

IV. ふ卵技術

1. ふ卵

(1) ふ卵器の種類

空気を攪拌するタイプは、ふ卵器内の温度差が無く、卵座を何段も重ねることが出来るので立体ふ卵器と呼ばれている。一方、最近ではあまり使われていないが、空気を攪拌するファンの無いものは、ふ卵器内で温度差が生じるため一段しか種卵が置けないため平面ふ卵器と呼んでいる。さらにふ卵器は、入卵から 18 日目ごろまで使う転卵をしながらふ卵を行うものをセッター、18 日以降に利用するバスケット内でヒナを発生させるものをハッチャーと呼んでいる。一台のふ卵器で上部にセッター部分が、下部にハッチャー部分があるものはコンビネーションタイプと呼ばれる。これに対して、セッターとハッチャーが専門に分かれているものはセパレートタイプと呼ばれている。



昭和式セッター



村井式セッター

(2) ふ卵温度

立体ふ卵器での温度は、ふ卵 18 日目までは $37.6\sim 37.8^{\circ}\text{C}$ 、18 日以降は $37.2\sim 37.4^{\circ}\text{C}$ が良い。ニワトリの場合通常 21 日目で発生するが、温度が高いと早く発生し低いと遅くなる。一般に、純系の発生は遅く、交雑では早く発生する傾向があるので、純系では高めに設定し交雑では低めにする方が良い。胚の発育が進むにつれ種卵は自温が出てくるため、設定温度よりも種卵の周囲の方が若干高くなる。そのため、大型ふ卵器に多くの種卵が入った場合は温度を低めに設定し、逆に 1000 個程度までの小型ふ卵器では、自温があまり上がらないので 19 日以降も $37.4\sim 37.6^{\circ}\text{C}$ にする。コンビネーションタイプの場合でセッター部分とハッチャー部分に種卵がある場合は 37.6°C に設定する。平面ふ卵器の場合は、ふ卵 18 日目までは種卵の上面の所の温度 $39.0\sim 39.5^{\circ}\text{C}$ 、18 日以降は $38.0\sim 38.5^{\circ}\text{C}$ に調節する。

（３）ふ卵湿度

ふ卵 18 日目までは 55～60%、18 日以降は 60～70%が良い。一般に、低めの湿度で発生させると、ふ化率は若干悪く体は小さいが臍閉まりの良い元気の良いヒナが発生し、湿度が高すぎた場合は、ふ化率は良いが臍閉まりの悪い柔らかいヒナが発生する。湿度があまりにも高いと死籠卵が増加するのでセッターでの湿度には注意する。ただし、ふ卵 20 日目ごろ一斉に嘴打ちが始まると一時的に高湿度になるが、このことによってふ化がさらに促進されるので無理に湿度を落とす必要はない。ハッチャーに移してからドアを開けると湿度が低下しふ化率も低下するのでヒナ出しまで開けない。

（４）換気

ふ卵に最適な酸素濃度は、21%であり空気中の酸素濃度と同じである。酸素濃度が 1%低下すると 5%ふ化率が低下すると言われている。二酸化炭素濃度は、0.5%以下が良いとされ 1%以上になるとふ化率は低下すると言われているが、発生が進むにつれ二酸化炭素濃度に対する抵抗性は強くなると言われており、1%以下であれば大きくふ化率が低下することはない。ふ卵後期にはある程度の二酸化炭素濃度も必要なため、換気口はふ卵器に入っている種卵個数を考慮して開ける。換気口が適正に開いていないと卵からの自温によりふ卵温度が上昇しすぎてふ化率は低下し、早めに大きく開けすぎても湿度の低下でふ化率は低下する。発生前の湿度と換気によってふ化率とヒナ質が大きく左右されるため、発生前のヒナの鳴き声や湿度の変化等からヒナの発生具合を推測して換気口を調節する。換気口の調節によってふ化率とヒナの質に影響がでる。



貯卵室内の貯卵棚
昭和フランキの卵座用に作製



貯卵室内の貯卵棚
卵座には系統名を記入

2. 貯卵

貯卵期間が長くなるほどふ化率は低下するため、一般コマーシャル鶏のふ化場の貯卵期間は3～4日間が普通であり、系統造成を行っているところでは、2週間程度の貯卵が行なわれている。

(1) 貯卵温度

種卵は、28℃以下にすることで胚が休眠状態に入る。貯卵温度の適温は貯卵期間によっても異なり、貯卵期間が3日以内の場合は18～30℃、4～7日の場合は16～17℃、7日以上の場合は10～12℃が良いとされる。

(2) 貯卵湿度

種卵の水分蒸散が過ぎるとふ化率は低下するため、従来は長期間貯卵を行う場合は70～80%の湿度に保つと良いと言われてきた。しかし、最近の調査では、80～90%の方が高いふ化率が得られることが判った。加湿器の水滴が種卵に直接当たらないことも重要である。湿度は、乾湿温度計や自記温湿度計、電子湿度計など湿度計によっても値が異なり、高湿度になるほど差が出る傾向にある。自記温湿度計では80%程度が望ましいと思われる。貯卵期間が3～4日と短い場合は、湿度をあまり高くする必要はなく、細菌の増殖を抑えることも含めて65～75%程度の湿度にする。また空気の流れは種卵を乾燥させる働きがあるため、貯卵中には種卵に直接強い風が当たらないようにすることも重要である。種卵表面の細菌増殖を防ぐため種卵の消毒は重要である。

(3) 貯卵中の種卵の向き

ふ卵する際には鋭端を下にするため、貯卵も種卵の鋭端を下にするのが普通である。しかし、1週間以上貯卵する場合は鋭端を上にして貯卵する方がふ化率は高い。鋭端を上にして貯卵したものはどの貯卵日数でも卵黄が種卵の中心部に位置していたが、鋭端を下にしたものでは貯卵日数の経過にともない卵黄が気室側に移動し28日間貯卵したものでは卵黄が卵殻膜に接触するものも見られたとしている。Remanoff(1960)は、貯卵中の胚の位置関係について調べたところ、鋭端を上にして貯卵した場合、胚の位置は卵黄の赤道部に安定しているが、鋭端部を下にした場合は胚が様々な位置へ移動していると述べている。以上から鋭端を上にして貯卵した方がふ化率は良いとされているが、入卵時に鋭端を下にする必要があるため実際にはあまり行われていない。

貯卵中に転卵を行うことも、1週間以上の貯卵であれば効果があるとの報告もある。しかし、種卵は横や斜めに置くと卵黄が卵殻に近づき接触するものが出るため、転卵によって癒着は防げるかもしれないが必ずしも良い方法では無い。

村井ふ卵器を使用する場合の貯卵



① パレットの上にふ卵器用の卵トレーと種卵をのせる。



② トレーをのせたパレットをセッターの台車へ入れる。



③ パレットごと入れたところ。



④ パレットだけを抜き取る。



⑤ 種卵をセットしたところ。系統や試験区分等により卵座の色を分けて区別する。



⑥ 台車には試験区分等が分かりやすいように紙を貼っておく。

(4) 予備加温

ふ化率を上げるため予備加温を行っているが、大きく分けて3つの方法がある。1つは、貯卵前に加温する方法、2つ目は貯卵中に加温する方法、3つ目は入卵前に加温する方法である。貯卵前に加温する方法は、37.6℃で6～9時間加温したのち貯卵室で保存するというものであり、貯卵温度15℃ではふ化率は改善されるが11℃保存では逆に低下する。貯卵中の予備加温は毎日または1日おきに37.6℃で30分～4時間加温するというもので、こちらは実験的にしか行われていない。入卵前の予備加温は一般に行われており、入卵前に21～23℃で一晩(18時間)加温する方法で、実際にはセッター室で一晩おくことが行われている。

(5) 長期貯卵

クリオバック(厚手の機密性の高いプラスチック袋)に種卵を入れて保存することが、多くの研究者によって行われてきた。ポリエチレン袋に入れて空気を抜くと良いとの報告もあったが、袋に入れることにより水分の蒸発が抑えられたことが、大きな原因であったようであり、ReinhartとHurnik(1982)は22～28日間の貯卵で、クリオバックを用いた貯卵と高湿度(90～92%)の貯卵に差がなかったとしている。しかし、通常の加湿器でこのような高湿度にすると室内が霧状態となり、種卵が結露を起こしやすい問題もあるため、対策としてダンボール製の鶏卵輸送箱に詰めてから室内を高湿度にすると、種卵は結露を起こさずに保存が出来る。ダンボール製の箱を用いる方法は、風が種卵に直接当たらないことから水分の蒸発を抑える効果があるほか、箱ごと逆さにすれば種卵の向きを変えるのも簡単に行える。袋へのガス充填も検討されており、窒素ガス充填で効果があったとされている。窒素ガス充填によって5%の酸素濃度で4週間貯卵して、1週間貯卵とふ化率はあまり変わらなかったといった報告もあるが、酸素ガスや炭酸ガスの充填は逆の効果がありふ化率は低下する。



低温室



ダンボール箱に種卵を詰めて、逆さにして貯卵している状態。

3. ふ卵管理

(1) 集卵

種卵は、暑い場所や寒い場所に放置するとふ化率が悪くなるので、ふ卵舎に早く運ぶ。温度が高いと発生がある程度進み、適温でないと発生途中で死亡し中止卵となる。また、適温であっても発生が進んだものを貯卵温度に落とすと胚は死亡する。低温では5℃程度であれば2～3日の保存がきくとされるが5℃以下ではふ化率は低下し、卵が凍ると殻が割れるため種卵には適さなくなる。

(2) 種卵選別

基本的に汚卵は種卵には用いないため、ケージやネストの卵受けは清潔に保つ。ふ卵舎では、正常卵と異常卵を区別し異常卵は種卵としない。また、産卵初期の小卵も種卵に用いない。

(3) 種卵消毒

種卵消毒をして貯卵室に運び種卵は鋭端を下にして貯卵する。消毒後の種卵をさわる前には、手指の消毒を必ず行う。種卵消毒は、ホルマリン薫蒸や逆性石鹼溶液による浸漬消毒が一般的であるが、実験などで少しの種卵を扱う場合はアルコール消毒も行われる。逆性石鹼溶液で浸漬消毒を行う場合は、必ず43℃程度のお湯で3分間行い、浸漬後は素速く乾かす。種卵に水を浸けた状態が続くと、水が雑菌と一緒に卵内に浸透するのでふ化率が低下する。この程度のお湯の場合は、気室内の空気も膨張することもあり卵の中へ浸透しにくく、お湯から上げた後も早く乾燥するため、浸漬時間が3分程度であればふ化率への影響はない。浸漬消毒はクチクラ層が剥がれ保存期間の経過に伴う卵質の劣化が早く進むため、長期貯卵を行う場合はホルマリン薫蒸を行う。



卵トレーを5段重ねて籠に入れた状態



籠ごと消毒液の中に浸漬

（４）入卵

ふ卵器の使用には、まず洗浄と消毒を十分行ったのち試運転を行い、温度・湿度の正確性について標準温度計などを利用して十分に点検し、その他の機械の全てについて十分に点検を行っておく。そして、ふ卵を開始する数日前からふ卵器は作動させ、温度・湿度を一定にしておく。

種卵には、系統名など必要事項を記入しておき、鈍端を上にしてセッターの卵座に並べる。系統が変わるときは、境が明確に分かるように工夫する。発生させるヒナが交雑か純系か、自場でえ付けするか外部へ送るかなどを考慮して、入卵時刻を定めて入卵を行う。入卵したら、すぐに自動転卵装置を作動させ、正確に作動しているか以降点検を行う。



昭和ふ卵器への入卵

（５）検卵

受精率を調べるため、また無精卵や中止卵を取り除くために検卵器による透光によって行う。無精卵や中止卵を除かずに発生までふ卵を行うと、緑膿菌が増殖し爆発卵となり鶏群全体を汚染してしまう。以前には、1回ふ卵での2～3回検卵していたが、検卵回数が増加するほどふ化率は低下することから、現在の検卵は通常1回行われる。検卵の時期は、ふ卵開始後10～11日目に行う場合と、ハッチャーに移す18～19日目に行う場合とがある。

検卵作業は暗室で行い、検卵器を卵の鈍端に当てて透視する。検卵器の種類によっては、卵を検卵器の上にのせて透視する場合もある。10～11日目の発育卵は赤みをおびており胚が見え四方に血管がのびている。血管の発達によって気室との境が明確に見える。赤玉の場合は、胚や血管が明確ではないので気室で判断する。無精卵は、中心の卵黄の部分がやや暗く、全体的に明るく見える。また、血管が無いため気室の境が不明瞭となる。中止卵は、卵の下の方が暗く、血管の発達が見られず、一部または全体に血の輪が見られる。血管が発達する前に死亡したものは、発育すると卵黄が膨化して上部に浮くことから、上から検卵器を当てると下の方が暗い影に見える。18～19日目の発育卵は、気室が非常に大きくなり、ほとんど真っ黒に見え、胚の動きが認められ、中止卵は、胚の動きが認められない。



検卵作業

セッター室の電気を消して、検卵を行う。



受精卵

血管が走っており、うっすらと胚の目が見える。気室の境が明瞭に見える。



中止卵

上から光を当てると、下側が暗く上が明るくなる。中央に血の帯が見えるものが多い。



無精卵

全体的に明るく見える。血管が走っていないので気室の境が不明瞭。中心部がやや暗い。

（６）ハッチャー移し

18～19 日目でふ卵器をセッターからハッチャーに移す。このことを移卵または、下卵と呼んでいる。コンビネーションタイプのふ卵器は、発生座が下段にあることから、下卵という言葉が使われた。



① 個体ふ化の場合は、母家系ごとに仕切りをして発生座（バスケット）に入れる。



② 卵は横置きにする。あまり窮屈にいけないこと。どうしても多く入れなければならない場合には、鋭端を下にして立てる。



③ 台帳を記入しながらの移し替え作業



④ 発生座をハッチャーへ入れる

(7) 発生作業



① ヒナが発生した発生座



② ヒナ取り出し作業
家系別にヒナを出し、翼帯を足に巻く。10～13日齢で翼に付け替える。



③ 鑑別作業
鑑別師による肛門鑑別



④ ひな選別作業
翼帯番号表に印を付けながら、家系ごとに一定の羽数を選別する。



⑤ 断冠作業
雄はトサカをハサミで切る。



⑥ ワクチン接種
マレックワクチンを頸部皮下注射する。

(8) 加温処理技術（マイコプラズマ対策）

マイコプラズマ・ガリセプチカム（MG）およびマイコプラズマ・シノビエ（MS）は、養鶏業界に多大な経済的被害をもたらす疾病の病原体である。マイコプラズマは消毒薬、熱により比較的容易に不活化されるが、生体内にある場合には耐性化等により薬剤が効きにくいいため、投薬のみでの清浄化は非常に困難だと言われている。

種卵の加温処理は、介卵感染したマイコプラズマを約 46℃の温度で殺滅する技術で、種卵に理論通りの温度負荷がかけられれば、かなりの成果が期待できる。しかし、実際にこの技術を応用する場合、病原体と胚の死滅温度が近いことから、ふ化率を下げずに卵内温度を殺滅効果が期待できる温度にすることが非常に難しい。また、孵卵器内の温度分布が不均一であることが、その困難さに拍車をかけている。

Yoder の実験によると、MG および MS を不活化するには 45.8℃の加温処理が必要だが、卵内温度が 47℃付近になると、一気にふ化率が低下する。AS-10 型加温処理機能付セッター（昭和フランキ製）では、最高設定温度を 46.5℃とし、段階的に温度負荷をかけていく。実際の卵内温度は 45.8℃～46.3℃まで上がり、ふ化率の低下を最小限に抑えることができる。



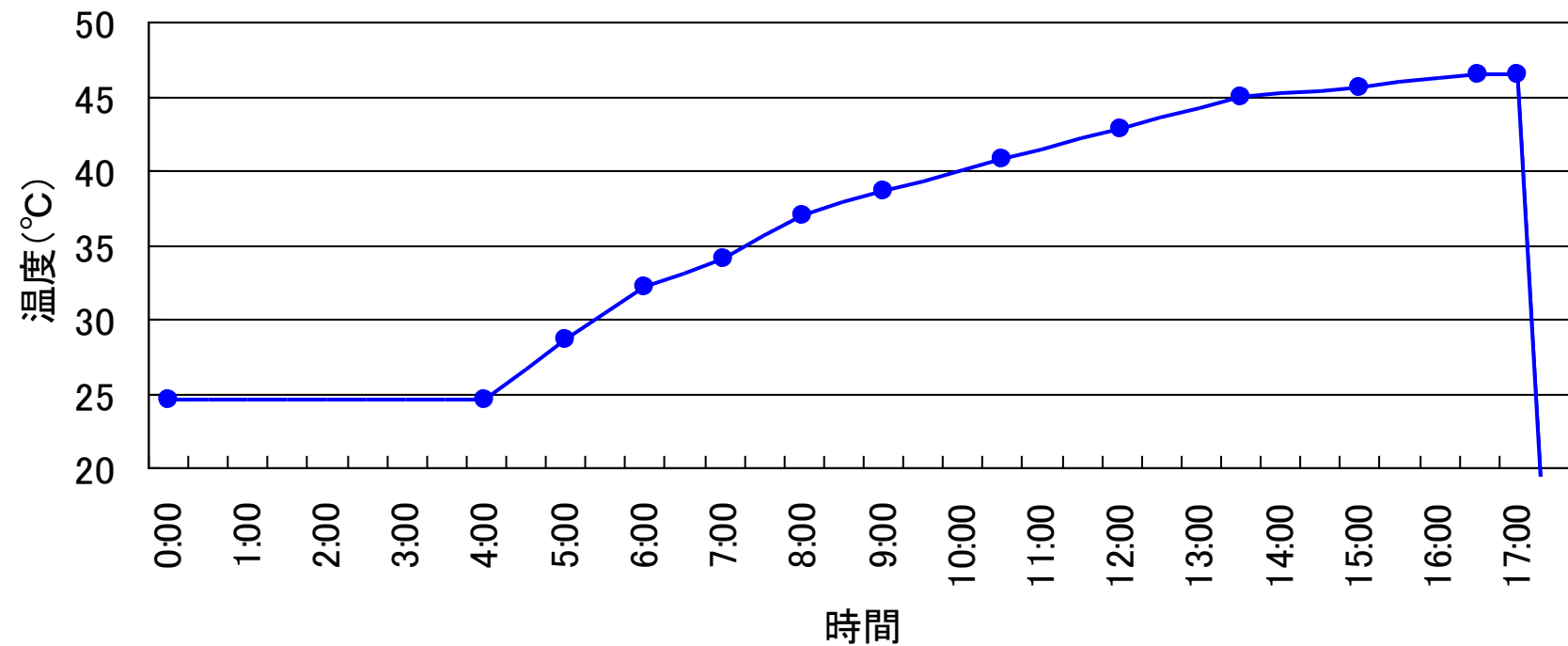
昭和フランキ製セッターの調節部分
赤丸部分が温度プログラムの調節部
ふ卵器内には、補助ヒーターを設置する。



村井ふ卵器に加温処理調節部を設置
加温処理調節部は、昭和フランキ製。
この場合もふ卵器に補助ヒーターを設置。

岡崎牧場での加温処理プログラム

ステップ°	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	積算時間
温度	24.6	24.6	28.6	32.1	34.1	37	38.6	40.7	42.8	44.9	45.6	46.5	46.5	0	
時間	0:00	3:50	1:00	1:00	1:00	1:00	1:00	1:30	1:30	1:30	1:30	1:30	0:30	0:10	17:00



家禽各種のふ卵日数と検卵・移卵日

家禽名	卵重 (g)	ふ卵日数 (日)	検卵日	移卵日
ニワトリ	45-70	21	7-10	18
シチメンチョウ	70-120	28	10-12	25
ウズラ	11-17	16-18	行わない	14
ホロホロチョウ	50-55	28	12	24-25
アヒル	70-90	28	10	25
バリケン	70-90	34-35	12	32
ガチョウ	120-200	30-33	9-10	27
ダチョウ	1500-1900	40-44	7	35

家禽各種における最適貯卵条件

家禽名	貯卵条件			
	貯卵日数 (日)	貯卵温度 (℃)	貯卵湿度 (%)	貯卵中の転卵
ニワトリ	1-3	20-25	75-80	行わない
	4-7	15-17		
	7-10	14-16		
	11-14	10-12		
シチメンチョウ	1-4	21-24	80	行わない
	5-9	13-15		
	10-14	10-13		
ウズラ	10	13-15	75	行わない
ホロホロチョウ	7	12-15	75-80	行わない
アヒル	10	13-15	70-80	3-4 回／日
バリケン	10	13-15	75-80	3-4 回／日
ガチョウ	10	13-15	70-80	3-4 回／日
ダチョウ	7	15	75	3-4 回／日

家禽各種における最適ふ卵条件

家禽名	ふ卵条件			
	セッター		ハッチャー	
	ふ卵温度 (℃)	湿球温度 (℃)	ふ卵温度 (℃)	湿球温度 (℃)
ニワトリ	37.6-37.8	28.3-30	36.9-37.2	30-33.3
シチメンチョウ	37.4-37.5	28.3-30	36.9-37.2	30-33.3
ウズラ	37.5-37.8	30-31	37.0-37.4	30-33.3
ホロホロチョウ	37.7-37.8	28.8-29.4	36.8-37.2	30-33.3
アヒル	37.2-37.5	30-31	37.0-37.2	31-35
バリケン	37.2-37.4	30-31	37.0-37.2	31-35
ガチョウ	37.5-37.6	28-29	37.2-37.3	32-35
ダチョウ	36.0-36.5	20-25 (%)	35.5-36.0	70-75 (%)

脇道コラム 卵は何度で固まるか？

卵白は 56℃くらいから粘度が上がり、58℃で白濁状態になり、62℃でゼリー化し、80℃で完全に熱凝固します。卵黄は 64℃くらいから粘度が増加し、70℃で完全に熱凝固します。液卵をだし汁で薄めると凝固温度が変わり、3 倍に薄めると凝固温度は 85℃以上になり、7 倍に薄めると固まらなくなります。卵黄は凍結した場合でも固まります。

ゆで卵を作る場合、新鮮卵であれば気室が小さいため冷えた卵を熱湯に入れても割れませんが、古い卵は気室が大きいため空気の膨張が大きく割れて卵白が外に出てしまいます。新鮮卵の場合は熱湯にいきなり入れた方が、卵の殻が剥きやすくなります。

脇道コラム ゆで卵の卵黄の色

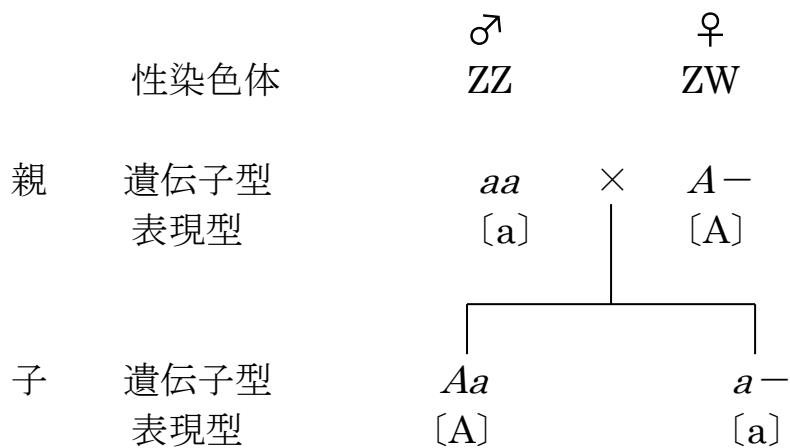
ゆで卵を作ると、卵黄の周りが緑色っぽく変色することがあります。これは卵白に含まれる含硫アミノ酸に熱が加わることで変成し硫化水素が産生され、これが卵黄に多く含まれる鉄分と結合し、硫酸鉄（Ⅱ）（旧名：硫酸第一鉄、化学式： FeSO_4 ）という青緑色の物質が出来ることによります。これが卵黄の色と混ざって緑色に見えるわけです。卵白からの硫化水素が原因のため卵白に接している卵黄の外側だけの変色します。長時間高温でゆでるほど変色しやすく、古い卵ほど硫化水素が出やすいと言われます。防止法としては、長時間熱を加え続けないことなので、ゆで時間は 10 分程度として、すぐに水で冷やすと防ぐことができます。

脇道コラム ホルマリン薫蒸

濡らすことが出来ない部分や、通常の消毒では隅々に行き届かない場合などの消毒法としてホルマリン薫蒸があります。種卵消毒ではホルマリン薫蒸を行っているところも多いと思います。以前は過マンガン酸カリによる薫蒸が行われていましたが、汚染の問題があり過マンガン酸カリを用いているところは今では聞かなくなりました。最近では過マンガン酸カリの代用として晒し粉による薫蒸消毒が行われています。晒し粉の粒の状態によってガス発生の状態が異なることから、ホルマリン薫蒸用に開発された晒し粉錠剤が日本曹達株式会社より「マイトレス」という商品名で販売されています。直径 3cm、厚さ 1.6cm、重さ 20g の錠剤です。薫蒸する空間 1m^3 当たりホルマリンを 40ml、マイトレス 1 錠（20g）で、密閉された空間で 24 時間薫蒸するのが基本ですが、種卵消毒の場合は 20 分とします。ガス発生は 10 分程度で出尽くす程度のスピードで、混合時の容積膨張も過マンガン酸カリを用いるよりは少ない様です。種卵消毒の場合は、一気にガスを発生させる必要があるので、マイトレスの錠剤を米粒から小豆大に砕いてから投入すると一斉にガスが発生します。ガスを発生させるときの容器はホルマリンの 5～6 倍の大きさが良いようです。晒し粉によるホルマリン薫蒸は、塩素も発生するため金属は錆びやすくなります。

4. 羽毛鑑別

鶏の性染色体は雌がヘテロの ZW 型なので、羽毛鑑別を行うには伴性（はんせい）遺伝子を利用して、Z 染色体上の遺伝子が、雄親では劣性遺伝子をホモに、雌親では優性遺伝子を持たせれば鑑別が可能となる。代表的で実際に用いられているものとしては、遅羽性遺伝子（K）、銀色遺伝子（S）、横斑遺伝子（B）がある。いずれも優性遺伝子。

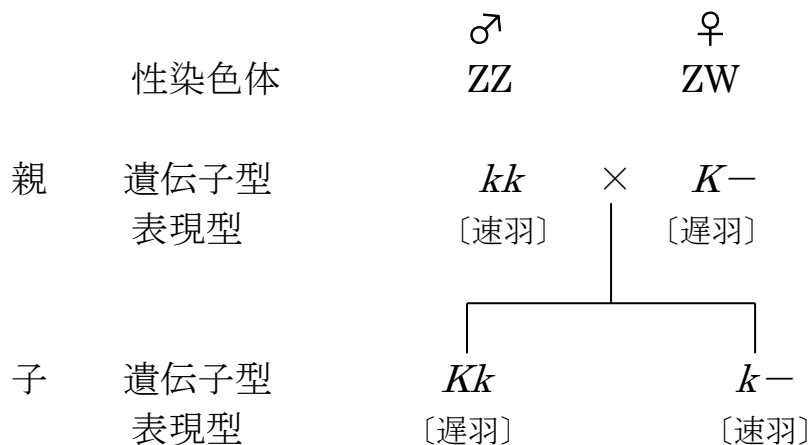


羽毛鑑別を行う場合の交配方法

必ず雄を劣性ホモ、雌を優性遺伝子を有するようにして交配する。遅羽性、銀色、横斑など全て同じ。この方法でふ化したヒナは、表現型が親とは逆になる。

(1) 遅羽性遺伝子

遅羽性とは通常の速羽性よりも羽が生えるのが遅いもので、発生時点では速羽が下羽（主翼）が上羽（覆主翼）よりも太く長く伸びているのに対し、遅羽は下羽が上羽と同じ長さあるいは上羽よりも短い。発生後 10～12 日目頃では、速羽は尾部の羽が生え替わっているが、遅羽ではまだ尾部の新しい羽は生えていない。遅羽性遺伝子は羽色との関係は無いので、羽色での鑑別が出来ない優性白（*I*）を持つ白色レグホーンの交配に特に用いられている。遅羽性には常染色体上で劣性遺伝をする遅羽性シリーズ（*t* シリーズ）もあるため、この遺伝子は *T* のホモに固定しておく必要がある。雄親を速羽（*kk*）、雌親を遅羽（*K-*）として交配すると子供は、雄が遅羽、雌が速羽となる。



(2) 銀色遺伝子

銀色といっても羽色は白色で、茶色の羽色を白色に変える遺伝子。最近の赤玉のコマーシャル鶏では、茶色の羽装のロードアイランドレッド（RIR）の雄と銀色遺伝子を持つ白色ロック（WR）の雌の交配が行われる。WR には常染色体上の優性白（*I*）や劣性白（*c*）を持っている系統もあるので、これで鑑別を行う WR は *iiCCS(S)* に固定しておく必要がある。コマーシャル作出に用いられる WR には、黒色の羽色を白くする遺伝子も持っているため、RIR の雄と交配すると頸部と尾部の一部の羽色が白色となる。この WR を横斑プリマスロックや黒色の鶏と交配すると全て刺し毛入りの白色となる。ライトサセックスには黒色を抑える遺伝子がないので、RIR の雄と交配すると雌は RIR と同じ色になる。



速羽

下羽（主翼）が上羽（覆主翼）よりも長く伸びている。速羽の典型的なタイプ。



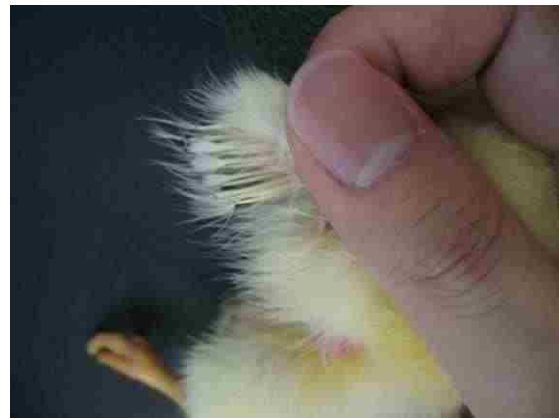
速羽

下羽が上羽よりも長い、伸びが短いタイプ。速羽は下羽の羽軸が太い。



遅羽

上羽と下羽の長さが、ほぼ同じ。遅羽の典型的なタイプ。



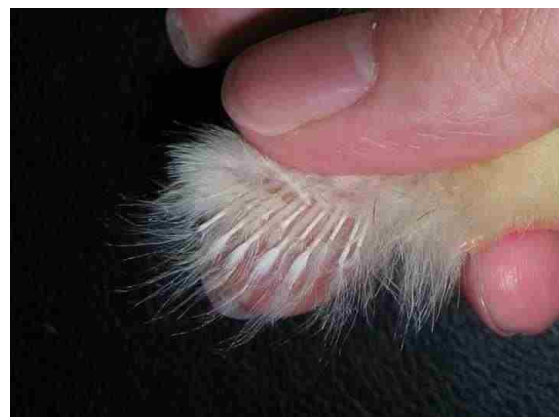
遅羽

羽の先が広がっているが、上羽と下羽の長さがほぼ同じもの。



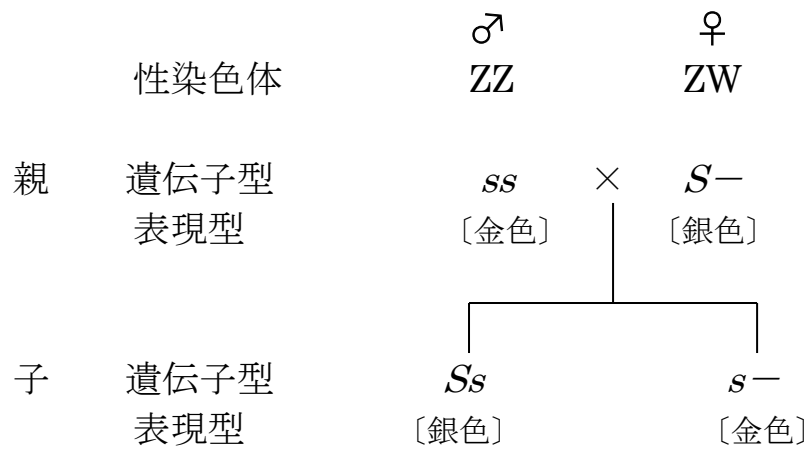
遅羽

下羽が上羽よりも短いもの。一見、速羽に見えるが短いのは下羽で羽軸が細い。



遅羽

上羽と下羽の両方が特に短いもの。



♂

♀

RIR×WR で交配したヒナの色。雄が白色、雌が茶色となる。



♀

背中に茶色のラインが入るタイプ

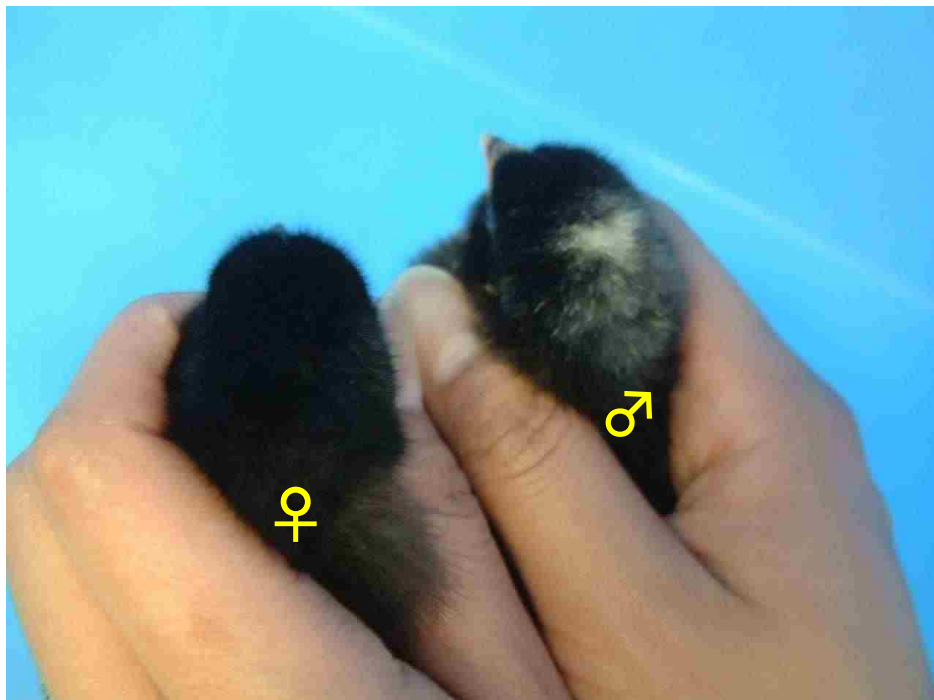
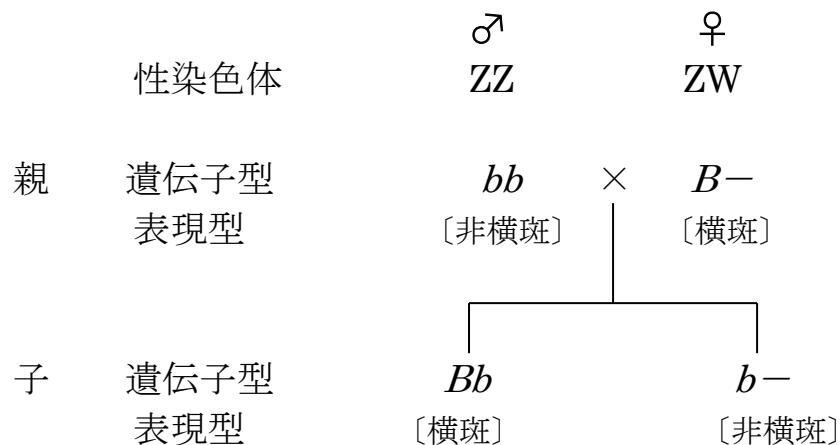


♀

顔だけ茶色いタイプ

(3) 横斑遺伝子

横斑プリマスロック (BP) 等が持つ遺伝子で、黒色や茶色を横斑にする。発生した時点では、横斑ではなく頭のとっぺんに白い斑点が表れる。RIR の雄と BP の雌を交配させると、BP の持つ黒色遺伝子(E)が RIR の茶色を表現させる黒色抑制遺伝子(e^v)より優性のため、ヒナは基本的に黒色となり、頭に白い斑点があれば雄、無ければ雌となる。雌の場合は嘴や目の回りも黒くなる。



RIR♂×BP♀の交配をしたときのヒナの羽装。どちらも黒色羽装となるが、雄は横斑遺伝子を有するため、頭に白斑が現れる。

脇道コラム 羽色に関する遺伝について

羽色には、色々な遺伝子が関与していますが、有名なものとしてまず *E* シリーズがあります。黒色拡張・抑制遺伝子と呼ばれており、常染色体の8つの複対立遺伝子で、優劣関係は $E > E^R > e^{Wh} > e^+ > e^b > e^s > e^{bc} > e^v$ の順です。 e^b は、常染色体上の条斑遺伝子 (*Pg*) と共存したとき雌が弦月型条斑（パートリッジ、外見はギザギザの横斑）となります。

遺伝子 記号	名称	表現型		
		初生ひな	成雌	成雄
<i>E</i>	黒色拡張	黒（腹部白）	黒	黒
<i>E^R</i>	樺色	黒	頭部と頸周りが白 他は黒	濃い野生型
<i>e^{Wh}</i>	優性小麦	淡褐色	赤褐色	野生型（赤笹） 頸部、背部、鞍部（腰と蓑毛）と翼の一部が部位によって濃度が異なる褐色、胸部、腿部、尾部と翼の一部が黒色
<i>e⁺</i>	野生型	頭部と背部に条斑	淡褐色に黒点	
<i>e^b</i>	ブラウン	濃褐色、背部条斑	<i>Pg</i> と共存の時にパートリッジ	
<i>e^s</i>	頭部斑紋	頭部は白尖斑の黒 背部は薄い条斑	赤褐色に粗い黒点	
<i>e^{bc}</i>	バターカップ	痕跡の条斑	赤褐色にしみ状の黒点	
<i>e^v</i>	劣性小麦	茶、表現型は <i>e^{Wh}</i> と全く同じ	赤褐色	

茶色に関する遺伝子は *E* シリーズの他に、以前ジンジャーと思われていたコロンビア斑 (*Co*)、濃い赤褐色にするマホガニー (*Mh*)、ダークブラウン (*Db*) の褐色部分を多くする3つの遺伝子と、褐色をうすくする希釈遺伝子 (*Di*) などの遺伝子が関与して濃い赤褐色になったりバフ色になったりします。雄の場合での赤笹は、これら4つの遺伝子を全て劣性ホモに持ち、*E* シリーズが *e* の野生型の羽装となる場合です。ロードアイランドレッド (*RIR*) ではマホガニー遺伝子をホモに持つので雄は赤笹とならずに赤褐色となります。

白色に関するものでは、白色レグホーン (*WL*) の持つ優性白 (*I*) や一部の白色ロック (*WR*) に見られる劣性白 (*c*) があります。優性白は *E* シリーズなどの羽色に関する遺伝子の全てに上位ですが、*Ii* とヘテロの場合は、*E* を持っていれば黒刺し毛、*e* ホモの場合は体の一部が非常に薄い茶色となります。劣性白は *cc* ホモとなった場合に他の遺伝子がどうであれ白色羽装になります。羽毛鑑別に使える伴性遺伝の銀色遺伝子 *S* は、褐色色素（フェオメラニン）を抑制しますが黒色色素（ユウメラニン）は抑制出来ないといった遺伝子です。全身が黒色羽装の鶏では *S* を持っている場合が多いようで、横斑プリマスロック (*BP*) も *S* をホモに持っている様です。雄が赤笹となる遺伝子型をもっていた場合で *S* を持っている場合は白笹となります。その他に、最近の赤玉コマーシャルに使用される *WR* には、*S* を持っているほか黒色色素を抑制する常染色体上の遺伝子を持っています。ですから、*RIR*♂とその *WR*♀を交配すると子供は雄が白色、雌が茶色となるので羽毛鑑別が出来ますが、この *WR* と *BP* との交配では、雌雄の親をどちらに用いても子供は全て白色で黒刺し毛となるので羽毛鑑別は出来ません。

V. キメラ関連技術

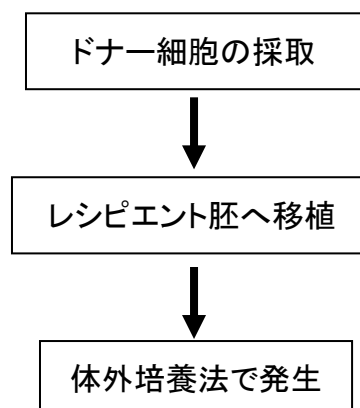
1. キメラの利用

キメラとは、一般に2種類以上の個体の細胞が1個体に混在している状態またはその個体そのものを呼ぶ。定義としては、親が3つ以上（両親の他にもう1つ以上の親が必要）であり、2つ以上の遺伝的に異なった細胞からなる生物個体を指す。

キメラを作製するには、レシピエントにそれとは異なるドナー細胞を入れることでキメラが出来る。作製したキメラの中には、ドナー細胞の一部が生殖系列へ移行するものもあるので、生殖系列をドナー細胞に置き換えることが出来れば、キメラを紹介してドナー細胞由来のヒナを発生させることが可能となり、ドナー細胞を凍結保存すれば牛等の受精卵と同様に半永久的な保存が可能となる。また、この技術の利用によって、産卵率の低い希少品種などもWLをレシピエントにすることで大量に発生させることも可能になる。これらのことから、生殖系列キメラの効率的な作出法が期待されている。

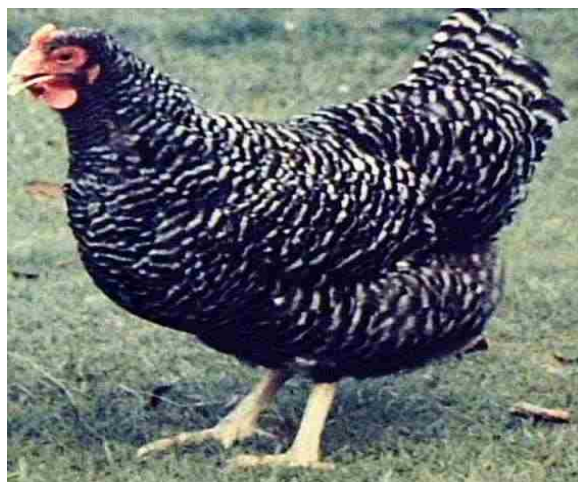
生殖系列キメラの作出には、主に胚盤葉キメラと始原生殖細胞（PGC）キメラの2つがある。胚盤葉キメラは、放卵直後のステージXの受精卵を別なステージXの受精卵に移植（注入）してキメラとなったもので、PGCキメラはふ卵2.5日目の血液からPGCを採取し、別の2.5日胚の血管内に注入してキメラとなったものである。PGCキメラは生殖系列に入る確率が非常に高いが、細胞の収集が効率的ではないこと、PGCは培養が困難であるなどの問題がある。胚盤葉キメラは生殖系列キメラになりにくいですが、ドナー細胞の収集が容易といった利点もある。将来的には、万能細胞とも言われるES細胞やEG細胞を樹立させて、ドナー細胞に用いる方法が取られると思われるが、この場合は胚盤葉キメラの方法で行える。

胚盤葉キメラの作製手順

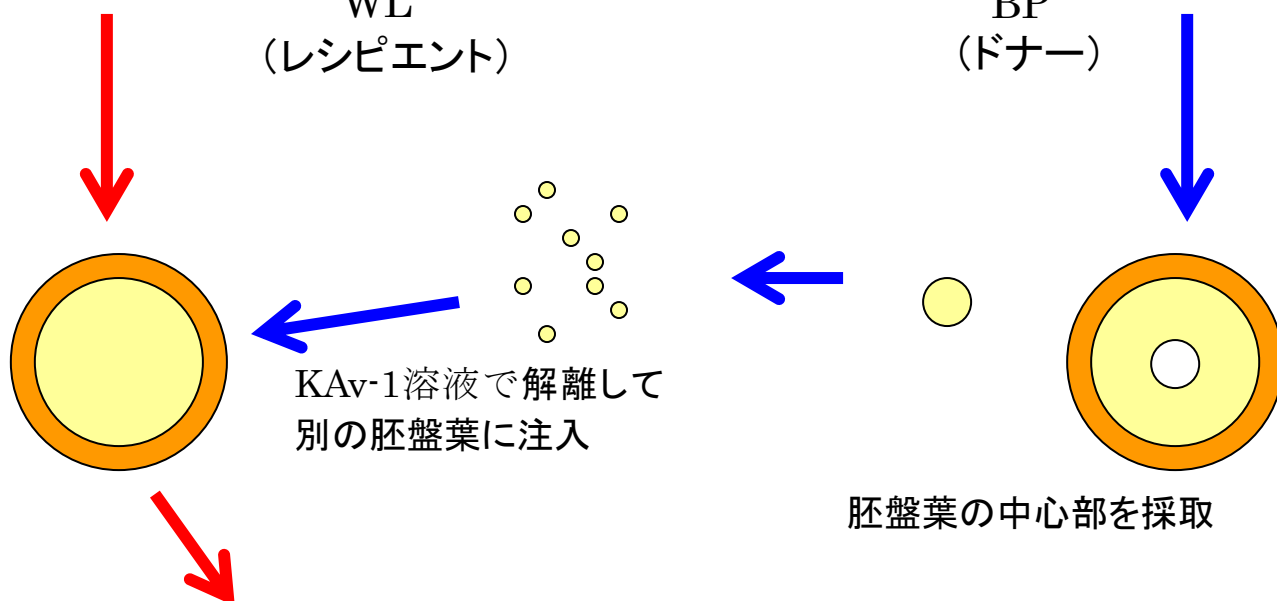




WL
(レシピエント)



BP
(ドナー)



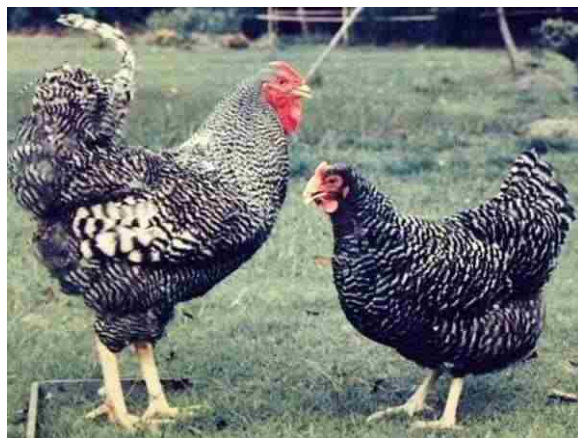
体外培養法



キメラ発生



キメラ鶏 ♂♀



BP ♂♀
(又はキメラ鶏の♂♀)



純粋のBP発生

この場合、作出したキメラとドナーに用いた BP 又はキメラ同士を交配することで純粋の BP が発生する。したがって、ドナー細胞を凍結保存することによって受精卵の保存と同じことが可能となる。

脇道コラム キメラとは

キメラはもともと、ギリシャ神話に出てくる頭がライオン、胴がヤギ、尾がヘビで口から火を吐く怪物キマイラのことで、書いてあるものによっては胴がライオンで、頭がライオンとヤギの2つを持ち尾がヘビというものもあります。胴がヒツジと書いてあるものもありますが、これは雑誌ニュートンで胴がヒツジと誤って書いたため、そこからの引用されたものと思われます。ギリシア神話のキマイラは、リュキアス山に生息していたことになっており、この山は火山でヘビとヤギとライオンが住んでいたということでリュキアス山を擬獣化したものとされています。

生物学では、1913年にウインクラー（H.Winkler）がトマトとイヌホオズキを使って実験的に作り出した接木体をキメラと呼んでから生物学上の術語になりました。雑種との違いは、雑種は2品種の交配であるのに対し、キメラは神話の怪物の様に体の一部が別品種の細胞などに置き換わっているところです。

受精卵に遺伝子導入をした場合や一個体の中である細胞が突然変異を起こすことによって、遺伝的に異なる細胞が2種類以上混ざった状態になったりしますが、この場合は、親が2つの1個体の細胞から成り立っているためキメラとは呼ばずにモザイクと呼んで区別しています。

2. 体外培養法

1細胞期からヒナが発生するまでを、3段階に分けて3つのシステムによって発生させる方法で、Perryによって開発された。このことによって、1細胞期の受精卵に操作を行うことが可能となったため、マイクロインジェクションによる遺伝子導入の試験が可能となった。

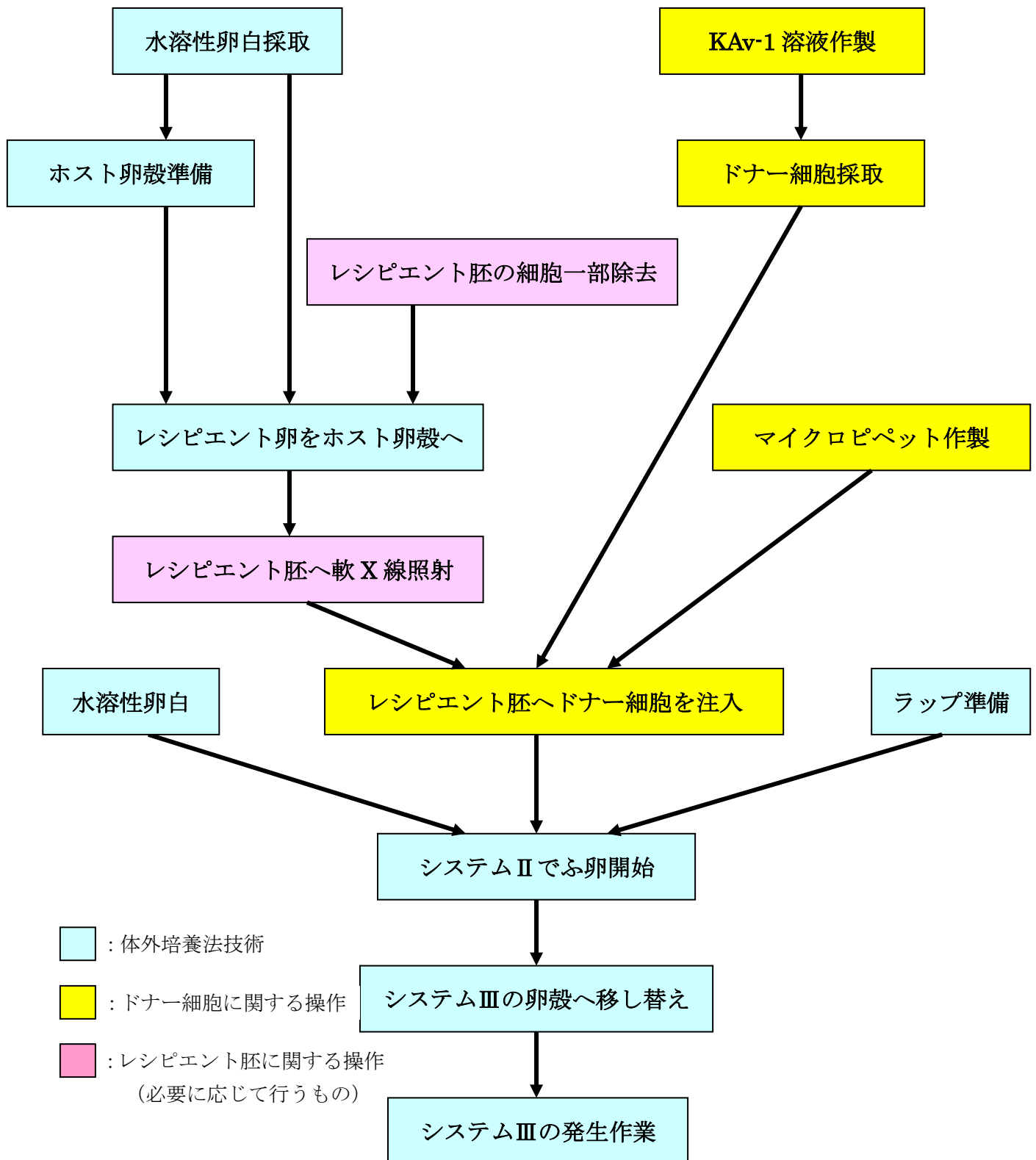
体外培養法は、3つのシステムからなっており、システムⅠは卵管内の発育を代替するもので1細胞期から胚盤葉期までの発育に用いるもの。システムⅡは胚盤葉期からふ卵3日目までの培養で、システムⅢは、ふ卵3日目から発生までを行うもの。胚盤葉キメラの発生にはシステムⅡから行う。

システムⅠ：放卵後2時間45分後（排卵後2時間30分後）のニワトリをネブタールや逆性石けんの静脈注射で薬殺し、卵管ごと切り取り、濃厚卵白がある程度ついた卵を採取する。ビーカーに胚が上になるように入れ、水溶性卵白を胚の位置程度まで入れて41.5℃で1日間培養する。完全に胚がつかると死亡し、濃厚卵白が無いと胚が乾燥して死亡する。

システムⅡ：これ以降卵殻へ移し替えての培養となる。培養に用いる宿主卵殻は鋭端部を切り取り、受精卵を入れ、水溶性卵白で満たし、泡を入れないようにしてラップをかぶせ、特別なリングで固定する。ラップ面を横にして、角度90度、5～15分間隔で転卵を行う。この培養以降、濃厚卵白は無くても良い。ふ卵温度は37.8～38.0℃。この時期に胚が空気に触れた状態が続くと胚の発生は途中（3日目以降）で中止する。

システムⅢ：二黄卵の鈍端部を切った卵殻に移し替えて培養する。ふ卵温度は18日までは37.8℃、それ以降は37.6℃。転卵は角度30度、30分間隔で鳴き声が聞こえるまで行い、鳴き声が聞こえたらラップに少し穴を開け転卵を止める。ヒナがラップに頭をぶつけるようになったらラップをはがし横置きにして自力で卵殻から出るのを待つ。ふ化率は、キメラのために細胞の注入をしなければ約50%。細胞注入を行った場合は20～40%。

3. 体外培養法を用いた胚盤葉キメラの作出方法



胚盤葉キメラ作製作業の流れ図

(1) 水溶性卵白採取



① 水溶性卵白の採取準備



② シャーレに割卵し卵黄を薬サジでシャーレの外に出す。



③ 濃厚卵白をつぶす感じで、濃厚卵白内の水溶性卵白も採取する。濃厚卵白は捨てる。1個の卵から約10ml採取出来る。



④ 採取した水溶性卵白をビーカーに移す。ある程度の量になったら、ビーカーから三角フラスコに移す。



⑤ 三角フラスコに入れて冷蔵保存する。
続けて実験するときは日付を記入する。

(2) ドナーとする胚盤葉細胞の採取方法



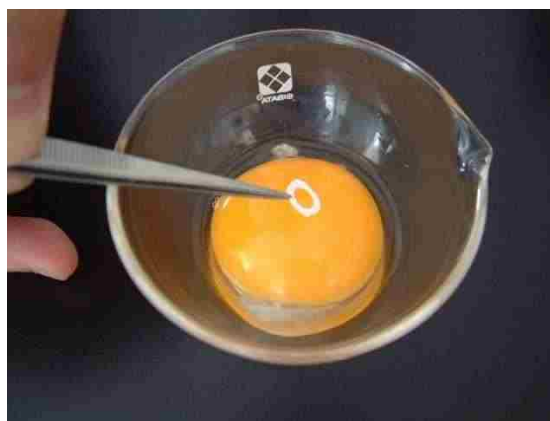
① ドナー細胞の採取準備



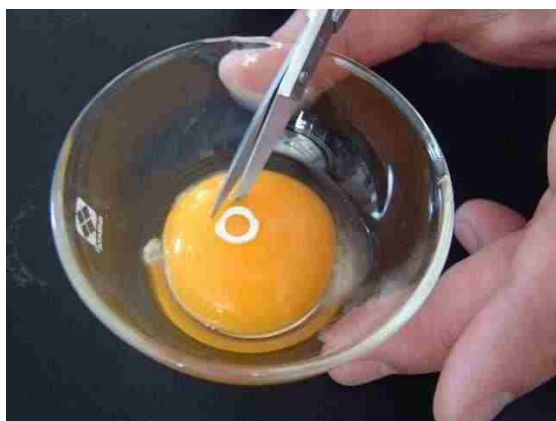
② ガラス製蒸発皿にドナーの種卵を割卵し卵白を除去する。



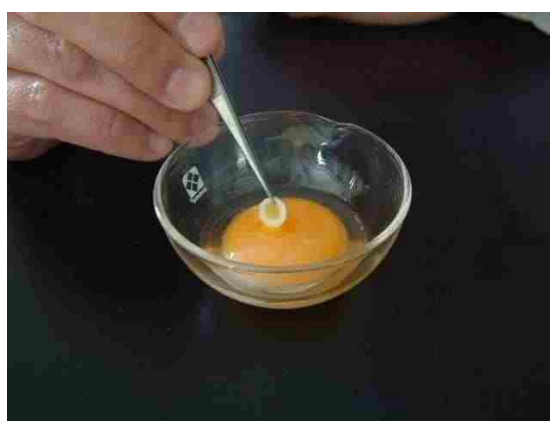
③ 卵白を除去したもの。胚が下に向いた場合は葉サジで胚を真上に向ける。



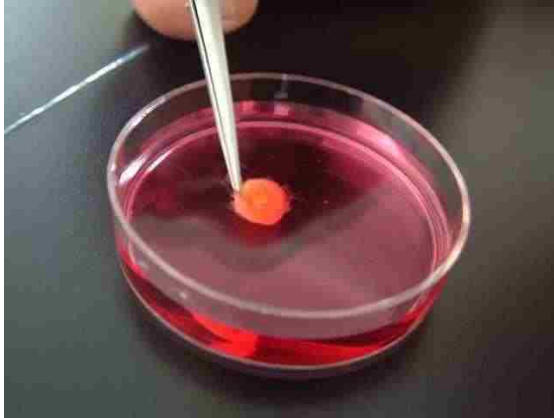
④ ろ紙にパンチで穴を開け周囲を切り取ったものを胚の周囲に被せる。



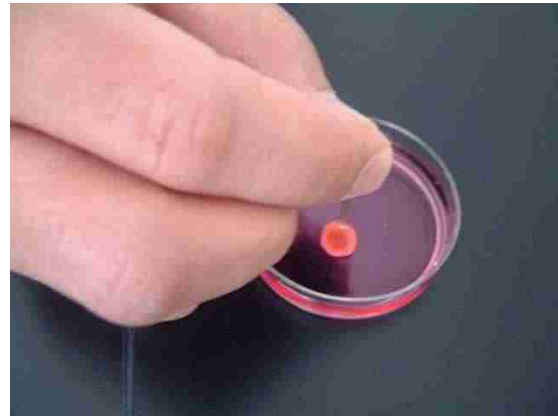
⑤ ろ紙の外側の卵殻膜をハサミで切り取る。



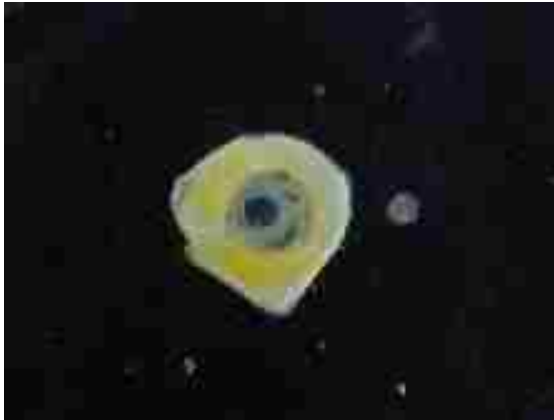
⑥ 卵殻膜をろ紙ごとピンセットでゆっくりと持ち上げる。



⑦ 卵黄面を斜め上にして培養液に沈める。培養液の代わりに PBS でもかまわない。胚の中心部が見えるように卵黄を精密ピンセットでどかす。



⑧ 3cm 程度の長さに切った 0.25ml 凍結精液用ストローを胚盤葉明域の中心部に刺して中心部をくり抜く。



⑨ 胚盤葉明域の中心部をくり抜いたところ。右側の小さな丸い細胞が明域中心部の細胞。これを、KAv-1 溶液を $50\mu\text{l}$ 程度入れたエッペンに移す。



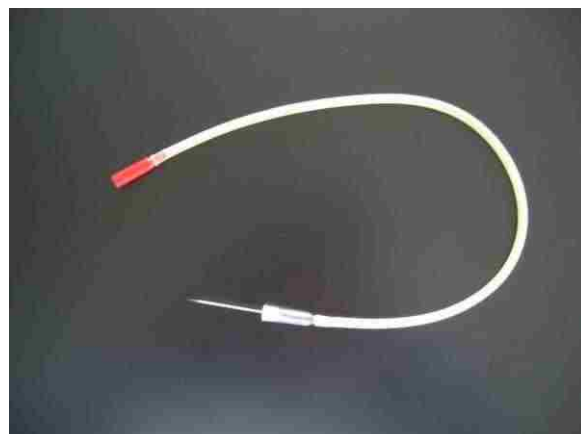
⑩ 集めた細胞は $100\mu\text{l}$ のピペットマンを使ってピペッティングで解離し、200g 5分の遠心を行い上清を除去し、くり抜いた胚 10 個に対し $30\mu\text{l}$ の KAv-1 溶液を 1.5ml サンプルチューブに入れドナー細胞浮遊液とする。

KAv-1 溶液		1000ml 中
グルコース	D-Glucose	1 g
炭酸ナトリウム	Na_2CO_3	1.1 g
2-メルカプトエタノール	2-mercaptoethanol	$15 \times 10^{-5} \text{ M} \quad \div \quad 10\mu\text{l}$
EPPS (HEPPS) ^{注)}		10 mM \div 2.52 g
牛胎児血清 (56°C30 分で非動化済みのもの)		50 ml
ニワトリ血清		50 ml
α -MEM		1000ml にメスアップして濾過滅菌を行う。
注) EPPS : 3- [4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸		
(T.Kuwana et.al Int. J.Dev. Biol. 40 : 1061-1064 (1996))		

(3) レシピエント胚へのドナー細胞の注入



① ナリシゲ硝子管 G-1 を、プーラーを用いて、マイクロピペットを作製する。先端はピンセットで摘んで折る。



② ガラス管で作製したマイクロピペットを吸引チューブ取り付ける。赤い部分を口でくわえて培養液の吸引や注入を行う。ガラスの破片は、PBS や培養液で洗浄する。



③ 実態顕微鏡は、横からライトを当てる。



④ スタンドのプレートを外して、15ml チューブの蓋を逆さに置いて卵の台にする。



⑤ レシピエントの準備が出来たら、22G の注射針で中心部を刺して胚に穴をあける。プレートを外さないとピントが合わない。



⑥ ②の吸引チューブを用いて、ドナー細胞を注入する。ドナー細胞浮遊液の注入量は胚の明域が赤くなる程度。量にして 1~2 μ l、細胞数 500~1000 個。

(4) 体外培養法システムⅡ



① 精密グラインダー。ミニター株式会社（東京）のスタンダードロータリー。ダイヤモンドディスクは、A5134。



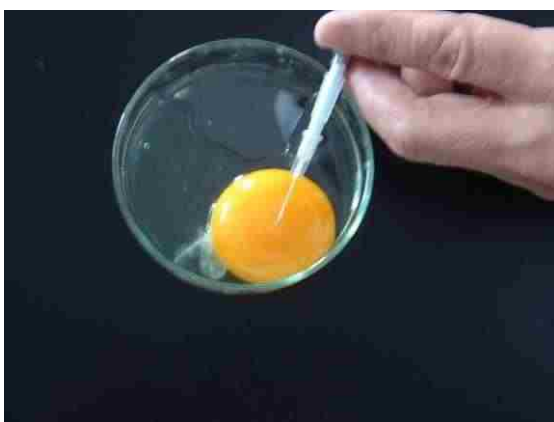
② 培養用の保定リングを用いて鉛筆で線を書き、線に沿って切る。この時、右手の小指で卵の先端を軽く抑え、左手で卵を回して切る。



③ 作製したホスト卵殻へ水溶性卵白を10ml 程度入れて 3.5ml の培養ディッシュで乾燥しないように蓋をする。



④ 培養するレシピエント卵の濃厚卵白を除去して、シャーレに移す。



⑤ レシピエント胚の細胞を除去する場合は、ここで $20\mu\text{l}$ のピペットマンに 27G の注射針を取り付けて行う。



⑥ レシピエント卵黄は、ガラス製蒸発皿に移してからホスト卵殻へ移す。



⑦ 軟X線照射装置 E-3 ソフテックス株式会社 3.5cm 程度の台に 50ml のトールビーカーを置き 20 秒間照射する。これによって胚の発生が約 1 日遅れる。



⑧ 22G の注射針を胚盤葉の中心部に突き刺し、胚に穴を開けておく。これによって、この後の細胞注入が行いやすい。



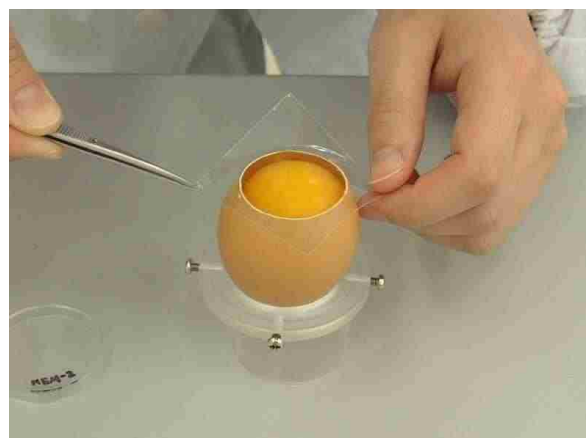
⑨ ドナー細胞浮遊液を胚の明域が赤くなる程度注入する。量にして $1\sim 2\mu\text{l}$ 、細胞数では 500~1000 個。



⑩ そっと水溶性卵白をいれて満たす。ドナー細胞の注入した後は、卵黄への衝撃を出来るだけ与えない。



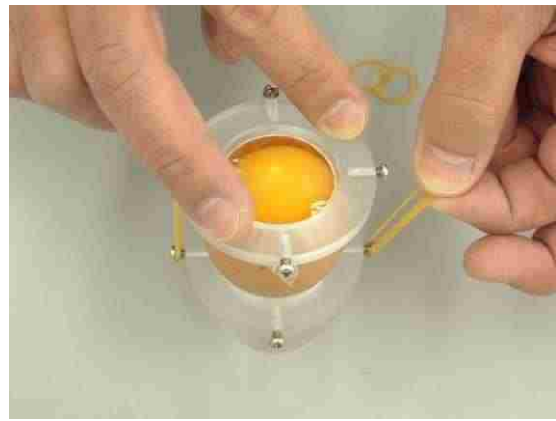
⑪ 菓サジで泡を取り除く。菓サジに付いた泡はキムワイプで拭きながら取り除く。



⑫ 空気が入らない様に、4.5cm 四方に切ったポリエチレンラップをかぶせる。



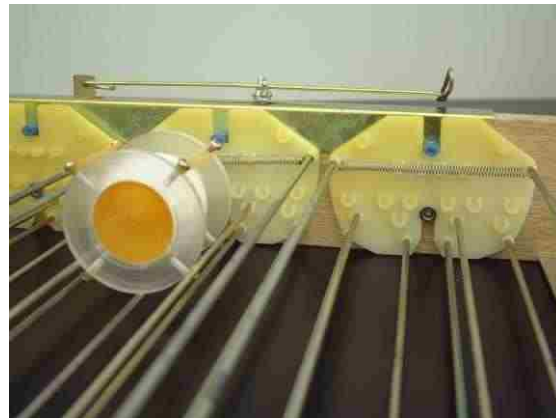
⑬ ラップの上に保定リングを被せて、輪ゴムで固定する。ラップがずれないように左手で保定リングを押さえる。輪ゴムは8番を用い、一ヶ所につき2個用いる。



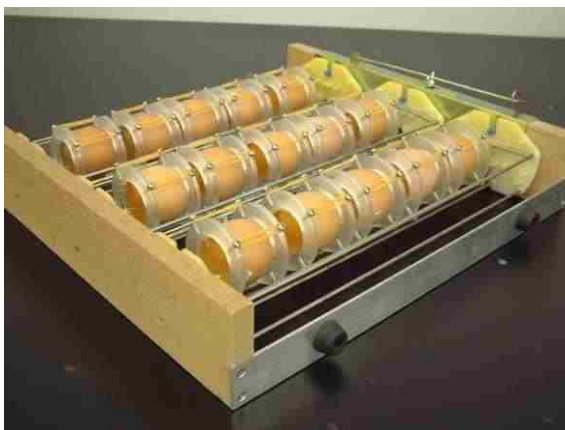
⑭ 保定リングを右手で押さえ直して、左手で輪ゴムを付ける。リングを押さえる指は均等に真下に力かける。保定リングは内径 3.5cm、外径 5.5cm、厚さ 5mm。



⑮ 輪ゴムの固定が完了したら、ラップ面を横にする。



⑯ 昭和ふ卵器 P-008 型の卵座。写真の様に金棒を通すと保定リングのネジの部分で固定される。



⑰ ラップ面を横にして、卵座にセットする。



⑱ 37.8～38.0℃でふ卵する。転卵角度は 90 度、5～15 分間隔で転卵を行う。

(5) 体外培養法システムⅢの卵殻移し替え



① ふ卵3日目の胚



② ラップ面を上にして、保定リングの輪ゴムをはずす。



③ ラップをはがす。



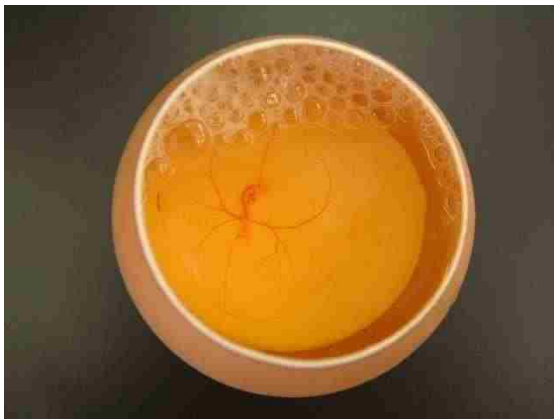
④ 二黄卵の卵殻を被せる。



⑤ クルッと素早くひっくり返す。



⑥ 移し替え完了。



⑦ 移し替え終わったものを真上から見たもの。



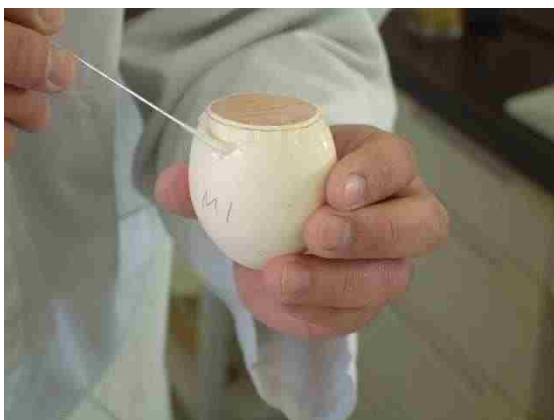
⑧ 薬サジで泡を取り除く。薬サジに付いた泡はキムワイプで拭きながら取り除く。



⑨ 綿棒に水溶性卵白を吸わせ、卵殻の切り口周囲に塗る。流れ落ちない程度に塗る。これがラップの接着剤となる。



⑩ 4.5cm 四方に切ったポリエチレンラップを被せる。



⑪ ラップを貼り付けたあと、隙間が出来るので水溶性卵白を吸わせた綿棒を使って、外側から卵白を吸わせて隙間を埋める。



⑫ P-008 型ふ卵器に入れた所。卵トレーを3つに切断し、裏返して転卵装置にセットする。

(6) 体外培養法システムⅢの発生までの作業



① 昭和ふ卵器 P-008 型

写真は前面の扉がアクリル板のもの。
転卵角度と転卵時間が調節可能。



② ふ卵器内の状況

移し替えてからは、転卵角度は30度、
30分～1時間に1回の転卵を行う。



③ ふ卵7日目

血管が広がり、卵殻膜に達する。



④ ふ卵14日目

血管は卵殻膜に張り付き更に広がる。
このころから羽が生え始める。



⑤ ふ卵18日目

ふ卵開始後18～20日で、転卵を止める。
ふ卵温度を37.6℃に落とす。



⑥ ふ卵20日目

嘴をパクパクして胚呼吸が始まる。
この状態になったらラップに穴を開ける。



⑦ ふ卵 20 日目
ラップに数カ所穴を開けた状態。



⑧ ふ卵 21 日目
卵殻内で、もがいている状態。ラップに羽毛が付いている。



⑨ ふ卵 21 日目
⑧の状態になったら、ラップを外して卵を横向きにする。後は自力で出てくる。



⑩ ふ卵 21 日目
ヒナが卵殻から出てきたところ。しっかりと立つことはまだ出来ない。



⑪ ふ卵 21 日目
発生から数時間たった所。歩いてはしゃがむ行動をとる。



⑫ ふ卵 22 日目
羽が乾燥して、立ち上がって動き回る。

脇道コラム 窓開け受精卵法

(1) 横に穴を開ける方法

まず、卵の横に 5mm 四方の卵殻を切り、内側の卵殻膜は 3mm 四方を切り取ります。胚が穴から見えるので、ドナー細胞の注入等の操作が行えます。操作後は別の卵殻から切り取った 5mm 四方の卵殻で塞ぎ、水気をふき取り、5mm 四方の卵殻で塞いだ後で、その上から 8mm 四方の卵殻を瞬間接着剤で貼り付けます。卵殻によっては隙間ができるのでいくつも作っておいて合うものを用いるようにします。ふ卵器内で窓の部分をしばらく上にして接着剤を乾燥させた後、穴の部分を下にして横向きにした状態で 10 日間転卵を行い、以降は穴を下にした状態で転卵を止めます。ふ化率は 50%程度です。

(2) 鋭端部に穴を開ける方法

ふ卵 2.5 日目、始原生殖細胞 (PGC) の注入を行うのに用いられている方法です。まず、鋭端部に直径 2cm 程度の穴を開け、PGC の注入を行ったあと転卵しても零れないように卵白を少し抜き取り、穴を上にして幅の広いセロハンテープで封をして体外培養システムⅢの様に転卵角度 30 度でふ卵します。ヒナは自力で卵殻を割って出てきます。

レシピエント胚の細胞一部除去

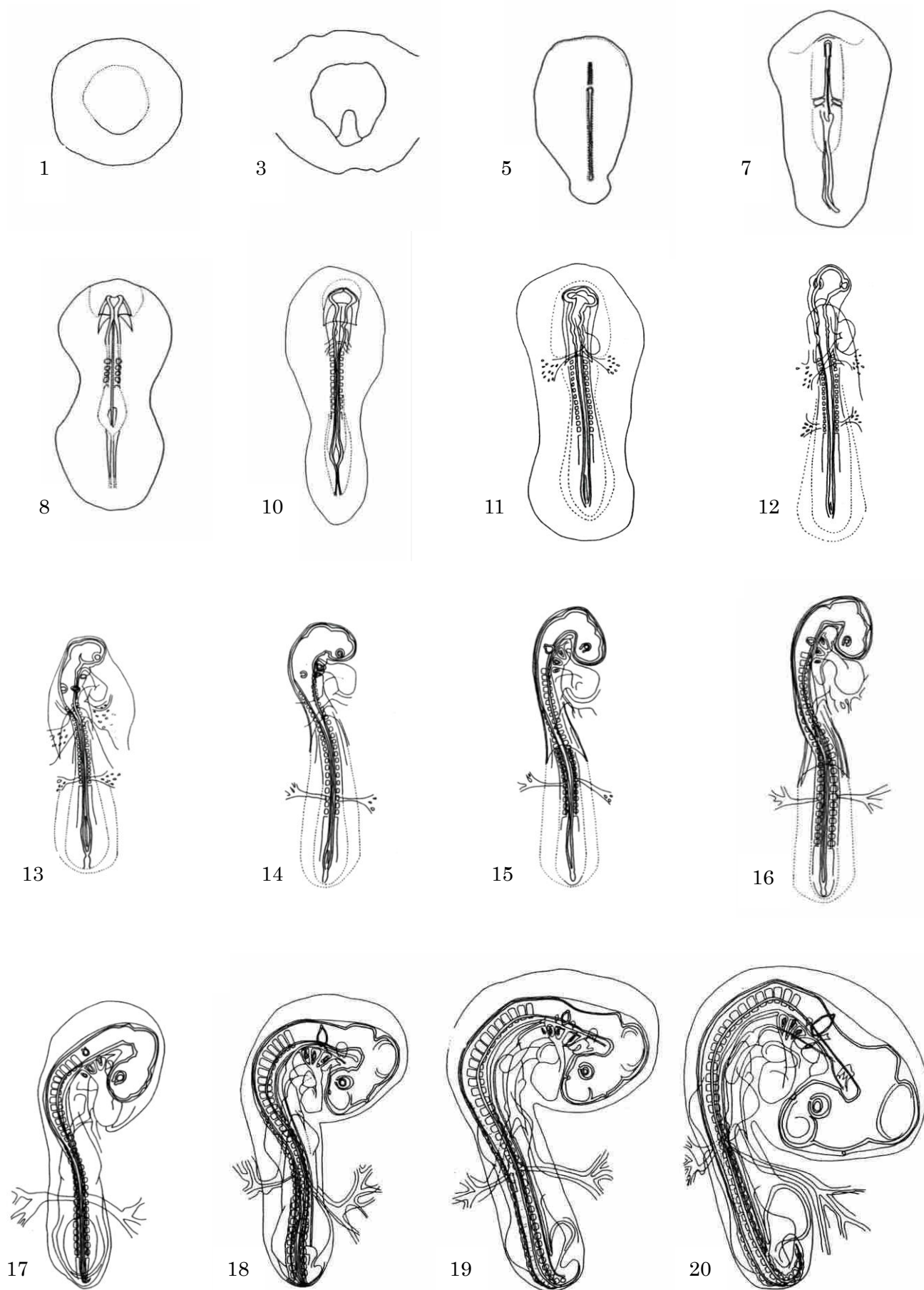
キメラを作出するために必ずしも必要ではありません。レシピエント胚の中央に PGC の前駆細胞が存在すると思われることから、胚盤葉中心部の細胞を抜き取ることが行われています。しかし、私どもが中心部を抜き取ると胚が 2 つに分断され双子になって発育し、発育途中で全て死亡します。また、中央より端の細胞を抜き取ることも行いましたが、やはりふ化率は著しく低下します。それでも今回の方法で加えたのは、ドナーとレシピエントの性を同一にする場合などでは必要と考えてのせました。この場合の細胞除去は、胚盤葉暗域で良いのですが、ふ化率はやはり低下します。

レシピエント胚への軟 X 線照射

これも必ずしも必要ではありません。レシピエント胚に放射線を照射すると、細胞の DNA の一部が破壊されるため、培養しても DNA 修復がまず行われることから細胞分裂するまでに時間がかかります。放射線を照射していないドナー細胞はこのようなことは無いため、ドナー細胞割合が増加すると考えられます。放射線の照射量によっても発育遅延の時間は異なりますが、キメラの発生割合が増加する傾向があるように思われます。

Hamburger & Hamilton('51)による発生ステージ表（ふ卵 3.5 日まで）

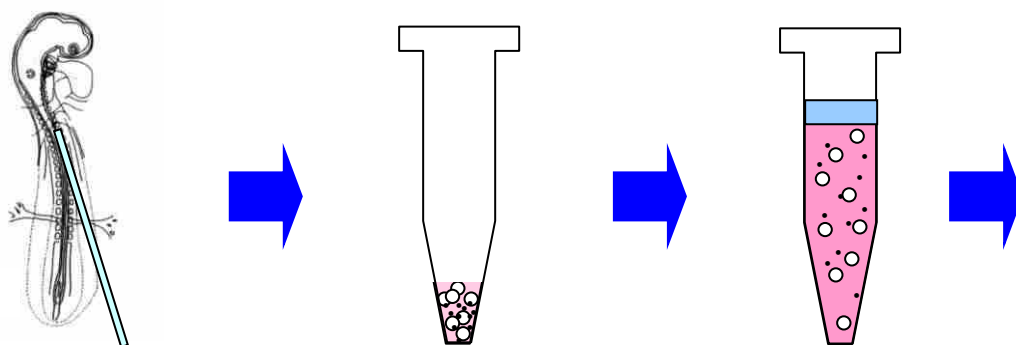
発生ステージ	ふ卵時間	胚の発育状況
1	0 時間	前条期、Eyal-Giladi('76)および Kochav et al.('80)における初期発生 の発生ステージ X と同じ。
2	6～7 時間	初原条期、原条が短く縦と横がほぼ同じ 0.3～0.5mm。
3	12～13 時間	中原条期、原条がほぼ中央にまで伸びている。
4	18～19 時間	定原条期、原条は平均 1.88mm に達する、明域は西洋梨型。
5	19～22 時間	頭突起期、脊索（頭突起）が前へ伸びる。
6	23～25 時間	頭褶期、脊索の前方にある明瞭な胚盤葉のひだが胚そのものの前 端を示す。体節はまだ現れていない。
7	23～26 時間	1 体節期、1 対の体節を持つ。2 対であれば 7 ⁺ 。
8	26～29 時間	4 体節期、体節が 3 つであれば 8 ⁻ 。
9	29～33 時間	7 体節期、一次眼胞がある。心臓原基が融合し始めている。
10	33～38 時間	10 体節期、心臓はわずかに右に傾いている。
11	40～45 時間	13 体節期、眼胞は基部がくびれている。心臓は右に湾曲している。
12	45～49 時間	16 体節期、頭は左側を下にして傾き始めている。一次眼胞と眼柄 は十分に完成している。心臓はやや S 字形をしている。
13	48～52 時間	19 体節期、頭は部分的または完全に左側を下に横転している。頭 屈曲と頸屈曲はゆるやかな曲線を描いている。
14	50～53 時間	22 体節期、頭屈曲は前脳と後脳はほぼ直角、頸屈曲はゆるやかな 曲線、体幹部屈曲が現れる。一次眼胞が陥入しはじめ水晶体板が 形成されている。
15	約 50～55 時間	これ以降のステージでは体節数にバラツキがあり判定基準とはな らない。頭屈曲は前脳と後脳は鋭角をなしている。
16	約 51～56 時間	屈曲はステージ 15 よりも著しく、体幹部屈曲がステージ 15 より 明確になる。
17	約 52～64 時間	頸屈曲は、ステージ 16 より鋭く曲がっているが、角度はまだ 90 度より大きい。尿嚢はまだない。
18	約 65～69 時間	頸屈曲は、ほぼ 90 度の角度。尿嚢が形成されるが、まだ胞状には なっていない。
19	約 68～72 時間	頸屈曲は、更に鋭角になる。体幹部屈曲は、ほぼまたは完全に消 失している。尿嚢は小さい袋だがまだ胞状にはなっていない。
20	約 70～72 時間	頸屈曲はステージ 19 より更に曲がっている。尾部屈曲は前方へ進 み始めている。眼はほのかに灰色を帯びている。
21	約 3.5 日	尾部屈曲は腰～仙骨域を含んでいる。体幹の背側の輪郭は直線で あるかやや曲がっている。眼はかすかに色素が形成されている。
22	約 3.5 日	屈曲はほとんど変化なし。眼の色素は明瞭である。



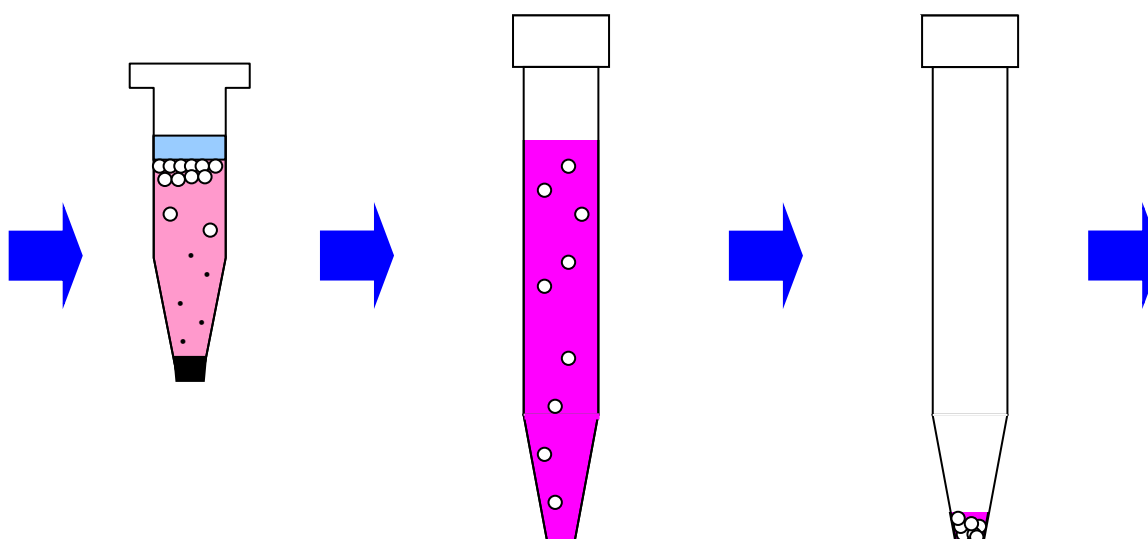
H&H の発生ステージ 1~20 (脊椎動物の発生 (上)、培風館、1989 より抜粋)

4. 始生殖細胞 (PGC) 関連技術

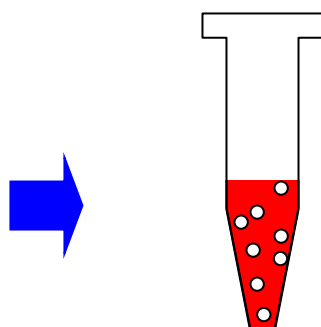
(1) PGC の採取方法



- ① 胚の中心を走る太い血管に、ガラス管で作製したマイクロピペットを突き刺し血液を吸引する。
- ② 1.5ml のチューブに採取した血液を集め、200G で 5 分間の遠心を行い、上清を捨てる。
- ③ 集めた細胞を 16% フィコール MEM 1ml で浮遊させ、0% フィコール MEM を 0.1~0.2ml 重層する。



- ④ 800G で 30 分間の遠心を行う。赤血球が沈殿し、上層に PGC が集まる
- ⑤ ④の上清を 15ml の遠心チューブに移し、10ml の 0% フィコール MEM で分散する。
- ⑥ 200G で 5 分間の遠心を行い上清を捨てる。



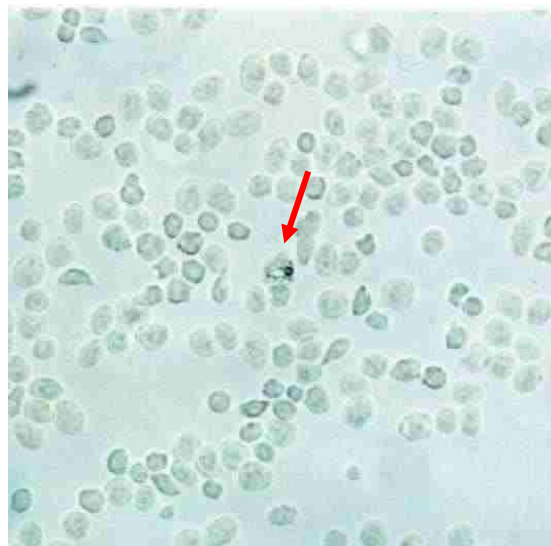
- ⑦ ⑥の沈殿した細胞に KAv-1 を少量加えて攪拌し 1.5ml のチューブに移す。

(2) 血液中の PGC の計測法

- ① 1.5ml のチューブに 3.7%ホルマリン含 PBS(-)を 199 μ l を入れる。
- ② ふ卵開始後 2.5 日目の胚に、1 μ l の位置に目盛りを入れたガラス管で作製したマイクロピペットを血管に刺して 1 μ l 採血し、①の溶液と良く混合する。
- ③ サンプルをマルチウェルスライドガラスの穴に 10 μ l ずつ滴下する。
- ④ 標本が乾燥しないように水滴を落として、倒立顕微鏡 (150 倍) PGC を全てカウントする。PGC は赤血球よりも大きく細胞内に油滴の様なものが見える。赤血球は油滴の様なものが見えないので簡単に判別できる。



細胞を計測するときのマルチウェルスライドガラス。図は 12 穴のもの。



矢印の先の細胞が PGC。他の細胞は赤血球。

(3) PGC の PAS 染色

- ① (2) で作製した標本を 37℃で乾燥させる。
- ② 標本の上に 0.05%セロイジンエタノールを 150 μ l 静かに垂らす。これを 2 回行い 2～3 分静置した後、余分なセロイジンを吸い取り、37℃で乾燥させる。
- ③ 1%過ヨウ素酸 ($\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液に 5 分間漬ける。
- ④ 蒸留水で十分洗った後、Schiff 試薬に 5～10 分間漬ける。
- ⑤ 水洗せずに、0.5%メタ重亜硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 水溶液で 3 回、各 3 分間漬ける。ヘマトキシリン染色は行わない。

(注意)

セロイジン包埋を行うと、空中に浮遊している細かなゴミまで張り付いてしまい、ゴミの中には PAS で染色されるものもある。このようなものは、異常に濃く染色されていたり、形態が PGC とは明らかに異なっているので PGC と区別する。

セロイジン

パラフィンなどと同様に標本を包埋するものです。パラフィンとは異なってスライドグラスに包埋した後も細胞の染色が可能です。以前は、セロイジンとして国産のものが販売されていたのですが現在(2005 年)では販売されていません。ですが、メルク株式会社からセデュコール(Cedukol)と言う試薬が輸入販売されていて、このセデュコール 60g に無水エタノール 375ml とジエチルエーテル 375ml を混合することによって 8%のセロイジンができます。セロイジンの濃度を調整するには、8%のセロイジンに無水エタノールを加えることで行います。

PAS 染色キット

これは、いくつかの薬品会社から販売されています。武藤化学株式会社の製品は、試薬が小さなアンプルに小分けされているので扱いやすいです。キットの中には、核を染めるヘマトキシリンが入っていますが、PGC は細胞内のほとんどが核なので、ヘマトキシリン染色を行うと全部染まってしまうのでニワトリの PGC の場合は行いません。なお、PAS 染色キットは使用期限が比較的短いので、買いだめはしない方が良いでしょう。

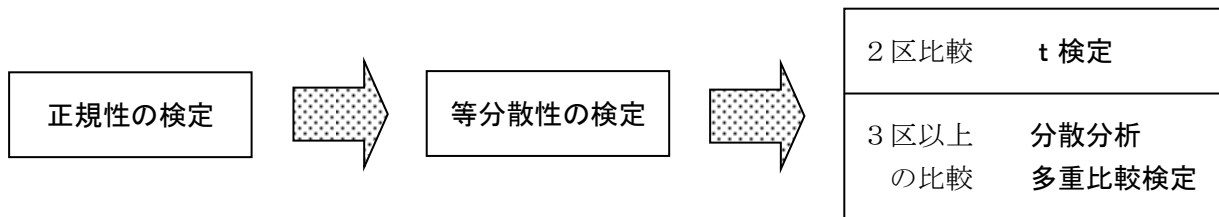
VI. 統計処理

受精率やふ化率は、卵重や体重などのように正規分布しないことが多い。このような場合の検定法としては、①正規分布するように数値変換を行ってパラメトリック検定で行う方法、②ノンパラメトリック検定で行う方法、③分割表などによって比率の検定を行う方法がある。①と②の場合は、1区1回のふ化率を入卵個数に関係なく1個のデータとして扱うため、反復試験の必要がある。③の場合は、受精卵と無精子の個数によって検定するため反復試験の必要は無い。①の場合の数値変換には、アークサイン変換が良く用いられる。その他に、受精卵には1、無精子には0を個数だけ入力する1-0分散分析法もあるが、データ数が多い場合はわずかな差でも有意になってしまうため、鶏の場合では差がないことを強調する検定以外は通常行わない。

1. 数値変換を行ってパラメトリック検定で行う方法

(1) 検定の順序

差の検定を行う前に、正規性の検定を行い正規分布に従わない場合は数値変換を行い正規分布に従う形に変換する。次に、等分散性の検定を行い、分散が等しいか否かで差の検定方法が変わる。差の検定は、試験区が2つであればt検定、3つ以上であれば分散分析と多重比較検定で行う。



(2) 正規性と等分散性の検定

t検定や分散分析の前に行わなければならないのが正規性の検定で、コルモゴロフ・スミルノフの検定、シャピロ・ウィルクスの検定、リリフォースの検定などの検定法がある。P>0.001であれば正規分布に従っていると見る。これらの検定をしなくても正規確率プロットを作成して、一直線に並んでいれば正規分布していると見る方法もある。

t検定や多重比較検定は、分散が等しいかどうかで差の検定方法が変わる。等分散性の検定は、試験区が2つの場合は、F検定で行い、3つ以上であれば、ハートレイの検定、コ克蘭の検定、バートレットの検定、ルビーン（レーベン）の検定などがあり、P>0.05であれば分散は等しいと見る。

分散分析でも最小二乗分散分析で行う場合は、正規性の前提条件が外れるため、正規性の検定を飛ばして等分散性の検定から行う。

(3) アークサイン変換 ($\sin^{-1}\sqrt{X}$)

二項分布のような変数を正規分布に近づける数値変換法。数値が 80%以上や 20%以下に多くのデータがある場合に有効。鶏の受精率では、対数変換よりもアークサイン変換が良く用いられている。

計算順序は、

- ① パーセントの数値を小数点の数値に戻す。 85% → 0.85
- ② ①の値の平方根を計算する。 0.85 → 0.9219544...
- ③ ②の値のアークサインを計算する。 0.9219544... → 1.1730969...

EXCEL 関数では、平方根は SQRT、アークサインは ASIN。平均値を出す場合は、アークサイン変換後の平均値を逆に計算してパーセントに戻す。(サインを求めてから 2 乗し 100 倍する)

数値変換各種

データ変換には、アークサイン変換の他にも次のようなものがあります。

$y = \log x$...	対数変換
$y = \sqrt{x}$...	ルート変換
$y = x^a$...	べき乗変換
$y = e^{ax}$...	指数変換
$y = 1/2 \cdot \log(x / (1 - x))$...	ロジスティック変換
$y = 1/2 \cdot \log((1 + x) / (1 - x))$...	フィッシャーの z 変換
$x^{(\lambda)} = \begin{cases} (x^\lambda - 1) / \lambda & \lambda \neq 0 \\ \log x & \lambda = 0 \end{cases}$...	ボックス・コックス変換

(4) t 検定

t 検定には 3 種類ある。分散が等しい場合は、等分散を仮定した t 検定を行い、分散が等しくない場合は、分散が等しくないと仮定した t 検定（ウェルチの検定）を行う。同じ個体を用いて 1 回目と 2 回目とか、使用前と使用後の様な検定をする場合は、対応のある場合（従属 2 標本、一対の標本）の t 検定を行う。試験区が 3 つ以上で t 検定を繰り返して検定した場合は、有意確率が上昇してしまうので、行った場合は P 値を修正する必要がある。

(5) 分散分析

試験区が 3 つ以上の場合に検定する方法で、因子の効果を判定するもの。ある実験で、貯卵温度を 5℃、10℃、15℃で調査したとする。この場合、貯卵温度が因子であり、5℃、10℃、15℃が水準となる。因子が 1 つであれば一元配置分散分析、因子が 2 つであれば二元配置分散分析、3 つであれば三元配置分散分析となる。温度と湿度条件を変えたとなると、因子が 2 つなので二元配置となる。同じ個体で 1 分後、2 分後、3 分後と言うように 3 個以上ある場合は、それを因子と捉えて二元配置分散分析で検定ができる。

単に試験区ごとに差を見たい場合は、試験区を因子と捉えて一元配置分散分析を行う。t検定と一元配置分散分析では、反復データが必須であるが、二元配置以上の場合は実験の繰り返しが無くても分析できる。分散分析では、因子ごとの効果と交互作用の効果が判るが、因子の数と繰り返しの有無によって判定できる項目が変わる。交互作用が有意と判断された場合は、因子内における水準の差の有意性は無意味となり、どの区が優れているかは一元配置の形で多重比較検定を行う。

分散分析によって判定できるもの

因子の数	実験の繰り返し	有意性を判定できる項目
1	なし	—
	あり	S_A
2	なし	S_A S_B
	あり	S_A S_B $S_{A \times B}$
3	なし	S_A S_B S_C $S_{A \times B}$ $S_{A \times C}$ $S_{B \times C}$
	あり	S_A S_B S_C $S_{A \times B}$ $S_{A \times C}$ $S_{B \times C}$ $S_{A \times B \times C}$

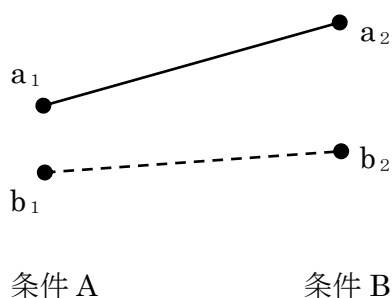
S_A は因子 A の効果、 $S_{A \times B}$ は因子 A と因子 B の交互作用効果

因子

分散分析でいきなり「因子」という語句が出てきますが要因と同じ意味で、英語ではどちらも **factor** です。ただし、因子は統計用語なので、要因と言わずに因子と言いましょう。

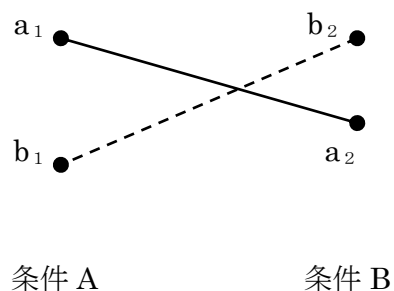
交互作用

交互作用とは、因子と因子が互いに影響していることを指しており、ある条件の結果と別の条件での結果が異なる場合には交互作用があると言います。交互作用には、A の条件の時に a は b よりも成績が良いが、B の条件になるとさらに差が開くといった相乗効果と、A の条件の時には a は b よりも成績が良いが、B の条件になると成績が逆転する場合の相殺効果と呼ばれるものがあります。



相乗効果

条件が変わると差が広がる



相殺効果

条件が変わると逆転する

(6) 多重比較検定

分散分析で判るのは、因子の効果と交互作用であって、どの区とどの区に差があるかは判らない。一元配置分散分析の形で、これを調べるのが多重比較検定と呼ばれるもので、LSD 検定 (最小有意差検定)、対比 (ついで) による検定、ダンカンの多重範囲検定、テューキーの HSD 検定、シェフェの検定等がある。検定法により検出力の強さ (有意と出やすいか) に差があり、LSD 検定 = 対比による検定 > ダンカンの検定 > テューキーの検定 > シェフェの検定の順となる。LSD 検定やダンカンの検定は、多重比較として適切でないとされているが、学会誌等の報告ではどれも頻繁に用いられている。t 検定など 2 標本の検定を繰り返して検定した後、P 値を修正する方法 (ボンフェローニ検定など) もある。多重比較検定は、一元配置分散分析のあとで行うのが基本だが、必ずしも分散分析を先に行う必要はなく、多重比較検定のみを行っても問題はない。どの検定を用いるかは、結論の持って行き方によって変えても良いが、テューキーの HSD 検定が無難。二元配置以上の場合、因子ごとの水準を 2 つにしておくとも多重比較を行う必要が無くなる。もし水準が 3 つ以上の場合、因子ごとに一元配置の形に集計して多重比較を行う。

ボンフェローニ検定

ボンフェローニの不等式を利用した多重比較で、t 検定など 2 標本の検定を繰り返した後で有意確率を修正するもの。実際には、算出された有意確率に繰り返し行った検定数 ${}_nC_2$ をかけるだけのこと。試験区が 3 つであれば検定数は、1 と 2 区、2 と 3 区、1 と 3 区の 3 回比較を行うので (${}_3C_2 = 3$)、算出された有意確率 (P 値) を 3 倍します。したがって、P 値が 0.016 だと 0.048 と変換され 5% 水準で有意となりますが、0.017 では 0.051 に変換されて有意差無しとなります。試験区が 4 つの場合は ${}_4C_2 = 6$ なので、P 値を 6 倍します。試験区が 5 つの場合では、 ${}_5C_2 = 10$ となり、P 値を 10 倍することになります。この方法は、2 標本の比較が出来れば用いることが出来るので、ノンパラメトリック検定での多重比較検定をしたい場合などでも行えます。ただし、試験区が多くなるほど差が出にくくなるので、試験区は 5 区程度までに抑えることが望ましいとされています。

ボンフェローニの不等式

ある A といった事象に対する確立を $P(A)$ としたとき、次の不等式が成り立つと言うもの。

$$P(\cup_{i=1}^n A_i) \leq \sum_{i=1}^n P(A_i)$$

5 つのグループを t 検定で調べようとする、 ${}_5C_2 = 10$ で 10 組の t 検定を行うことになるので、

$$P(A_1 \cup A_2 \cup A_3 \cdots \cup A_{10}) \leq P(A_1) + P(A_2) + P(A_3) \cdots P(A_{10})$$

となり、有意水準を 5% とすると、

$$P(A_1 \cup A_2 \cup A_3 \cdots \cup A_{10}) \leq 10 \times 0.05 = 0.5$$

となるので有意水準は最大で 10 倍に増える可能性があるというもの。

多重比較検定の符号の記入方法

多重比較検定を行ったら、どの区とどの区が有意で、どの区とどの区は差がないかを表にまとめます。通常は、データの右肩に小文字のアルファベットを記入し、異符号間で有意と言った書き方をします。この符号の付け方は、次の通りです。

試験区の数4区であって、次のような結果であったとします。

	I	II	III	IV
I	—	P<0.05	NS	NS
II	P<0.05	—	P<0.05	NS
III	NS	P<0.05	—	NS
IV	NS	NS	NS	—

NS：有意差無し

- ① まず、試験区を数値の大きい順に並べます。ここでは、I区>III区>IV区>II区 であったとします。
- ② 次に、下の図のように差の無い区同士を線で結びます。IはIIIとIVと差が無いのでこの3つを線で結び、IIはIVと差がないのでIVとIIを線で結びます。III区はI区と全く同じになるので線を引きません。IV区はどの区とも差がないので、この場合も線を引きません。この場合2本の線が引けたので、上から順にa、bという様に小文字のアルファベットを付けます。
- ③ ②で作成した表を試験区ごとに縦に見て、どの線が引かれているかを集計します。IとIIIはaの線1本なのでa、II区はbとなり、IVの場合はaの線とbの線の両方あるのでabとなります。

区	I	III	IV	II
I	————— ← aの線			
II			————— ← bの線	
	=====			
	a	a	ab	b

- ④ 最後に、試験区の平均値にの右肩に③のアルファベットを記入して表を作成します。

表	×××
I	○○○ a
II	△△△ b
III	□□□ a
IV	▽▽▽ ab

a—b 異符号間で有意 (P<0.05)

統計ソフトでの多重比較検定

統計ソフトも色々ありますが、統計ソフトによって使用できる検定に制限がかかります。例えば、STATISTICA というソフトでは LSD 検定、ダンカンの検定、テューキーの検定、シェフェの検定などがありますが、これらは全て等分散が成り立つ場合の検定方法しか出来ません。SPSS では、さらに多くの多重比較検定が用意されており、等分散が成り立たない場合の検定も 4 種類行えます。LSMLMW では最小二乗分散分析のため、正規性の検定は不要ですが、対比による検定しか出来ません。SAS は、最小二乗分散分析が行えて、全ての検定が可能なので、論文では SAS が最も頻繁に使われおり、さすがの SAS などと呼ばれています。

(7) 統計モデル（数学モデル、線型モデル）

一般線型モデルのことを、general linear model の略で GLM と呼ぶ。

一元配置の分散分析では、

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} は測定値、 μ は全平均、 α_i は水準 A_i の主効果、 ε_{ij} は誤差。

二元配置の分散分析では、

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

β_j は水準 B_j の主効果、 $(\alpha\beta)_{ij}$ は交互作用。

これらの統計モデルは、103 ページの有意性を判定できる項目に全平均 (μ) と誤差 (ε) を加えたものと一致する。三元配置以上の場合で、特に交互作用を考えなくて良い場合などは交互作用を併合して分析する場合もある。ただし、交互作用を併合すると有意と出やすくなるので注意が必要。論文発表の際には、基本モデルの場合は記載の必要がないが、誤差を併合して分析した場合は用いた統計モデルを記載する。

試験区を減らす方法

多元配置分散分析で、因子内の水準が全て 2 つだとすると、試験区は二元配置では 4 つ、三元配置では 8 つ、四元配置では 16 必要です。しかし、ラテン方格法と直行法の利用により、三元配置では 4 つ、四元配置では 8 つの試験区に減少させることが出来ます。ただし、この場合の交互作用は算出されません。

四元配置のデータを 8 つに減少させた場合の試験区（黄色部分だけ行う）

		D1		D2	
		B1	B2	B1	B2
C1	A1	X1111	X1211	X1112	X1212
	A2	X2111	X2211	X2112	X2212
C2	A1	X1121	X1221	X1122	X1222
	A2	X2121	X2221	X2122	X2222

ABCD は因子を示し数字は水準。X の横の数字は、ABCD のそれぞれの水準を示す。

2. ノンパラメトリック検定

(1) ノンパラメトリック検定の種類

計測値を用いて検定するのがパラメトリック検定であったのに対し、計測値を順位に置き換えて検定するのがノンパラメトリック検定。受精率の検定にはあまり見ないが、正規分布に従わない計測値の検定に用いられる方法として知られている。ノンパラメトリック検定にも多くの検定があるが、通常のパラメトリック検定と対応させて表にまとめた。ただし、反復数が通常5個以上必要なので反復数が少ない場合は数値変換してパラメトリック検定を行う。

パラメトリック検定と対応するノンパラメトリック検定

目 的	パラメトリック検定	ノンパラメトリック検定
2つの標本の比較	t 検定 ウェルチの検定	マン・ホイットニーの U 検定 ウィルコクソンの順位和検定
対応のある2つの標本の比較	従属2標本の t 検定	ウィルコクソンの符号付順位検定
3つ以上の標本の比較 (因子1つ或いは因子の効果は無視)	一元配置分散分析	クラスカル・ウォリスの検定
3つ以上の標本の比較(因子2つ) (対応のある3つ以上の標本の比較)	二元配置分散分析	フリードマンの検定
共変量がある場合	共分散分析	
多重比較検定	最小有意差検定 対比による検定 ダンカンの多重範囲検定 テューキーの HSD 検定 シェフェの検定	
2変数の相関	相関係数	ケンドールの順位相関係数 τ (タウ) スピアマンの順位相関係数 R
ある変数から別の変数を推定	回帰分析 (1個の変数から推定) 重回帰分析 (複数の変数から推定)	

(2) ノンパラメトリック検定での多重比較検定

STATISTICA や SPSS では、ノンパラメトリック検定での多重比較検定が無いので、2区間の比較を行うマン・ホイットニーの U 検定（ウィルコクソンの順位和検定と結果は同じ）を繰り返した後で、ボンフェローニの方法によって修正を行う。

3. 分割表などによる比率の検定（カイ 2 乗検定）

（1）2 × 2 の分割表による独立性の検定

通常はカイ 2 乗検定を指すが、例数が 5 以下の例数を含む場合はフィッシャーの直接確率計算法を行う。

例：	試験区	入卵個数	無精卵	受精卵	受精率
	1	100	10	90	90.0%
	2	125	25	100	80.0

分散分析や t 検定などでは受精率の数値を使って検定を行うが、分割表による独立性の検定は無精卵個数と受精卵個数を用いる。分割表は、

区	無精卵	受精卵	合計
1	a	b	a+b
2	c	d	c+d
合計	a+c	b+d	n

$$\chi^2 = n(|ad-bc| - n/2)^2 / (a+b)(c+d)(a+c)(b+d)$$

$$\text{自由度(df)} = (\text{行} - 1)(\text{列} - 1)$$

であり、例では a、b、c、d にそれぞれ、10、90、25、100 を当てはめて計算する。

（2）2 × m、m × n の分割表による検定

試験区が多くなった場合などもカイ 2 乗検定で行えるが、一元配置の分散分析と同様でどの区とどの区が有意かは解らない。統計ソフトでも SPSS は出来るが STATISTICA では出来ない。ただし、手計算でも行える。どの区とどの区が有意かを知るには、2 × 2 の形を繰り返すしかないので、この場合は算出された有意確率をボンフェローニの方法で修正する。

（3）適合度の検定

試験区の数に関係なく、期待度数と観測度数をカイ 2 乗検定によって検定する。この場合の期待度数は、全区の平均から算出するが、観測度数の合計（無精卵と受精卵の合計など）と期待度数の合計を等しくして検定する。

通常の比較では、数値の右肩に数値の高いものから順に a b c を書き、異符号間で有意といった書き方がされるが、この場合は、全平均から算出された期待度数との検定となるので、試験区ごとに P<0.05 などを書く方法がとられる。

試験区	受精卵	無精卵	P 値
1	○○	◇◇	NS
2	××	▽▽	NS
3	□□	☆☆	P<0.05
4	△△	◎◎	NS
合計	●●	◆◆	

引用文献

【鶏全般】

- 養鶏マニュアル、岡本正幹 他編、養賢堂、東京、1966.
新編養鶏ハンドブック、田先威和夫 他編、養賢堂、1985.
養鶏－科学・技術・産業－、後藤悦男 編、ゴトウテクニカル、岐阜、1990.
家禽学、奥村純市 他編、朝倉書店、東京、2000.
ニワトリの動物学、岡本新 編、東京大学出版会、東京、2001.

【繁殖関連】

- 増訂改版 家畜・家禽繁殖学、E.S.E.ハーフェツ 編 西川義正 訳、養賢堂、東京、1970.
鶏の改良と繁殖、田名部雄一 編、養賢堂、1974.
家畜繁殖学、鈴木義祐 他編、朝倉書店、1976.
鶏の繁殖と産卵の生理、D.J.ベル 他編、中條誠一 訳、国立出版、東京、1977.
最新家畜家禽繁殖学、入谷明 他編、養賢堂、1982.
新家畜繁殖学、鈴木義祐 他編、朝倉書店、1988.
凍結保存－動物・植物・微生物－、酒井昭 編、朝倉書店、東京、1987.
精子学、毛利秀雄 監修、森沢正昭 他編、東京大学出版会、1992.
家畜繁殖、加藤精史郎 編、朝倉書店、1994.

【発生関連】

- 鶏の孵化と育成、小田良助 編、養賢堂、東京、1966.
発生のプログラム、石原勝敏 編、裳華房、1986.
脊椎動物の発生（上）、岡田節夫 編、培風館、1989.
動物発生工学、岩倉洋一郎 他編、朝倉書店、2002.

【統計関連】

- 畜産を中心とする実験計画法、吉田実 編、養賢堂、1975.
実験計画と分散分析のはなし、大村平 編、日科技連、1984.
生物統計学、米澤勝衛 他編、朝倉書店、1988.
分散分析のはなし、石村貞夫 編、東京図書、1992.
新版 生物統計学入門－計算マニュアル－、新城明久編、朝倉書店、1996.
すぐわかる統計用語、石村貞夫 他編、東京図書、1997.

おわりに

本書は、教科書としても使用可能なものを目指しつつ、コラムを設ける等、読み易さにも工夫をしました。独立行政法人家畜改良センターの技術マニュアルシリーズとしては、かなり異質なものとなりましたが、結構役立つものが出来たのではないかと自分としては思っております。このうち、コラムだけ拾い読みしてもかなり面白かったのではないでしょうか。

人工授精のところでは岡崎牧場での方法を書きました。技術の基本は同じだとしても実際のやり方は施設の数だけ方法もあると思います。これから始められる人は、岡崎牧場での方法を参考にして自分の施設に合った方法を考えていただければと思います。また、人工授精で一番難しいのは精液を絞る時の力加減です。これは言葉で上手く表現出来ませんので、いろんな鶏で絞ってみるしかありません。それと、人工授精を繰り返し同じ雌に行うと受精率が下がるということがまだ言われているようですが、私たちの経験からは決してそのようなことはありません。もし、受精率が低下するのであれば、是非、岡崎牧場の方法を試してみてください。

凍結精液は、受精率にばらつきがあること、個体別凍結保存の場合に作業が簡易に実施できないこと等、まだ確立されたとは言えない技術であり、現在もいかに改良するかを検討しているところであります。ただ単に岡崎牧場の方法を書いてもどうかと思ったので、各研究者の方法も載せました。鶏の凍結精液を試験される方は、ここにあげた方法すべてを試してみてもどうでしょうか。また、他の研究者の方法に、希釈液だけ岡崎牧場のものを用いるなど、組み合わせを試みても面白いと思います。ちなみに岡崎牧場での受精率ですが、90%程度の受精率が得られたこともありましたが、大抵は 40～80%と大きくばらついています。その理由が分かれば、技術の確立に繋がるのですが…。

胚盤葉キメラは、これからジーンバンクに活用出来るとの判断から載せました。岡崎牧場では、操作した胚の 7～9 割が羽毛キメラとなって発生します。そして、羽装に関係なく 3～5 割のヒナが生殖系列キメラになっています。肝心なのは、それぞれの個体でどれだけ生殖系列がドナー細胞由来のものに置き換わっているかです。生殖系列キメラと確認された個体のうち、中には生殖系列が 4 割以上置き換わった個体もたまに発生しますが、大抵は 3 割以下です。研究者によっては、もっと高率に発生させている人もいますので技術的な問題があるのかもしれません。

付録のつもりで、統計処理について少し載せました。統計学を全く理解していない人にこれだけ読んで検定しろと言っても無理な話だとは思いますが、取りあえずザッと読むと統計学の教科書が読みやすくなり統計ソフトの使い方も理解しやすくなると思います。

気がつけば本文だけで 108 ページまでになってしまいました。最初に書きましたが、この技術マニュアルのシリーズに比較して、コラムを設ける等異質なものですが、実際に行う人に対しては非常に役立つものになったと思いますし、これを読んで鶏に興味を持つ人も増えてくれればと期待しています。また、もっと詳しく知りたい方には、参考図書を最後に載せましたので是非そちらもお読みいただければと思います。

独立行政法人 家畜改良センター岡崎牧場

業務第一課 榛澤章三

(現 岡崎牧場 業務第二課)

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

著 者／（独）家畜改良センター 岡崎牧場 業務第一課

発 行／（独）家畜改良センター 企画調整部企画調整課

発行日／平成 17 年 7 月

発行所／サンワ印刷