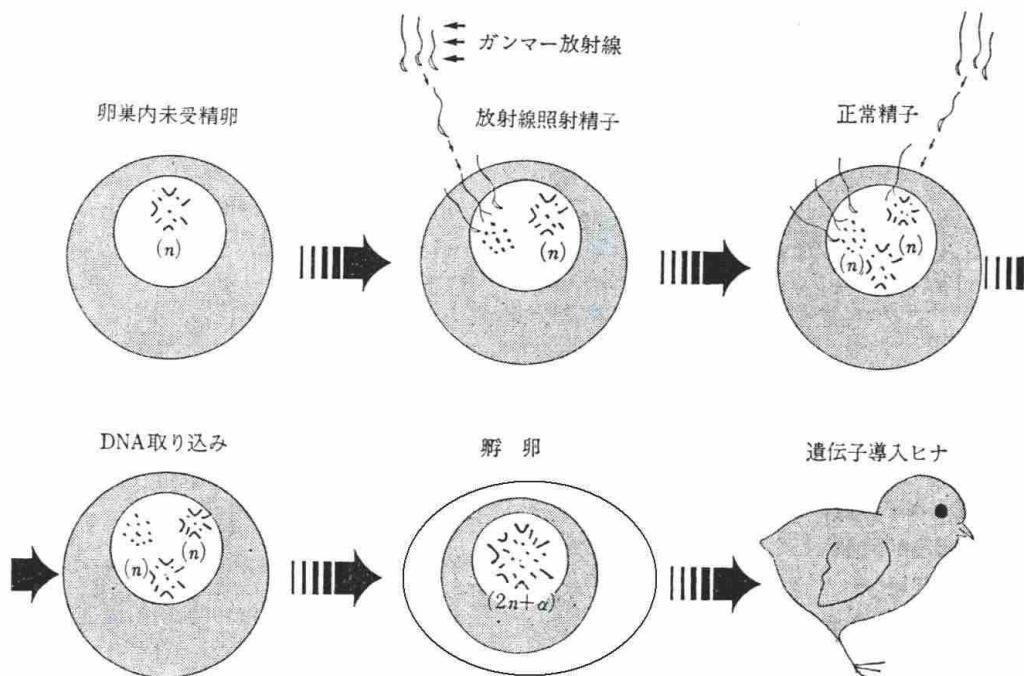
放卵直後の受精卵



無精卵

脇道コラム 偽受精

遺伝子導入の一手法として行われたもので、精液に一定量の γ 線を照射すると精子は動いていて卵子内に入りはしますが雌性前核の融合合体は出来ないものとなり、このような精子の受精を偽受精と呼んでいます。白色レグホーン(WL)の雌に、 γ 線を75kr照射した褐色卵のSykes種の精液を人工授精し、翌日、WLの正常精子を授精することで、褐色卵を産むWLが発生した例があります。遺伝子導入率は3.5%のことでしたが、その後別の研究者が追試を行い血液型でも導入が確認されています。導入率は研究者や調査した形質によっても異なり0.05~3.8%となっています。ただしこの方法は、特定の遺伝子のみを導入することが出来ないことから研究は進んでいません。しかしこのことから、多精子進入して雌性前核の融合出来なかった精子は全て消失するのではなくて、一部の遺伝子では組み替えが起きていることになります。本当にそうだとすると、2品種の混合精液の受精でも遺伝子導入鶏が出来てしまうことになりますが…。



γ 線照射精子の偽受精を利用した遺伝子導入

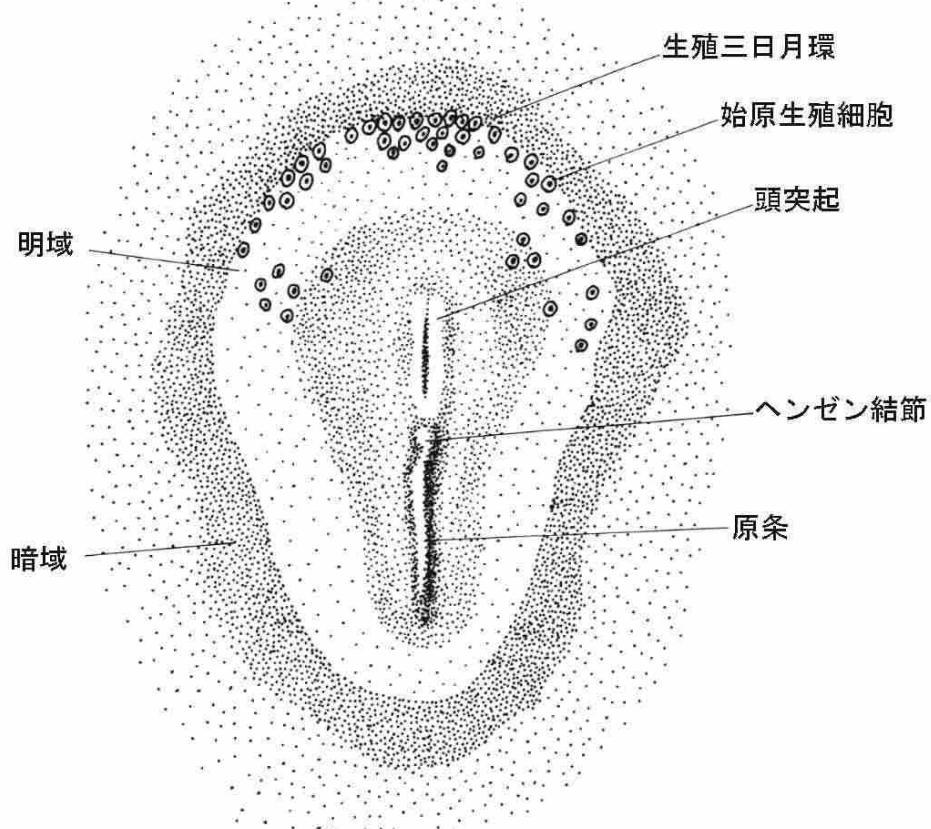
(畜産の研究. 1988. 第42巻. 第1号. より)

5. 性分化

(1) 生殖細胞の分化

多くの動物種の生殖細胞は、*Vasa* 遺伝子と呼ばれる遺伝子が、発生の全期間にわたって発現している特徴を持っている。ニワトリでは、まず最初に卵巣での卵母細胞に *Vasa* 陽性構造体が現れ、これを取り込んだ細胞のみが生殖系列細胞に分化する。

ステージXでの *Vasa* 陽性細胞は、主として明域中心部の胚盤葉上層の下側に約30個存在し、この頃に始原生殖細胞に分化するものと考えられている。始原生殖細胞はその後、胚盤葉の上層から下層に移動し、次に胚の頭部が後に形成される方に押し出され、ふ卵18時間のステージ4あたりでは明域と暗域の境界の生殖三日月環と呼ばれる部域の胚盤葉下層に認められる。この時期以降の始原生殖細胞は、PAS染色で染色される特徴を持つようになる。ふ卵2日目になり血管系が発達すると、始原生殖細胞は血管の中に入って血流中を循環する様になり（ステージ14前後）、ふ卵3日目のステージ18頃までに未分化生殖巣である生殖巣原基に到達する。生殖巣原基は、その後胚発生に伴い精巣あるいは卵巣に分化する。



始原生殖細胞が集まっている場所が、三日月状なの生殖三日月環と呼ばれる
(発生のプログラム、裳華房、1986. より)

始原生殖細胞は、精巣中ではふ卵 13 日目頃より増殖が活発になって精原細胞となりふ卵 20 日目までに精細管の中で整列する様になる。その後はふ化後 10 週頃より細胞分裂を再開して、精細管の中で幹細胞として分裂しながら第 1 精母細胞を作り出す。第 1 精母細胞は、その後第 2 精母細胞（精娘細胞）、精子細胞、精子へと分化していく。一方、卵巣に入った始原生殖細胞はふ卵 8 日目以降卵原細胞となり、さらに第 1 卵母細胞となる過程で活発に増殖し、ふ卵 16 日目までに第 1 減数分裂の前期に入る。そして、ふ卵 17 日頃に細胞数がピークに達した後急激にその数を減少させ、第 1 減数分裂の前期で休止する。ふ化後、個体が成熟して卵胞発育が開始されると、卵母細胞の分化が再開され、第 1 卵母細胞は第 2 卵母細胞（卵娘細胞）そして卵子へと分化する。

（2）性決定と性分化

鳥類の性染色体は雄が ZZ、雌が ZW で、哺乳類とは逆の雌ヘテロ型である。この遺伝的な性に基づき生殖巣原基が精巣に分化するか卵巣に分化するかが決定される。性染色体が XY 型の哺乳類では、Y 染色体上に存在する *Sry* 遺伝子が雄性決定遺伝子と認められているが、鳥類では確認されていない。それに変わる遺伝子として、雄性化に働く遺伝子として Z 染色体上に *Dmrt1* 遺伝子が存在し、雌性化に働く遺伝子として W 染色体上の *Wpkei* 遺伝子が存在することが明らかになり、これらの両遺伝子の相互作用によって性が決定されていると考えられている。生殖巣原基は、ふ卵の 5~7 日目より精巣あるいは卵巣への分化が開始される。ニワトリではこの時期に雌においてアロマターゼ遺伝子（*P450 arom*）の発現が始まり、テストステロンからエストラジオール 17β の合成が行われ、生殖巣原基は卵巣へと分化する。雄ではこの時期にアロマターゼ遺伝子の発現は認められず、雄特異的に働く *Sox9* 遺伝子の発現が認められ、生殖巣原基は精巣への分化が促進される。その後、雌個体の性分化は卵巣から分泌されるエストロジエンにより、雄個体は精巣から分泌されるアンドロジエンとミュラーラ管抑制ホルモンにより性分化が進行する。ニワトリではふ卵初期には左右の生殖巣原基が発達するが、性分化が開始されると、雄では左右の生殖巣原基が精巣へと発達するのに対して、雌では左側のみが発達して卵巣となり、右側は退化生殖巣となってふ化後しばらくして消失してしまう。雌の右側の卵巣が退化してしまうのはこの部位においてエストロジエンレセプターの発現が見られないことが原因の 1 つと考えられている。アロマターゼインヒビター（阻害剤）をふ卵初期に投与することによって遺伝的に雌の生殖巣が卵巣へ分化することなく精巣へ分化し、雄に性転換させることが出来る。ただし、成長ホルモンに関する遺伝子は変わらないため、性転換した ZW の雄の体重は雌の体重と変わらない。

脇道コラム 性決定あれこれ

性染色体は、鳥類では雌ヘテロのZW型、哺乳類では雄ヘテロのXY型で、WやY染色体はZやX染色体よりも小さく性染色体が明確に区別できます。爬虫類のヘビの仲間ではZW型ですが、下等とされるオオヘビ科ではZとWの見分けが付かず、ヘビ科になると大きさは同じですが動原体の位置が異なり区別することが出来ます。ガラガラヘビなどのクサリヘビ科になるとW染色体が小さくなっています。

ヘビを除く爬虫類では、性染色体の区別が付かないだけでなく、ふ化するまでの温度で性が決定します。これを温度依存性決定機構（Temperature-dependent Sex Determination, TSD）といいます。温度依存的性決定機構とか温度依存性性決定機構とも言われています。例えば、ある種のカメでは29°C以下でふ化したものは全て雄になり、31°C以上では全て雌に、中間温度では雄と雌がふ化します。ワニの場合はカメとは逆で34°C以上では全て雄が、30°C以下では全て雌になります。種によって温度は異なりますがこの他に、低温と高温では雌で中間で雄、この逆パターンもあり計4タイプあります。鳥類では、この温度依存性決定機構はありません。

両生類の場合は、性染色体は区別できませんが、鳥類や哺乳類と同じ機構で性が決定されます。ただし両生類は種によってZW型とXY型のものがあります。一部の両生類では、爬虫類のように温度によって性が変わるものもいます。また、性ホルモンによって性転換させることも可能で、性転換させたZW雄と通常のZW雌の交配で子供がZZ、ZW、WWの3種類が発生します。W染色体にもZ染色体の遺伝子があるため、WWも正常な雌として発生します。正常なZZの雄とWW雌の子供は、全てZWの雌が生まれてきます。同じことが鳥類でも出来ればいいのですが、鳥類でWWの個体は全て死んでしまいます。

魚類も基本的に両生類と同じですが、種によっては社会的順位で性が決定するものがあります。ソメワケベラでは1匹の雄が数匹の雌を従えた群れを作っていますが、雄が死ぬと雌の中で1番の社会的順位の高いものが雄に性転換します。この逆の場合もあり、社会的順位1位が雌で、2位が雄、3位以下は繁殖能力が無いような種もあります。また、変わったものとしては、日本のギンブナは単為生殖を行うことが知られています。何と日本のギンブナは、ごく一部の地域を除いて全て雌です。ギンブナはフェロモンを出すことで、ヘラブナ・コイ・ドジョウなどを呼び寄せ、産卵した卵に精子をかけさせます。その卵は、精子が進入した刺激で細胞分裂を始めてしまい、精子は受精できずに消滅し、生まれるギンブナは全て親のクローンとなります。

II. 人工授精と自然交配

1. 人工授精

(1) 精液採取

保定方法としては脇に抱える方法、胴体を足に挟む方法、ニワトリの足を自分の足で挟む方法があり、精液採取では、それぞれ絞る側と受け取る側に分かれて2人で採取する方法と、1人で採取する方法がある。基本的にはどれも同じなのでどれか一つの方法が出来れば良い。マッサージも背部マッサージ法と腹部マッサージ法の2種類があり、併せて行うこともある。鶏によっては、マッサージの必要が無い個体もあるため必要に応じて行い、あまり長い時間マッサージしない。雄1羽について1回の採精で採取できる量は、通常0.1～0.5mlで品種や個体によっても異なり0.5ml以上出す個体もいる。腹部を軽く圧迫すると出しやすいが、糞尿も入りやすくなるので、個体によって加減する。また、量を多く取ろうとすると透明液が多く入り薄くなることや、血液が入ったりするので注意する。

採取方法は、雄の頭部をやや下にして保定し、総排泄腔が良く見える状態にする。次に、総排泄腔の両側を親指と人差し指で圧迫しながらつまんで退化交尾器を露出させしぼり出す。このとき、総排泄腔のすぐ上を別の指で軽く圧迫すると良く採取できる。採取器具は、試験管に直接とってもかまわないが、糞尿の混入を防ぐため、10ml程度の小さなプラスチックカップに一旦受けてからピペットやスポットなどで試験管に移した方が良い。糞尿や血液が多く混入すると受精率が下がることがあるので、できるだけ混入させないよう注意する。試験管に直接受ける場合で糞尿が入った場合は、翼の羽を使って除くことがよく行われている。

家禽精液の精液量と精子数

種類	精液量 (ml)	精子数 ($\times 10^9/ml$)
ニワトリ	0.325	3.68
アヒル	0.390	9.46
シチメンチョウ	0.300	7.43
ウズラ	0.012	4.26
ホロホロチョウ	0.018	4.14
ハト	0.004	7.36

【採精手順】岡崎牧場で行っている方法



① 左手に軍手をはめて、素速く雄の足を後からつかむ。次に右手を入れて鶏の両足を両手で掴む。



② 鶏を横向にしてケージから出す。



③ 右手で鶏の足をつかみ、背部をマッサージする。(マッサージだけで出してしまう個体もいるので注意する。)



④ 右手で足をつかみ、鶏を後ろ向きにし、尾羽を脇の下に引っかける様に総排泄腔を前に出す。



⑤ 足を左手に持ち替え、脇を軽くしめる。



⑥ 右手で総排泄腔の両脇を軽く押しながらつまみ精液を搾る。



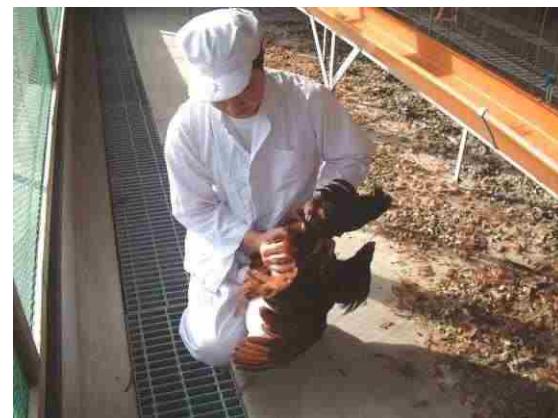
⑦ 通常は搾り手と受け手の二人一組で行う。



⑧ 10mlのプラスチックカップで精液を受けているところ。



⑨ 熟練すると、一人でカップを持ち一人で採精が出来る。写真はカップを薬指で持ち中指と親指で絞っている。



⑩ 別の方法。鶏を横向にして足を挟んで採精する方法。マッサージは、背部と腹部の両方できる。



⑪ この方法の場合、左手で鶏の背中側から総排泄腔の脇をつかめるので、右手が空き一人で採精することも容易。



⑫ 総排泄腔を反転させているところ。

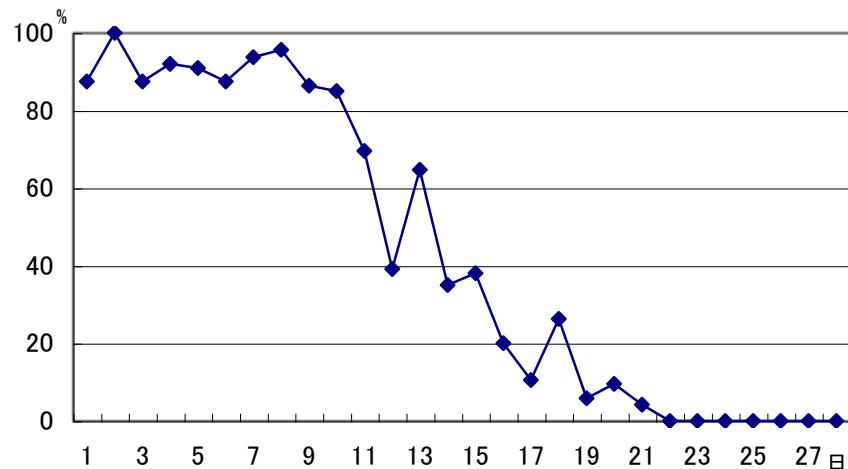
(2) 精液注入

採取した原精液 0.1ml 中には、約 3~5 億の精子がある。原精液であれば雌 1 羽当たり 0.01ml 以上であれば 9 割程度の受精率は期待できる。ただし、通常の授精では雄個体によって生存精子数が少ない場合や活力が悪い場合があるため、原精液の場合では 0.02~0.03ml、希釀精液の場合は 3~4 倍希釀で 0.05~0.1ml と多めに注入した方が無難である。

注入方法は、まずケージを開け雌の両足をつかみ半身引き出す。尾羽はケージの内側に引っかけて鶏の左側を斜め上に保定する。雌の両腿を挟むようにして腹部を軽く圧迫し、総排泄腔の左部分を圧迫すると卵管が露出する。腹部を圧迫しすぎると総排泄腔全部が露出して卵管に注入しにくくなり逆流もおこすので注意する。

注入器具は、原精液を用いる場合と希釀精液を注入する場合で異なる。原精液の場合は、先端を丸くしたパストールピペットの様なものや、特殊な分注器が用いられる。希釀精液の場合は、1ml のツベルクリン用シリンジなどが使われる。希釀液は、レーク液やベルツビル液が良い。リングル液やタイロード液、PBS などは多量の塩素イオンを含んでおり、鶏の精子に有害に働くため良くない。

注入は、出来るだけ午後 2 時過ぎに行うことが好ましく、注入時刻が早いと卵管底部に卵が存在して受精率が低下する。



ニワトリの 1 回の人工授精で得られた受精率の推移
(人工授精の 2 日後を 1 日目とした)

精液希釈液の組成表

g/100ml DW

	ベルツビル家禽精液希釈液 (BPSE)	レーク液 液状精液用
グルタミン酸 Na・H ₂ O	0.867	1.92
グルコース		0.6
フルクトース	0.5	
酢酸 Na・無水		0.51
酢酸 Na・3 H ₂ O	0.43	
酢酸 Mg・4 H ₂ O		0.08
塩化 Mg・6 H ₂ O	0.034	
クエン酸三 K・H ₂ O	0.064	0.128
リン酸水素二 K・3 H ₂ O	1.27	
リン酸二水素 K・無水	0.035	
TES ^{注)}	0.195	
pH	7.5	7.2
浸透圧	333	360

注) TES (テス) : N-トリス (ヒドロキシメチル) メチル-2-アミノエタンスルホン酸

BPSE 作製に当たっての注意点

リン酸と Mg を混合すると沈殿があるので、塩化 Mg とクエン酸三 K の混合溶液を別に作製しておき、他の試薬の溶解液と最後に混ぜる。

硫酸ゲンタマイシンを1mg/100ml DW 添加すると、精子のためにも希釈液の保存のためにも良い。

一度に多くの量を作製して長く使用する場合は、2倍の濃度で希釈液を作製しておき、使用する時に必要量だけを取り出して蒸留水で2倍に希釈する。

【採精準備】



① 混合精液の場合の準備。PPチューブに希釀液を入れ、プラスチックカップとツベルクリン注射器をセットする。



② 希釀液を分注器（連續注射器）を用いて分注する。



③ 個体精液の場合の準備。カップも個体数必要。

注入器はディスポのツベルクリン注射器

試験管はPPチューブ（ $\phi 12 \times 75\text{mm}$ ）

試験管立てには、フリージングコンテナの本体Bに、中仕切No. 08を用いている。

(TGKの科学機器総合カタログ参照)

試験管立ての上部にはラベリングテープ（KGE）を貼り、雄の人工授精番号を記入する。

試験管立ての側面にはテープを貼り、交配させる雌ケージ番号を記入しておく。

【精液の注入】



① 左手で鶏の足をつかみ、尾羽をケージに引っかける。右手に持っているのは、ツベルクリン注射器に希釀精液を入れたもの。



② 右手の小指で軽く足を持ち替え、左手で両腿を腹側からつかみ直す。



③ 左手で両腿を掴み、親指で左の腿の付け根部分を押すと卵管だけが露出する。



④ ツベルクリン注射器の先を1~2cm程度入れた所で両腿の圧迫をゆるめ指元で注入する。



⑤ 二人で行う場合。一人が右手で足を持ち、左手で両腿をつかむ。左手人差し指で左の腿の付け根部分を押す。片手で反転しない時でも両手を使った場合に反転する場合がある。



⑥ もう一人の注入者によって精液を注入しているところ。

(3) 種卵採取

排卵は放卵後約30分から1時間後におこるので、人工授精を行っている時は、すでに卵管に翌日放卵される卵が形成されている。このため種卵(受精卵)は精子注入の翌々日から採取できることになる。人工授精の際に、卵管腔部に卵があると精子の上昇が妨げられ受精率は低下する。このため、人工授精の時間帯はほとんどの雌が放卵を終えた午後に行う。精子は卵管内の精子貯留腺内に2週間程度までは生きていられる。しかしながら、高い受精率を得るには週に1~2回の人工授精が必要である。

(4) 精液の液状保存

ニワトリ精液は原精液の場合2~3時間で受精率は極端に低下するため、採精から人工授精までを30分~1時間以内に完了させる必要がある。採精後すぐに希釈すれば精子の寿命は延長し、希釈液にもよるがベルツビル家禽精液希釈液(BPSE)の場合3倍希釈にして低い温度で保てば、2~3時間たっても受精率は低下しない。なお、30~37.5°Cと精液を暖めると精子は活発に運動したのち死亡するので逆効果となる。また、BPSEで3倍希釈した精液は、5°C保存であれば1~2日間の保存が可能である。ただし、この場合の注入は凍結精液の注入で行われる腔深部注入を行い、注入量は雌1羽に対して0.1mlを行う。保存中の細菌増殖を抑えるためにBPSEには、硫酸ゲンタマイシンを1mg/100ml添加して用いる。採精も凍結精液の場合のように透明液をあまり入れないように採取する。輸送する場合は、5°Cの宅配便で行えるが、この場合の注入は採精希釈した日の翌日が良い。

脇道コラム 雄の毛刈り

採精をするのに、総排泄腔周囲の羽根の一部が邪魔になるので、これを取り除くことを毛刈りと呼んでいます。いちばん簡単で良い方法は、総排泄腔の周りの細い羽を指で抜き取る方法で、こうすることによって、総排泄腔が見やすく精液が受けやすくなります。また、総排泄腔の周囲に糞も付かなくなるなどの効果もあります。ハサミで刈り取る方法もありますが、広い範囲を切りすぎて、羽が手にチクチク当たり、長くなると羽の軸が余計に邪魔になるので良くありません。一人で採精する場合は、蓑毛が邪魔になるのでこれは人によってハサミで切り込む場合もありますが手でどかすだけでも十分です。採精する直前に羽根を抜くと、精液が出なくなるので本番前に行っておく必要があります。

2. 精子検査法

ニワトリの場合、精子活力と受精率の相関が高くないこともあり、1羽1羽を検査することはほとんど無い。検査する場合として、特に受精率が低い鶏群があった場合の検査や、凍結精液や液状精液の保存などの試験で行われる。

検査はまず、精子性状検査板に白金耳で一滴たらしてカバーガラスをかぶせて 30°C に加温して検査する。なお、鶏精子は 37°C まで加温すると運動が停止してしまうため温度には注意する必要がある。



精子性状検査板



精子性状検査板 (2連式)

(1) 精子活力検査

(ア) 精子生存指数

精子生存指数は精子の生存を表す指標として、国内では一般的に用いられている方法である。まず5段階に活力を分け、活力ごとの重み付けに精子割合をかけて総和を100で割って算出する。

精子活力の分け方は、

+++	非常に活発な前進運動	(100)
++	活発な前進運動	(75)
+	緩慢な前進運動	(50)
±	旋回または振子運動	(25)
-	全く運動をしない	(0)

で、() 内は重み付けの数値。+++の精子が 60% 生存し、++の精子が 20% 生存していた場合は、 $(60 \times 100 + 20 \times 75) / 100 = 75$ で生存指数は 75 となる。指数にしない場合は生存率を記号の左に書き、単に 60+++、20++と表現をする。これを更に省略して、80+++～++といった書き方をする場合もある。

（イ）5段階評価法

アメリカなどでは5段階が一般的で、1（30%以下の生存率で前進運動無し）、2（30～50%の精子が弱い前進運動）、3（50～70%の精子が活発な運動と緩慢な前進運動）、4（70～80%の精子が活発な前進運動と旋風運動）、5（80%以上の精子が非常に活発な前進運動と強い旋風運動）とする。凍結精液の試験などでは、融解後の精子生存率が低くても活発に運動して見える場合もあるので、この評価法は上手く当てはまらない。

（2）精子数の測定

（ア）血球計算盤での算出

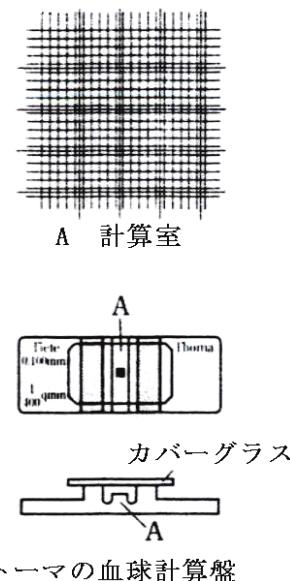
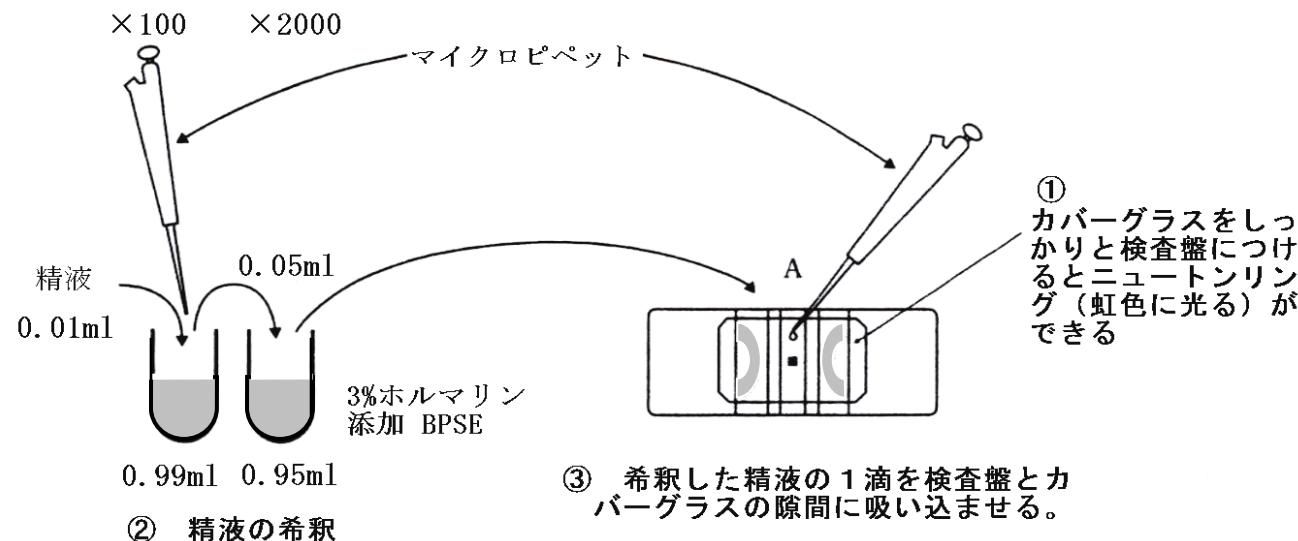
通常の原精液であれば2000倍に希釈する。メランジュールを用いるよりも小試験管を用いて2～3回に分けて希釈する方が誤差が少なく行いやすい。原精液が特に薄い場合は、1000倍に希釈する。希釈液は、奇形率を調査しないのであれば生理食塩水でも良いが、奇形率を調査するのであれば3%ホルマリン入りの精液希釈液で希釈する。

計算盤は、縦横高さが $1\times1\times0.1\text{mm}$ なので、全区画の精子数の10000倍が 1cm^3 の精子数となる。計算盤は 0.1mm の深さがあるので、精子の位置によりピントがずれる。このため、上下にピントを動かしながら全ての位置の精子数をカウントする必要がある。



トーマの血球計算盤

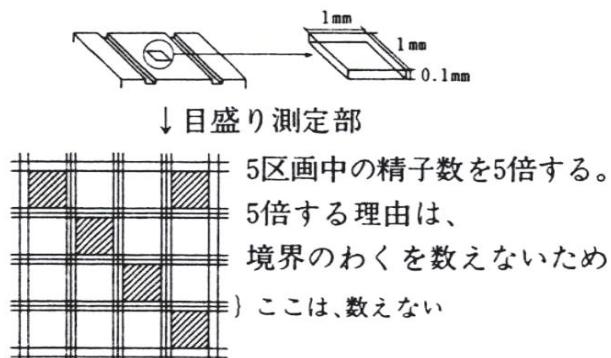
精子数の測定手順



単位表と原理

(単位表)	ℓ	$\text{m}\ell(\text{cc})$	$\mu\ell$
ℓ	1	1000	1000000
$\text{m}\ell(\text{cc})$	0.001	1	1000
$\mu\ell(\text{マイクロリットル})$	0.000001	0.001	1

$$1\text{cc} = 1\text{cm}^3 = 1\text{m}\ell = 1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 1\text{cm} \\ = 10\text{mm} \times 10\text{mm} \times 10\text{mm} = 1000\text{mm}^3$$



(イ) 分光光度計での算出

1000～2000 倍に希釈した精液を、分光光度計のセルに移し吸光度を測定し、あらかじめ計算してある換算表と対比して精子数を求める。

換算表は、精液の希釈倍率を 1000 倍、1500 倍、2000 倍としたサンプル各 20 個程度について、分光光度計による吸光度と血球計算盤での計測から回帰式を求めて作成する。品種系統によっても異なるので、各系統で作成しておく必要がある。



(株) アペレの分光光度計 PHOTOMECH-301

波長を 920nm にセットする。円筒型のセル（外径 12φ、内径 10φ の小試験管）に精液を 1.5ml 分注して測定する。

(3) 奇形精子率

トーマの血球計算盤で奇形精子数をカウントして算出する。鶏精子で最も多い奇形は、頸曲がり精子と呼ばれるもので精子の頸部で折れ曲がっており、正常精子と変わらない運動を示すが受精能力はない。塩素イオン (Cl^-) が多いと頸曲がり精子が増加するので、食塩水による希釈は行わず、BPSE や Lake 液などの精液希釈液にホルマリンを 3% 程度加えて検査する。その他の奇形としては、尾曲がり、尾切れ、未成熟精子などがある。

脇道コラム 雄の強制換羽

産卵が低下した雌鶏を再び高い産卵率に戻すための方法として、雌鶏においては絶食絶水による強制換羽が行われます。雄鶏で、この絶食による強制換羽を実施すると精巣が萎縮してしまい精液が出なくなり、再び精液を出すようになるまでには3~6ヶ月かかります。中には6ヶ月以上経過しても造精機能は回復されないものもいるため、雄鶏での強制換羽は行ってはいけません。自然換羽の場合は精巣の萎縮は見られないのでも問題ありません。

脇道コラム 肉斑（ミートスポット）

卵の卵白内にある肉片の様に見える小さいものが肉斑と呼ばれるもので、赤玉鶏に多い特徴があります。以前は、輸卵管の組織の一部が剥離したものに卵管内で分泌されたプロトポルフィリンが沈着したものと言われていましたが、本当のところは解っていません。色素のプロトポルフィリンは卵管子宮部で分泌されるので、卵はすでに卵殻膜が形成されていることから、卵白中の物質に色素が沈着するとなると卵管の膨大部で色素が分泌されていることになります。また、肉斑にはカルシウム成分があるとの話もあることから、卵が腔部に移行した後に、子宮部で分泌されたカルシウムと色素が共に卵管の蠕動運動によって上昇している可能性があります。

肉斑の出現率ですが、赤玉では30%、白玉では1~2%であるとされています。白玉では白い肉斑になるので同じものでも肉斑と判断できていない場合も多いこともあります。ピンク卵では赤玉と同じ色の肉斑となります。青色卵のアローカナでは、白い肉斑となります。

3. 自然交配

(1) 大群交配

雄雌とも複数の鶏を平飼い鶏舎に収容し自然交配させる方法。雄1羽に対し、雌10～13羽の割合で飼育する。通常1室に雌100羽、雄8～10羽を入れる。床面積当たりにすると5～6羽／m²の雌を収容することとなる。ネストの数は、100羽の雌に対して20～25個を設置する。雄と雌の比率は品種系統により異なり、通常、白玉鶏の場合は雌の数を多くし、赤玉鶏の場合は雌の数を白玉鶏より少なくする。

(2) 単雄交配

1羽の雄と複数の雌で自然交配させる方法。雌の数は10～13羽程度が良い。床面積当たりは、3～4羽／m²が良く、トラップネストを6～8個設置する。この方法は、最近ではあまり行われていないが、個体記録を取りながら自然交配で種卵を採取する方法として行われていた。

雌しか飼育していなかった部屋に雄を放つときは、大切に送り出すように放す。摘んでポイとゴミでも捨てるように入れると雌からいじめられる場合があるので注意する。交配経験のない雄を放した場合は、受精率が安定するまでには2～3週間かかるので、2週目の種卵の受精率を調査して、受精率が低い場合は雄の交換を行う。

自然交配していた雄を、ケージに戻して直ちに採精しようとしても精液量が極端に少なくなるので、1週間程度経過してから採精するのが良い。



単雄交配鶏舎

(3) 群飼ケージ交配

通常の自然交配は、平飼いが行われているが、雄と雌をケージで飼育して種卵をとる場合があり、雄の数はケージの大きさによって変える。この場合のケージの構造としては、ケージの高さは90cm程度が良く、低い場合は受精率が低下する。ケージ床は、堅くすると受精率は高くなるが破損卵が増加し、柔らかいと破損卵は減少するが受精率が低下する。ケージの奥行きを90cmとすると、両端と真ん中の3ヶ所にアングルを通して、クッションとしてビニールホースの片側を切ったものをアングルに被せてケージを固定する。卵受けの長さは、最低でも20cmは必要で、浅い場合は卵がケージの端に集中してしまい、卵が鶏に突かれて破損卵が増加する。ケージ床の角度は8度が良く、これは通常の雌ケージと変わらない。角度が大きいと卵の転がる速度が増して破損卵が増加し、角度が小さいと卵受けに転がってこないため、汚卵が増加したり鶏に突かれるため破損卵も増える。



ネスト付きの群飼ケージ

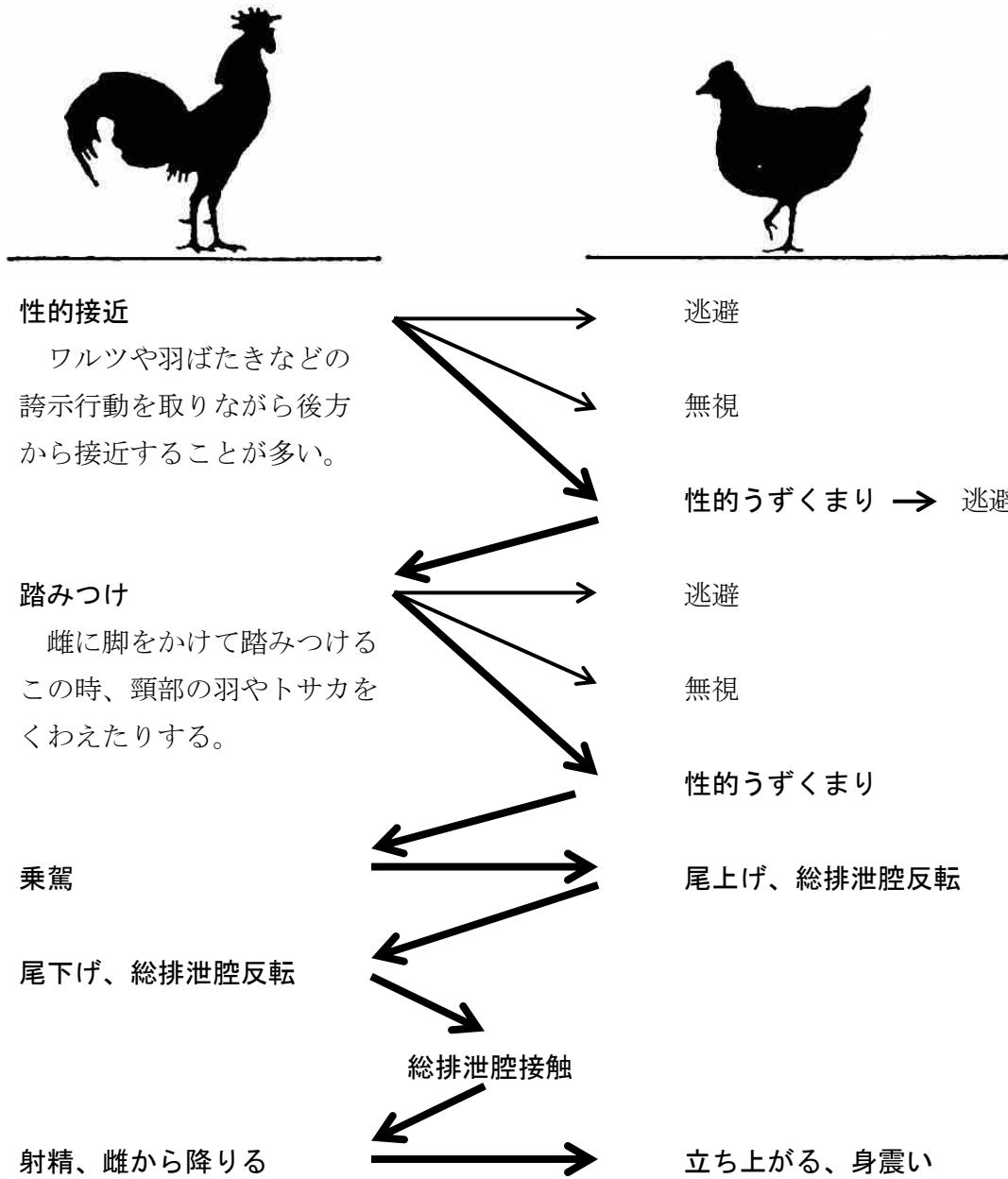
個体記録が取れるようにトラップネストを設置した群飼ケージ。

(4) 性行動

雄の求愛動作には、次のようなものがある。雌に近づく動作としては、片側の翼を落とし小刻みなすり足で雌の周りを歩くワルツィング、頸を伸ばして頸羽を立てて後ろから雌に近づく動作、また、胸を張って高く足踏みしながら雌の周りを回る動作などがある。雌の注意を引こうとする動作としては、床の上のものを足で引っ搔き、ついばみ、特徴ある声を上げるといった一連の動作（ティッドビッティング）、体とくちばしで巣作りをするネスティング、翼をバタバタさせたり（ほろ打ち）、その後で飛び上がったりといった行動がある。

雄の求愛動作に対して、雌はうずくまることによって雄を許容する。雄は後部から乗り、雌の背中に足をおいてくちばしで冠、後頭部または頸部の羽をくわえる。雄が足で雌の背中に圧力をかけると雌の尾羽は上がり総排泄腔が反転する。雄は尾を下げて同じく総排泄腔を反転させて雌の総排泄腔と接触させて射精する。交尾が完了すると雄は前へ進み、雌は身震いを行い同時に総排泄腔はもとに戻る。鶏の交尾時間は数秒しかからない。雄の接近に対して雌は全て許容するわけではなく、いったん許容したのち逃避することもあり、雄が雌に接近したうち交尾に至る割合は15%程度と言われている。

交尾は夜間には見られず、明期でも午後に多く行われる。早朝にもやや多く行われ、昼前後は少ないとされている。1日の交尾回数は個体によっても大きく異なり、交配させる雌の数によっても変化する。通常、雄1羽に雌1羽の時は雄の交尾回数は10～15回であるが、雌の数を増加させると交尾回数も増え、雄1羽に雌10羽程度を交配させた時は、雄は1日に50～60回の交尾を行うこともある。



ニワトリの性行動連鎖

肠道コラム 属間交配と種間交配

同じ科または上科の中で異なる属との交配を属間交配と呼び、同じ属の中で異なる種同士の交配を種間交配と呼びます。ニワトリの場合は、同じキジ科の中でもキジ、シチメンチョウ、ウズラ、ホロホロチョウ、クジャク等との交配が属間交配で、野鶏との交配が種間交配となります。

ニワトリ×キジでは、雄雌どちらにしても F_1 は発生します。ただし、 F_1 の繁殖能力は不能でラバ（ロバとウマの交配種）などと同じです。ニワトリ×シチメンチョウは、ニワトリの精子を用いて F_1 は出来ますが、 F_1 の繁殖能力はやはり不能です。発育は両者の中間となります。ニワトリ×ウズラも、ニワトリの精子を用いて F_1 は出来ますが、 F_1 の繁殖能力は不能となります。ふ化日数は両者の中間で 19 日となります。発育は両者の中間で、白色レグホーンの精液を用いると羽色は白となり、トサカはウズラのように無くなります。受精率は 7% と低く、ふ化率も 0.5% と非常に低いもので、 F_1 の雌はふ卵して 60~70 時間後に死亡して、ふ化するのは雄のみだそうです。ニワトリ×ホロホロチョウ、ニワトリ×クジャクでも F_1 の作出に成功しているようです。

野鶏との交配は、どれも F_1 は出来ますが、繁殖能力があるのは赤色野鶏（セキショクヤケイ）を交配した時だけで、他の緑襟野鶏（アオエリヤケイ）、灰色野鶏（ハイイロヤケイ）、セイロン野鶏（セイロンヤケイ）との交配では F_1 の繁殖能力はありません。緑襟野鶏の染色体は、第三番目の染色体がニワトリとは異なっており、ニワトリでは長腕しかない端部動原体型であるのに対し、緑襟野鶏では長腕と短腕のある次端部動原体型であり、微小染色体が 3 番目の染色体に転移しています。

III. 凍結精液技術

1. 凍結精液作製に当たって

(1) 凍結に対する精子の特性

凍結精液技術は、50年前にグリセリンと卵黄の耐凍効果が認められ、牛では実用化に至っている。豚でもOEP（主成分は界面活性剤のラウリル硫酸ナトリウム）が加わると卵黄の耐凍効果を増大させることが認められ、技術はある程度確立しているが、個体によっても耐凍性に違いが見られるため、凍結精液よりも液状精液の方が広域利用の場合で利用されている。

鶏の場合は、グリセリンを最終濃度7～8%程度にすると融解後の生存率は優れていが、希釈精液の中にグリセリンが2%以上含まれていると受精率が極端に低下するため融解後に除去される。また希釈液に、卵黄を含んでいると精液は活発に運動するが受精率は逆に低くなることが知られている。グリセリンを含んだ液で希釈する際には、希釈によるショックを軽減させるため段階希釈を行う必要があり、特にグリセリンの除去に対して慎重に行う必要がある。ここで一気に希釈すると精子が希釈によるショックを受け、精子は運動していても受精能力が無くなってしまう。DMSO（ジメチルスルホキシド）やメチルアセトアミドの場合は、融解後の生存率は低いものの、ある程度の濃度であれば除去する必要はない。DMSOの場合では、新鮮な原精液であれば7%濃度でも受精率は低下しないが、凍結融解精液では7%濃度ではほとんど受精しない。そのため、DMSOの場合は、3～4.5%の最終濃度で行われる。

(2) 凍結精液作製のための採精

雄は頻繁に採精されることによって、精子自体の耐凍性が増してくる。そのため、採精をしばらく行わっていない雄から凍結精液を作製する時には、作製する1～2週間前から1日おき程度の頻度で採精を行う。

採精時に混入する透明液は、凍結に関して害に働くため出来るだけ入れないようにする。全く混入しないということは無理なので多少の混入は仕方がないが、無理に量を取ろうとすると透明液が多く入るので、量を取ろうとせずに濃い精液を取るようにする。

(3) 膨深部注入

卵管膨部の浅い部分での注入では、多くの量を注入すると精液が逆流し外に出てしまう。そこで逆流を防ぐ方法として深部注入を行う。また、精子活力が弱い場合は深部注入すると受精率も上がることが多いので、凍結融解精液の場合は膨深部注入を通常行う。

注入は保定者と注入者の2人で行うことが基本で、注入器の先が卵管に入ったら、保定者は雌鶏の両足を広げ腹部の圧迫をゆるめる。この時、卵管は元に戻った状態で注入器はまっすぐ突き当たるところまで入れ精液を注入する。保定者はしばらく雌鶏の足を広げたまま総排泄腔をやや上向きにし逆流の無いことを確認して静かにケージに戻す。



深部注入



鶏精液注入器 (FKH 製)

深部注入を行うときの器具は、図のような注入器や、ガラス管をゴムやシリコンのチューブでシリングに繋げて用いると良い。

脇道コラム　凍結方法の種類

凍結は大きく、緩慢凍結、急速凍結、超急速凍結に分けられます。緩慢凍結は1分間に1°Cずつ下げていくなどのプログラムフリーザーを用いる方法と発泡スチロールの容器などに入れて-80°Cの超低温フリーザーに入れてゆっくりと凍結させる方法で、哺乳類の受精卵や培養細胞など脱水させながら冷却する時に用いられます。発泡スチロール容器よりも使いやすい特殊な容器も市販されています（バイセルなど）。超急速凍結は、液体窒素の中へいきなり投入して凍結させる方法で、凍結保護物質を多量に含む溶液を用いるガラス化凍結法として知られています。この時は専用ストローを使用しないと液体窒素に投入しただけでストローは破裂します。急速凍結は、液体窒素蒸気で凍結させる急速ストロー法が有名で、ドライアイスで凍結させるペレット法もこれに分類されます。精子は水分が少なく凍結の際には特に脱水させる必要が無いため、種を問わず精液の凍結には急速凍結法が広く行われています。精子のガラス化凍結は、多量の凍結保護物質が精子に悪影響を及ぼすことと融解後の除去が更に複雑になることから行われていません。

保存は液体窒素中で保存するのが一般的ですが、-130°Cまで冷却できる超低温フリーザーでは液体窒素と同様に保存ができます。

2. 凍結精液作製法

(1) 家畜改良センター岡崎牧場の方法(メチルアセトアミド、急速ストロー法)

【凍結】

- ① マッサージ法により精液を試験管に受け、すぐに5℃に冷却したHS-2液を精液と同量添加し、5℃で30分間静置する。
- ② メチルアセトアミドを15%添加したHS-2液を2次希釀液として、①の希釀精液に1:1の割合で混合し、0.5mlの凍結精液用ストローに希釀精液を充填して、ストローパウダーで栓をする。
- ③ 発泡スチロール容器にストロー架台のためのステンレス製の試験管立てを入れ、液体窒素をストローと液体窒素の液面との距離4~4.5cmとなるように液体窒素を入れる。
- ④ ストローをストロー架台に横向きに並べて凍結する。発泡スチロール容器の蓋をして30分静置した後、ストローを液体窒素中に投入し、しばらく静置したのち液体窒素保管容器に移し替えて保存する。

【融解】

- ① 凍結精液の融解は鶏舎内で行う。
- ② 5℃の水にストローを浸漬し、ストローの周りについた氷を取り除き、融解したら試験管に精液を移す。一回に溶かす量は、ストロー4~5本とする。
- ③ 融解精液は膣深部に0.3ml/1羽注入する。週2回(3~4日おき)の注入で、6~8割の受精率が得られる。

HS-2液の組成表

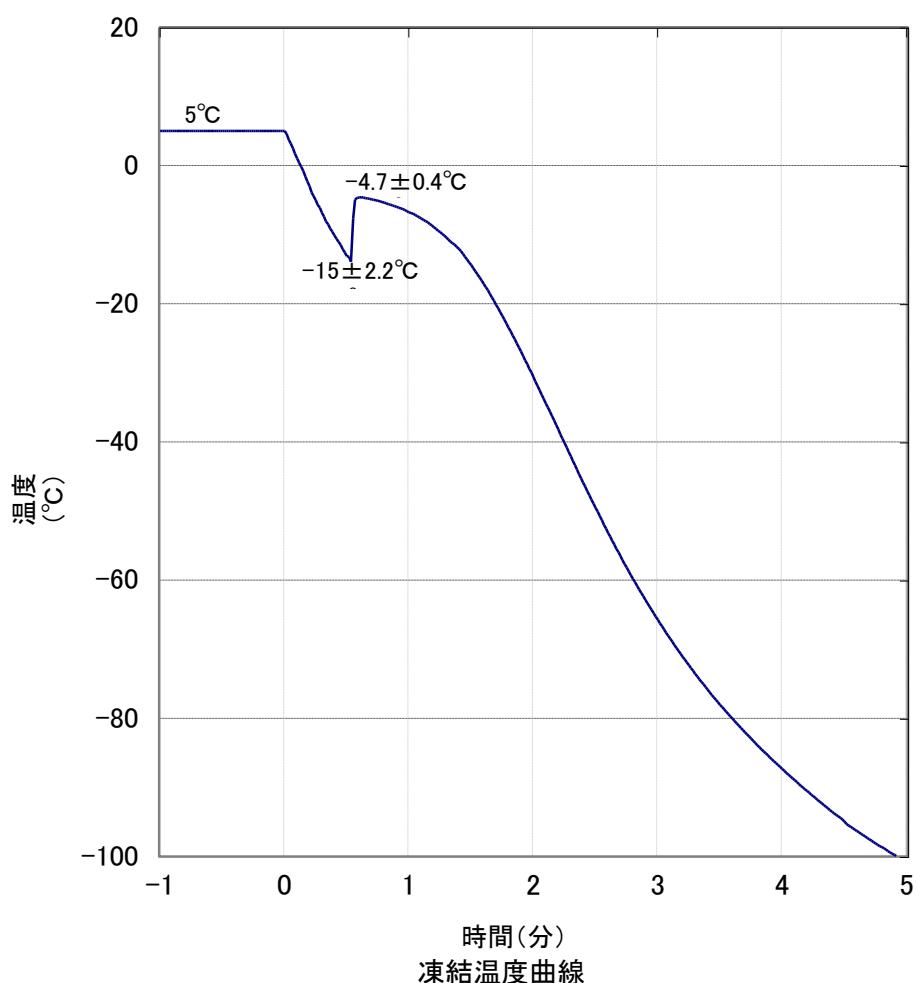
	g/DW100ml
グルコース	0.2
トレハロース・2H ₂ O	3.8
グルタミン酸Na・H ₂ O	1.2
酢酸K・無水	0.3
酢酸Mg・4H ₂ O	0.05
クエン酸三K・H ₂ O	0.08
BES ^{注1)}	0.4
Bis-tris ^{注2)}	0.4
硫酸ゲンタマイシン	0.001
PH	6.8
浸透圧(mOsm/kg)	350

注1) BES(ベス) : N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸

注2) Bis-tris(ビストリス) : ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン



液体窒素蒸気による凍結



【凍結精液作業】



① 5°Cの水槽を準備し、鶏舎内で精液と同量の1次希釀液を入れて30分間静置する



② 2次希釀液を添加し、良く攪拌する。



③ ストローに充填する。図は、口で吸引する方法。必ず空気層を設けること。大量に作製するときは吸引ポンプを用いる。



④ 液体窒素の蒸気で凍結。中の架台は試験管立て。



⑤ 鶏舎内で融解。1回に溶かす量は4~5本程度。



⑥ 膣深部注入

(2) Lake の方法 (グリセリン、プログラムフリーザー法)

【凍結】

- ① 精液 0.15ml を、小試験管に入れる。
- ② 3~5°Cで 5 分間静置する。
- ③ 凍結用のグリセリンを含むレーク液 0.45ml を加え良く攪拌する。
- ④ 1ml の凍結用アンプルに希釀精液 0.6ml を入れて蓋をしめる。
- ⑤ 5°Cのアルコールバスにセットする。
- ⑥ アルコールバスを用いるプログラムフリーザーで-1°C/分で-35°Cまで冷却する。
- ⑦ 液体窒素の中に投入し保存する。

【融解】

- ① 液体窒素から出したアンプルを 5°C以下の水で融解し、3~5 分間隔で 0.06、0.16、0.3、0.55、1.13、1.4ml の再希釀用のレーク液で希釀を行う。
- ② 冷却遠心機で 5°C、700g、15 分間遠心する。
- ③ 上清を除去したのち 0.1ml の再希釀用のレーク液を加え、原精液濃度に戻す。
- ④ 15 分以内に 0.15ml の精液を雌の卵管腔部の深部へ注入する。

レーク液の組成表 g/100ml DW

	凍結用	再希釀用 ¹⁾
グルタミン酸 Na・H ₂ O	1.92	1.92
グルコース ²⁾	0.8	0.6
酢酸 Na・無水		0.51
酢酸 K・無水	0.5	
酢酸 Mg・4 H ₂ O		0.08
クエン酸三 K・H ₂ O		0.128
ポリビニルピロリドン ³⁾	0.3	
グリセリン	13.64g (10.8ml)	
pH		7.23
浸透圧(mOsm/kg)		360

- 1) 凍結では再希釀用で用いるが、凍結しない場合でも通常の希釀液としても用いられる。
- 2) 1983 年以降の文献ではグルコース、それ以前ではフルクトースを用いている。
- 3) 水分を吸いやすく固まるため、デシケーターで保存する。

(3) Sexton の方法 (DMSO、プログラムフリーザー法)

【凍結】

- ① 25°Cに保温した試験管で精液を採取する。
- ② 25°Cのベルツビル家禽精液希釈液で精子数が10億/1mlになるように希釈する。
- ③ 希釈精液を5°Cで2時間静置する。
- ④ 2時間の静置後DMSO^{注1)}を最終濃度が4%になるように添加し攪拌する。
- ⑤ 希釈精液を0.5mlストローに充填し封をする。
- ⑥ 5°Cのアルコールバスにセットする。
- ⑦ アルコールバスを用いるプログラムフリーザーで-1°C/分で-20°Cまで冷却する。
- ⑧ 液体窒素の蒸気で-80°Cまで冷却した後、液体窒素中に投入し保存する。

【融解】

- ① 液体窒素から出したストローを氷水中で4~5分かけて溶かし試験管に移す。
- ② 雌1羽当たり精子数3億を注入する。

ベルツビル家禽精液希釈液 (BPSE) の組成表

g/100ml DW

グルタミン酸Na・H ₂ O	0.867
フルクトース	0.5
酢酸Na・3H ₂ O	0.43
塩化Mg・6H ₂ O	0.034
クエン酸三K・H ₂ O	0.064
リン酸水素二K・3H ₂ O	1.27
リン酸二水素K・無水	0.035
TES ^{注2)}	0.195
pH	7.5
浸透圧(mOsm/kg)	333

注1) DMSO (ディムソー) : ジメチルスルホキシド (CH₃)₂SO₂

注2) TES (テス) : N-トリス (ヒドロキシメチル) メチル-2-アミノエタンスルホン酸

※ベルツビル家禽精液希釈液 (BPSE) 作製に当たっての注意点

リン酸水素二Kと塩化Mgを混ぜると沈殿してしまい溶解しなくなる場合があるので、塩化Mgとクエン酸三Kの混合溶液を別に溶解しておき、最後に他を全て溶かした液とを混合する。

(4) Terada の方法 (グリセリン、ペレット法)

【凍結】

- ① 採取した精液を 5°C で 15 分静置する。
- ② 9.33% にグリセリンを添加した H·D 液で精液を 4 倍希釈する。この時、グリセリンを添加した H·D 液の使用量を 10 等分し 1 分置きに 10 回の段階希釈を行う。
- ③ 希釈精液は 5°C で 10~15 分間静置する。
- ④ ドライアイスの表面に半田鑓等で幅と深さ各 1cm 程度の穴を必要数開ける。
- ⑤ 連続分注器で開けた穴に対して 0.2ml 落としペレット状に凍結させる。この時、連続分注器の先端を少し切って太くして行う。先端が細いと分注による勢いが強すぎるため、上手く穴に入らずにこぼれてしまう。
- ⑥ ⑤のドライアイスの上に別のドライアイスを上に被せて 30~60 分間静置する。
- ⑦ 発泡スチロール容器に液体窒素を入れて、凍結させた精液を液体窒素中に落とす。この時、発泡スチロールが白い場合はアルミホイルを底に敷くと凍結精液がどこに落ちたか見やすい。
- ⑧ 凍結したペレット状の精液をアンプルに移して、液体窒素中で保存する。

【融解】

- ① 50ml の遠沈管に凍結精液のペレットを移し、37°C のお湯で遠沈管を良く回しながら半融解させる。完全に溶けると精液の温度が上昇しそぎてしまうので良くない。
- ② 遠沈管を 5°C の水槽に移し、ここで精液を完全に溶かす。
- ③ 再希釈用の H·D 液で段階希釈による再希釈を行う。融解精液の 1/8 量を 5 回、融解精液の 2/8 量を 5 回、融解精液の 3/8 量を 5 回、融解精液の 4/8 量を 5 回、融解精液の 5/8 量を 5 回の順に 1 分間隔で計 25 回の段階希釈を行う。
- ④ 再希釈された融解精液を冷却遠心機で 5°C、700g、20 分間遠心し、上清を除去する。
- ⑤ 沈殿精子に 0.1~0.2ml の再希釈用の H·D 液を 1 分置きに加え、採取時の原精液濃度に戻し、雌 1 羽当たり 0.2ml を膣深部に注入する。

※ H·D 液

成分表は公開されていない。共立商事株式会社（東京）から市販されている。

(5) Hujihara の方法 (DMSO、急速ストロー法)

【凍結】

- ① 採取した精液を小試験管に入れ 2~3°C の氷水中に入れる。
- ② DMSO ^{注1)} を 5% 添加した GRH 液を精液の 2 倍量を添加し混合する。
- ③ 0.25ml の凍結用ストローに希釈精液を 0.15 ml 充填し封をする。
- ④ ストローホルダーを液体窒素の液面との距離を 1~2cm にセットして、1 分間液体窒素の蒸気で凍結させる。
- ⑤ 液体窒素中に投入して保存する。

【融解】

- ① 0°C の氷水で融解する。
- ② ストローをカットし、通常の人工授精と同じように出来るだけ早く注入する。

GRH 液の組成表	g/DW100ml
グルタミン酸 Na・H ₂ O	1.87
ラフィノース・5 H ₂ O	5.945
HEPES ^{注2)}	0.715

注1) DMSO (ディムソー) : ジメチルスルホキシド (CH₃)₂SO₂

注2) HEPES (ヘペス) : N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸

（6）農業生物資源研究所の方法（グリセリン、急速ストロー法）

【凍結】

- ① 凍結作業は鶏舎内で行う。鶏精子は採取後約 15 分間は寒冷衝撃に対する抵抗性があるため、精液採取からこの凍結まで 15 分以内に行う。
- ② 採取した精液は、5°Cの凍結用 Lake 液で 5~10 倍希釈し、0.5ml の凍結用ストローに充填して氷水に投入する。
- ③ キムタオル等でストローに付いた水を拭き取りながら、液体窒素の入った発泡スチロール容器の試験管立てに横向きに並べる。この時のストローと液体窒素の液面との距離は 3~5cm にする（43 頁写真参照）。
- ④ 10 分間静置後、液体窒素中にストローを投入する。

【融解】

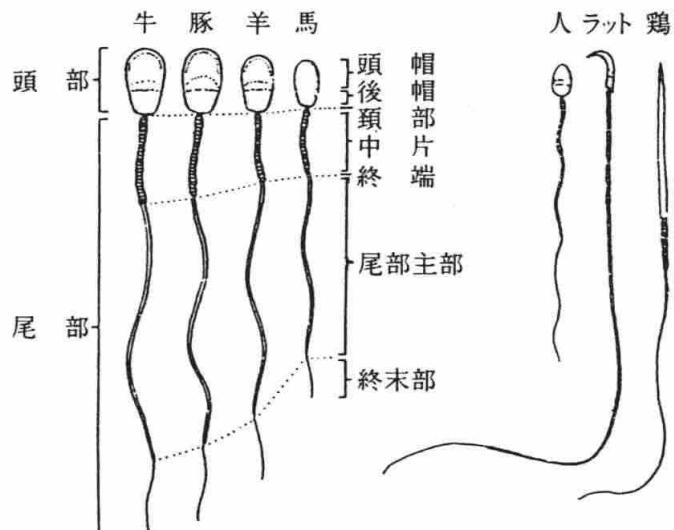
- ① 5°Cの水で融解する。ストロー表面の氷は手で取り除く。
- ② 融解精液の 1/8、2/8、3/8、4/8、5/8 量のグリセリン不含 Lake 液を 1 分ごとにそれぞれ 5 回ずつ添加する。
- ③ 希釈した精液は、5°C、500g、10 分間の遠心分離を行い、上清を除去しながら精子濃度を 1~3 億／0.2ml に調整する。
- ④ 5°Cに冷却保存しながら現場に運び、臍深部に 0.2ml／羽を注入する。

脇道コラム 精子の低温ショック

精子を急速に低温（5°C）に曝すと細胞膜の半透性が失われ、運動性の低下や、精子頭部の形態異常が起こり受精能力は低下します。低温ショックに対する抵抗性は動物種によって大きく異なり、ヒトやニワトリの精子は強く、ウシやヒツジは弱く、ブタ精子は特に弱く、15°C以下では運動性が著しく低下します。精子頭部が平たくて大きいものほど低温ショックに弱い傾向があるようです。卵黄や脱脂粉乳などには温度衝撃を保護する効果があり、卵黄の成分の中性脂肪、リポタンパク（ β -リポビテリン）、リン脂質（レシチン）、糖タンパク（リベチン）に保護作用があるとされています。ニワトリ精子は元々低温ショックに強く、卵黄や脱脂粉乳が入ると受精率が低下するので希釀液には添加しません。

ニワトリ精子は低温ショックに強いのですが、特に精液採取後約15分間は温度の急激な変化にあっても低温ショックを受けにくい時期であり、この間に凍結まで行う方法もあります。一方、ウシ精子の実験で、5°Cに長時間置くことによって精子の耐凍性が高まることが知られており、希釀液にもよりますがニワトリ精子においても5°Cに長く置くことで耐凍性は高まっている様です。そのようなことから、岡崎牧場では精液採取後すぐに5°Cに落とし、30分間5°Cで静置したのち凍結を行う方法をとっています。

各家畜の精子



家畜繁殖学誌より

3. 精液希釈液

(1) 必要成分

精液希釈液に最低含まれていなければならない物質は、代謝基質と緩衝剤で、凍結保存の場合では凍結保護物質が加わり、抗菌剤も加わっている方が良い。哺乳類精子の凍結保存では、塩害が気にされており凍結保存用としては Na や K などを添加しない場合が多いが、鳥類の精子では気にする必要はない。ただし、Cl が多く入るほど頸曲がり精子を増加させるので、希釈液には添加しない方が好ましい。Na と K の比率や絶対量で精子の運動性が変わることはない。pH は、ほぼ中性であれば問題なく、ニワトリの場合は pH7.4 程度で最も活発に運動する。

(2) 代謝基質

単糖類のグルコースやフルクトースが一般的に利用され、ソルビトールも代謝基質として利用される。2 糖類や 3 糖類、5 炭糖は代謝基質にはならない。グルタミン酸や酢酸は緩衝剤としての効果と代謝基質としての役割がある。グルタミン酸は、頸曲がり精子の抑制に働くとされており、ニワトリ精液の希釈液には欠かせない。ただし、クエン酸ほどではないものの、グルタミン酸も量が多くなるほど精子の運動性を阻害する。グルコースのみの希釈液で保存すると乳酸がたまることにより pH は低下するが、グルタミン酸 Na のみの希釈液で保存するとグルタミン酸の消費によって pH は上昇する。酢酸 Na などでも同様であり、液状保存の場合には、糖類とグルタミン酸や酢酸の比率によって pH の変動が左右されることになる。酢酸は代謝基質として利用されるが濃度がある量を超えると異常な運動をする精子が増える。ニワトリ精子は体外で高い温度にすると活発に運動した後不動化を起こすが、酢酸イオンがあると不動化するまでの時間が延長する。

(3) 緩衝剤

pH は中性付近で不安定で酸性やアルカリ性のものが加わることで大きく変動してしまう。この変動を緩やかにするものを緩衝剤と呼んでおり、精液希釈液にはグルタミン酸や酢酸の他に、クエン酸やリン酸、Good バッファーが主に利用されている。

クエン酸は多く添加されるほど精子の運動性は低下する。リン酸水素二 K やリン酸水素二 Na は、ある程度入ると精子の運動性が活発になり液状保存したときの精子の寿命が延長するが、多く入りすぎると奇形精子が増加するので適量に抑える必要がある。リン酸水素二 K やリン酸水素二 Na はアルカリ性が強いので、リン酸二水素 K やリン酸二水素 Na などの酸性物質と併用する。Good バッファーは精子活力に大きく影響し、pH を 7.4 と一定にした場合の効果は BES>TES>HEPES の順で、BES が最も精子活力を高める。ただし、どの試薬もある程度の添加までは精子の運動を活発にするが、一定量を超えると運動性は逆に悪くなる。

(4) pH 調整剤

アルカリ性の強い試薬としては、水酸化 Na や水酸化Kがあるが緩衝効果が無いため微調整は行いにくい。リン酸水素二 K やリン酸水素二 Na は緩衝効果もあるため調整しやすい。リン酸水素二 K は水に溶けやすいが、リン酸水素二 Na は水に溶けにくい。Good バッファーの中では tris と Bi-tris があるが、tris の方がアルカリ性が強い。酸性試薬としては、リン酸二水素 K やリン酸二水素 Na がある。BES や TES も酸性を示す。

(5) 凍結保護物質

凍結保護物質には細胞透過性と不透過性の 2 種類があるが、単に凍結保護物質と言った場合は、グリセリンや DMSO などの細胞透過性の凍結保護物質を指している場合が多い。ニワトリ精子には、グリセリンが最も効果的だが、1%以下の濃度に落とさないと低い受精率となるので融解後にはグリセリン除去を行う必要がある。DMSO は融解後に除去する必要が無いが、融解後には出来るだけ早く注入する必要がある。また濃度が 7%まで上げると、未凍結精液であれば通常の受精率が得られるが、融解精液であると受精率は極端に低くなる。エチレングリコールやプロパンジオールはニワトリ精子にはほとんど効果が無い。ブタントリオールはグリセリンの次に効果があるが、融解後にやはり除去する必要がある。ダイレクト注入が出来るものとしては、アミド類と DMSO があり、アミド類としては、メチルアセトアミド (MA) > ジメチルホルムアミド(DMF) > ジメチルアセトアミド(DMA) の順に効果が認められ、DMSO の効果は DMA と DMF の中間となる。液状の凍結保護物質は、重さで記載する場合が多いので容量へ変換する必要がある。変換は重さを比重で割って算出する。Lake 液の場合はグリセリン 13.64g を添加するので、 $13.64 \div 1.26 = 10.8\text{ml}$ と換算できる。粘性が強いグリセリンの分注は、ディスポのシリジンを用いると行いやすい。

細胞不透過性の凍結保護剤としては、糖類の効果が認められている。中でも 2 糖類のトレハロースが最も優れており、その他の 2 糖類ではスクロースやラクトース、3 糖類ではラフィノースにも効果がある。単糖類の中では、グルコースが優れている。糖類は一般に溶けにくい特徴を持つが、トレハロースは非常に溶解しやすい。

耐凍剤の質量と比重

	分子量	比重 (20°C)
グリセリン (Gly)	92.09	1.260
ジメチルスルホキシド (DMSO)	78.14	1.103
ジメチルアセトアミド (DMA)	87.12	0.943
ジメチルホルムアミド (DMF)	73.09	0.950
メチルアセトアミド (MA)	73.09	0.957

(6) 抗菌剤

衛生的な観点から、希釈液には抗菌剤を添加した方が良い。ただし添加量が多すぎると精子への悪影響もあるので添加量に注意が必要である。ニワトリ精液で、ペニシリン、ストレプトマイシン、アミカシン、ジベカシン、ゲンタマイシンの単体及び混合で調査した結果、ゲンタマイシンの単体 0.001%が精子への影響が無く抗菌性も優れていた。ゲンタマイシンは 10mg/1ml の溶液も市販されている。

(7) その他の成分

哺乳類精液の希釈液では卵黄が添加されるが、鳥類の場合、精子は活発に動くが受精率は低下するため添加しない。OEP などの界面活性剤も卵黄が加わった時に効果が増大するものなのでこれも添加の効果がない。ブタの精液希釈液に添加されるキレート剤の EDTA は、ニワトリ精液希釈液に添加すると精子の運動は停止する。カフェインはブタの精子の運動性を高めるがニワトリ精子には効果はない。ニワトリの精液希釈液にはタンパク質は添加しない方が良いが、ウシ血清アルブミン (BSA) の 0.1% 添加は、精子の体積が増加し、活発な精子の運動性が維持されると言われている。ただし、BSA の添加された希釈液は、泡が立ちやすいといった問題もある。BSA とラフィノースが加わった希釈液は、5°C で保存するとラフィノースが沈殿するので、両者を混合した希釈液は作らない。

(8) 既存の精液希釈液の特徴

BPSE (ベルツビル家禽精液希釈液) は、液状保存に特に適しており BPSE で希釈すると希釈前では運動性の悪かった精子も運動を再開するものもある。また、希釈倍率を 5~6 倍にしても運動性は良い。液状保存の場合は、3 倍希釈で 5°C 保存の条件で 1 日程度の保存が可能である。ただし、液状で保存する場合も凍結精液を作製するときと同様に透明液を出来るだけ入れないように注意する必要がある。また、この希釈液を作製する際には、リン酸と Mg を同時に溶解すると沈殿を起こして溶解しなくなる場合があるので、作製する際にはクエン酸と Mg を別に溶解しておき、残りの溶解液と最後に混ぜる様にする。

Lake 液は、5 倍希釈まですると精子の運動性は落ちてしまうので、最大で 4 倍希釈までとする。液状保存では Lake 液は BPSE よりも劣っているが、凍結保存する場合では Lake 液の方が優れている。Lake 液は液状保存には向きで、3 倍希釈 5°C で 1 日程度保存すると精子の運動は停止する。また、凍結用と液状保存用 (再希釈用) の 2 種類があるが、液状保存用に耐凍剤を加えれば凍結の場合でも使用できる。リン酸を含まないので、作製の時はどのように融解しても沈殿を起こすことは無い。

MnA (ミネソタ A) は、ミネソタ州立大学で開発された希釈液。緩衝剤が複雑に含まれているためか運動性は非常によい。添加する試薬が多いことと水酸化 K が入るなど作製しにくい。

GRH 液は、Hujihara が凍結精液で使用した希釀液である。添加するグルタミン酸 Na、ラフィノース、HEPES の頭文字を取った名前となっている。融解後の精子活力は非常に悪いが、正常精子が多い特徴がある。

Wilcox のリン酸緩衝液は、非常に古くから用いられている希釀液であるが現在ではあまり用いられていない。この希釀液は代謝基質を含まないため、単体では運動持続性が良くないため、6%グルコース液を 10%添加した希釀液などが使用される。また、リン酸 Na は水に溶けにくいといった欠点もある。

(9) 新希釀液の試作法

これと言った決まった方法が有るわけではないが、ここでは比較的簡単に作製できる方法として、目標の浸透圧に近い溶液をいくつか作製しておき、それを混合して作製する方法を紹介する。

まず、添加したい試薬を用いて最終的に作製したい浸透圧に近い単体での溶解液を作製する。次に、それらの混合割合を変えた溶液を何種類も作製し、精液を実際に希釀してみて適量範囲を調査する。希釀液の基本は代謝基質と緩衝剤なので、初めは、代謝基質として利用される糖類の溶液と緩衝作用のある物質の溶液を作製し、2つの溶液の混合割合を変えたもので精子を実際に希釀して、精子生存率、精子活力、運動持続性を、希釀直後から時間の経過に伴う変化を見ながら適量範囲を調査する。

糖類の割合が決定したら糖類溶液の割合を一定にして、種類の異なる緩衝剤について割合を変えて同様に適量範囲を調査する。試薬によっては、溶液を混合することで浸透圧が大きく低下する場合があるので、混合した場合は浸透圧の測定を行い確認する。また、試薬によっても pH が異なるので、強酸性や強アルカリ性の物質は最終的な目標に近い値になるように混合した溶液を作製しておく。ここで、pH を一定にしないと試薬の濃度の影響よりも pH の影響が大きく出てしまう。凍結用の場合は、DMSO など凍結保護効果の小さい物質を加えて、融解後の生存率や精子活力を調査するが、この場合の浸透圧の測定は、DMSO などの凍結保護物質を含まない溶液で測定する。

鶏精子の希釀液としては、浸透圧が 330~380mOsm/kg 程度が望ましく、液状保存としては低めが、凍結用としては高めの浸透圧が良いとも言われる。グルコースは 6.0% で約 355mOsm/kg となり、金属イオンを含まない試薬であれば同じモル濃度で浸透圧もほぼ等しくなる。グルタミン酸 Na であれば 3.5% 溶液で約 350mOsm/kg で、グルタミン酸 Na の様に 1 倍の金属イオンの場合であれば同じモル濃度で浸透圧もほぼ等しくなる。クエン酸三 Na であれば 3.7% 溶液で約 350mOsm/kg となるが、Mg イオンが加わると浸透圧が低下するので、Mg イオンを加えたい場合は、Mg とクエン酸の混合の等張液を作製しておく。リン酸 Na やリン酸 K は強いアルカリ性や酸性を示すので、ほぼ中性の混合溶液を作製しておく。グルタミン酸 Na、クエン酸 K、酢酸 Na などはほぼ中性を示す。糖類は弱酸性だが緩衝効果が無いので中性と見なして良い。HEPES はほぼ中性、TES は弱酸性、BES は TES よりも酸性を示す。

最後に、混合液の浸透圧と pH を測定し、理想に近いように試薬を添加したり、蒸留水を加えるなどを行い pH や浸透圧の調整を行う。また、作製する側に立ち出来るだけ容易に作製できる様に添加割合を可能な範囲で修正する。ポリビニルピロリドン (PVP) や牛血清アルブミン(BSA)など分子量が 10000 以上といった高分子化合物は、浸透圧への影響が少ないため、添加したい場合は等張液を作製する必要はなく、作製した希釀液にそのまま添加すればよい。

鶏精液の場合、3 倍希釀であれば、実はかなり単純な希釀液でも使える。希釀してすぐに受精する場合であれば、グルコースやグルタミン酸 Na の単体溶液でもかまわない。しかし、より高い受精率を求めたり、希釀して時間が経過したり、希釀倍率を大きくしたりするとなかなか良いものは出来ない。また、液状保存と凍結保存の兼用希釀液は、おそらく良いものは作製できないので用途にあわせて作製した方がよい。

単体溶液での濃度、浸透圧、pH

	濃度 (g／100ml)	浸透圧 (mOsm／kg)	pH
グルコース・無水	6.0	355	5.5
グルタミン酸 Na・H ₂ O	3.5	350	6.8
クエン酸三 Na・H ₂ O	3.7	350	7.4

- 他の糖類などの非電解質や、HEPES、Tris などの緩衝剤は、グルコースと同じモル濃度で同じ浸透圧となる。
- 酢酸 Na、酢酸 K、塩化 Na などの 1 価の金属イオンのものは、グルタミン酸 Na と同じモル濃度で同じ浸透圧となる。
- クエン酸三 K など、3 価の金属イオンのものは、クエン酸三 Na と同じモル濃度で同じ浸透圧となる。
- 糖類は酸性を示すが、緩衝効果が無いので緩衝剤が加わるとそれに左右されるので、pH は気にしなくて良い。

2 種類の試薬の混合溶液での濃度、浸透圧、pH

	濃度 (g／100ml)	浸透圧 (mOsm／kg)	pH
酢酸 Mg・4 H ₂ O	1.25	340	
クエン酸三 K・H ₂ O	2.0		7.0
リン酸水素二 K・3 H ₂ O	3.0	360	
リン酸二水素 K・無水	0.5		7.1

- Mg とクエン酸の等張液を混合すると浸透圧が低下するため、あらかじめ混合の等張液を作製しておく。
- リン酸水素二 K は強いアルカリ性、リン酸二水素 K は強い酸性なのであらかじめほぼ中性にした混合溶液を作製しておく。

鶏精液希釀液の組成表

g/100ml DW

	HS-2	Lake	BPSE	MnA	GRH	Wilcox
グルコース・無水	0.2	0.6	—	1.0	—	—
フルクトース・無水	—	—	0.5	—	—	—
トレハロース・2H ₂ O	3.8	—	—	—	—	—
ラフィノース・5H ₂ O	—	—	—	—	5.945	—
ソルビトール・無水	—	—	—	0.07	—	—
グルタミン酸Na・H ₂ O	1.2	1.92	0.867	0.21	1.87	—
グルタミン酸K・H ₂ O	—	—	—	0.6	—	—
酢酸Na・無水	—	0.51	—	0.25	—	—
酢酸Na・3H ₂ O	—	—	0.43	—	—	—
酢酸K・無水	0.3	—	—	0.21	—	—
クエン酸三K・H ₂ O	0.08	0.128	0.064	0.05	—	—
酢酸Mg・4H ₂ O	0.05	0.08	—	—	—	—
塩化Mg・6H ₂ O	—	—	0.034	—	—	—
硫酸Mg・7H ₂ O	—	—	—	0.035	—	—
リン酸水素二K・3H ₂ O	—	—	1.27	0.7	—	—
リン酸二水素K・無水	—	—	0.035	0.16	—	—
リン酸水素二Na・12H ₂ O	—	—	—	0.08	—	—
リン酸水素二Na・無水	—	—	—	—	—	1.634
リン酸二水素Na・H ₂ O	—	—	—	—	—	0.516
水酸化K	—	—	—	0.1	—	—
HEPES	—	—	—	0.4	0.715	—
TES	—	—	0.195	0.4	—	—
BES	0.4	—	—	0.3	—	—
Bis-tris	0.4	—	—	—	—	—
硫酸ゲンタマイシン	0.001	—	—	—	—	—
pH	6.8	7.23	7.5	7.1	—	7.2
mOsm/kg	350	360	333	370	—	—

家畜各種の精液希釀液

g/100ml DW

家畜名 (希釀液名)	ウシ (材セミン) (v/v %)	ウマ (HGH・27)	ヒツジ・ヤギ (材セミン)	ブタ (ボリザン) (モテナ)
卵黄	20.00	7.00	—	—
白色卵黄粉	—	—	4.00	—
脱脂粉乳	—	—	—	3.00
クエン酸 Na	1.80	(0.25)	1.80	—
重炭酸 Na	—	—	0.10	0.24
リン酸水素二 Na	0.04	—	0.10	—
クエン酸 K	0.04	—	0.05	—
塩化 K	—	0.025	—	—
グルコース	0.97	5.00	1.00	9.00
グリシン	0.48	0.70	0.10	—
クエン酸	—	—	—	0.29
EDTA・2Na	—	—	—	—
トリス	—	—	—	0.565
ゼラチン	0.02	0.10	0.05	—
グリセリン	0.24	—	0.70	—
スルファメサジン Na	—	—	0.05	0.40
ホモズルファミン	0.10	—	0.10	0.20
ペニシリン (U/ml)	900	500～700	—	—
ストレプトマイシン (mg/ml)	900	500～700	—	—
クロールプロマジン-S-オキサトイ	0.008	0.01	0.03	—
CO ₂	飽和	—	適量	—