

Bランク桑実胚は保存しないようにします。

→融解・培養しても死んでしまいますのでムダです。

判断が難しい受精卵は半数を凍結、残りを培養観察。結果をみて保存、廃棄を判断。

### \* 記 録

受精卵の状態・数などを記録して融解後と比較する。

その他に、子宮・卵巢の状態や交配で雄を容易に許容したかなど。

## 5. 凍 結

### ①凍結の準備

凍結処理に入る最低10分前には発砲スチロールに液体窒素(LN<sub>2</sub>)を入れておくこと  
(発砲スチロール内温度を安定させるため！)

### ②凍 結

液体窒素液面に浮かせた発砲スチロール上にストローを静置させて、液体窒素蒸気中で3分以上(現状10分間)保持した後に液体窒素に浸漬(10分以上)します。

↑  
この段階で約-135℃まで下がる。  
液体窒素(LN<sub>2</sub>)蒸気内=-135℃  
液体窒素(LN<sub>2</sub>)液内 = -196℃

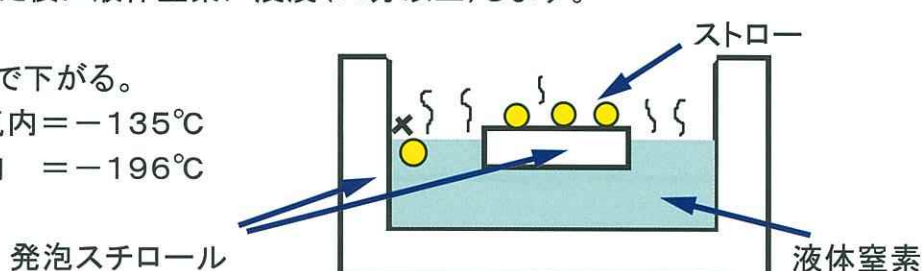


図41 ストローの凍結

\* 発砲スチロール板にストローを乗せるときは慎重に！

→高い位置からストローを落とすと転がって液体窒素(LN<sub>2</sub>)液内に落ちます。

出来るだけ低い位置で乗つける。板を触る感じです。

\* 発砲スチロールは薄いもの(7mm程度の厚さ)を使います。

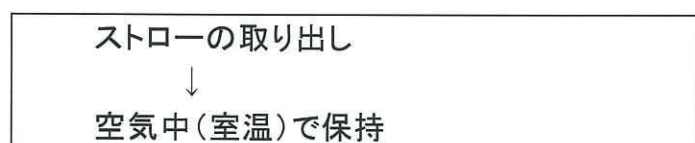
### ③保管器への移動

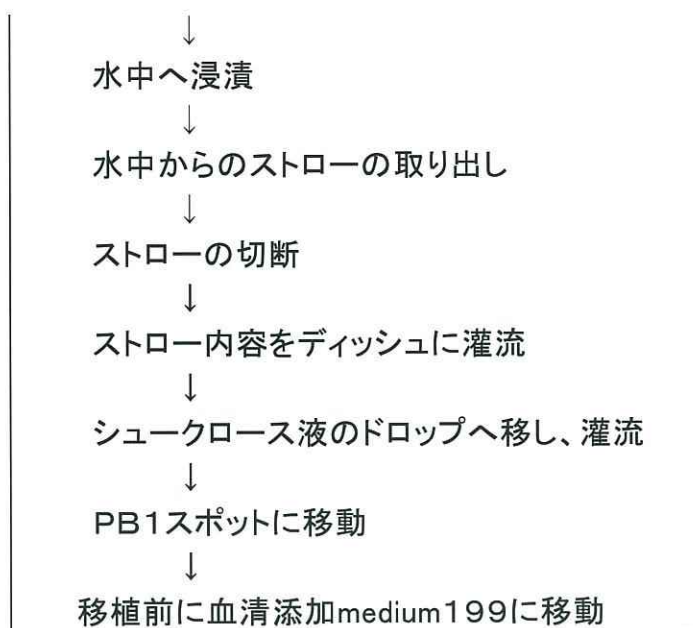
液体窒素中に浸漬(10分以上)後、ストローを保管容器(タンク)へ移す。

→LN<sub>2</sub>内から外に出すと気温差は200℃にもなる。手早く行なわないと融解や氷結晶の成長が始まり胚に悪影響が出ます。

## 6. 融 解

融解の流れとしては次の通りです。





各過程の詳細は以下の通りです。

①液体窒素から取り出したストローを室温20℃の空气中で10秒間保持したのち、室温の水中に浸します。ピンセットでストローを摘んで水中で揺り動かします。(室温は25℃くらいでも良い。)

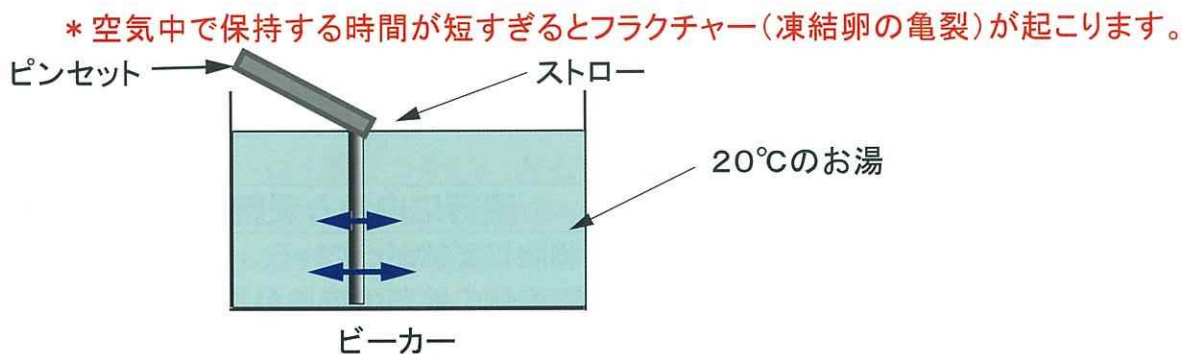
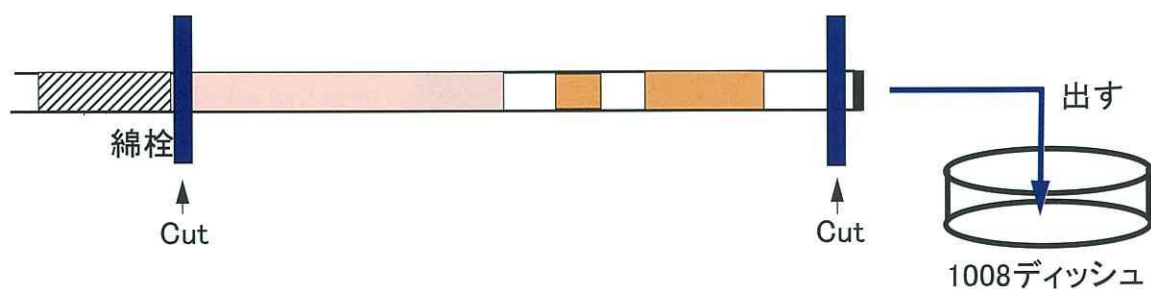


図42 ストローの融解

②ストロー内のシュクロース液が解け始めたら(7秒ぐらい)、水中から取り出して周りの水滴を拭きます。ストローの両端を切断し、シュクロース液(約0.8ml)を入れたシリンジで中身をディッシュ上に灌流し希釈します。ディッシュを揺することでEFSをシュクロースで希釈します。(希釈は耐凍剤の除去のために行う)



- \* EFS40部分は決して触らないこと
- \* 一旦溶け出したら、素早く操作を行う
- \* ストロー内で受精卵があった位置にシュクロース液が残るように灌流する  
→ストロー内壁に受精卵が付着している可能性があるため

③ディッシュ上の受精卵はピペットで集めて流動パラフィンで覆ったシュクロース100 $\mu$ lスポットに移し、シュクロース灌流の5分後にPB1スポットへ入れ替えます。なお、このPB1、シュクロースディッシュは当日作成し、恒温プレート(20℃程度)に乗せておきます。

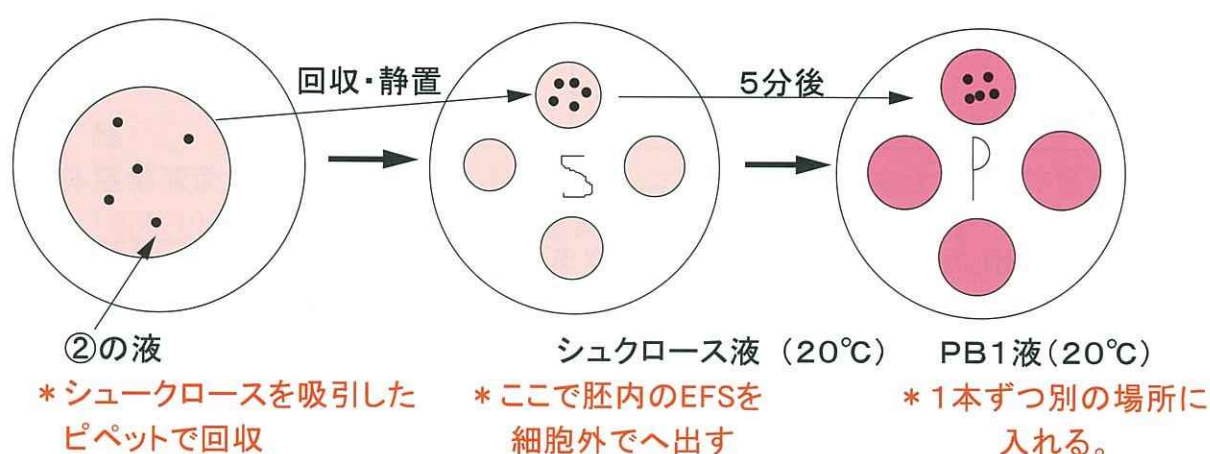


表29 受精卵の状態による形態的特徴

| 融解後の状態の良い受精卵                                                   | 退行に向かう受精卵                                     |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 細胞質がしまっている、<br>細胞質の輪郭が明瞭である<br>細胞質の色が濃い(黒い)<br>透明帯・細胞質の間があいている | 細胞質が広がっている<br>細胞質の輪郭の境界が見えにくい<br>細胞質の色が全体的に薄い |

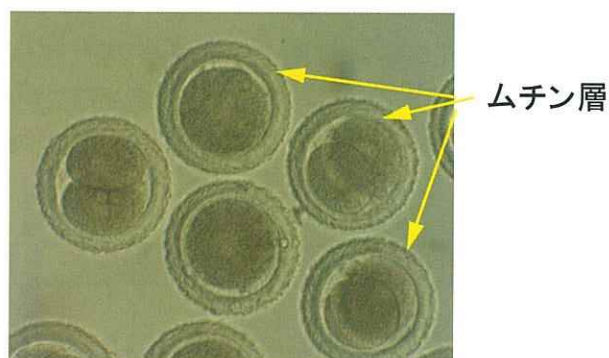
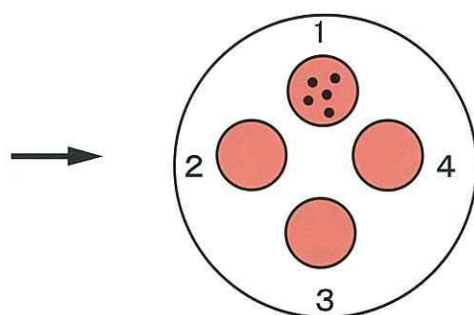


図43 ウサギの受精卵



血清添加medium199

\* 最終的に使う受精卵を移植前にこのディッシュに集める。

\* PB1液は室温に出しておいても問題はないが、培養液は室温に出しておくと色が変わってしまうので前日に準備してCO<sub>2</sub>培養器で平衡しておく

### 【注 意 点】

\* 顕微鏡・机は使う前にアルコールで消毒する。

\* 卵を見ていないときは、顕微鏡の光をつけたままにしておかない。

(温度が上がりすぎてしまうため。)

\* 生きた受精卵と死んだ受精卵をきっちりと見極める。

ムチン層と細胞層の境界が明瞭 → 生きた受精卵

〃 不明瞭 → 死んだ受精卵

\* 培養液は前日に作って培養器の中に入れておく。

\* 記録をとる。

○ 受精卵の状態・数

○ 凍結前と比較する。

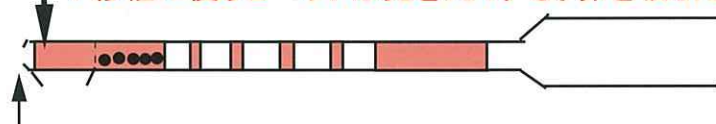
\* 移植に使うピペットは1頭につき2本(左右に1本ずつ)を移植の直前に作る

早く作ったときは、直前にバーナーで滅菌する。コンタミ防止！

ピペットをアンプルカッターで切る際、

この場所は触ってはいけない。人の手には雑菌が大量に付着。コンタミ防止。

\* 移植に使うピペットは先を丸くする。卵を吸引した後1cmくらい培養液を吸引する。



1 cm

バーナーであぶり、先端を丸める→顕微鏡で確認してから使用すること。

丸めることでかなり口径が小さくなるので太めにピペットを引いた方がよい。

\* 卵管内に余分な培地・流動パラフィンを入れないこと。受胎率が低下する。

\* 使用培地は血清添加medium199を一貫して使用してもよい。

(CO<sub>2</sub>平衡を忘れずに行うこと)

## 7. 移 植

### ①移植するウサギ(レシピエント)の選抜と準備

移植に用いるウサギは採卵に用いたウサギ(ドナー)よりも半日程度早くホルモン処理を開始する。

hCG処理後54hのウサギに重点的に移植する。

(ドナーはhCG処理後72時間で採卵したのでその差は18h)

- ・ドナーとレシピエントのタイミングが同じ場合には、受精卵が着床するだけの時間がない
- ・桑実胚の方が胚盤胞よりも長時間待つことができる
- ・胚盤胞はタイミングの早い卵管に入れた場合には着床しない

### 【移植するウサギ(レシピエント)の選抜】

- 性成熟に達した繁殖成績が良く、産子数の多いもの
- 系統として多産であり、子育ての上手なもの

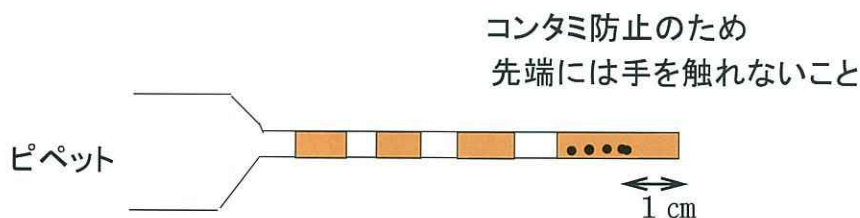


\* 新鮮卵を移植することで凍結卵移植との差がはっきりする。

(技術の問題点を明確にする上で有効(移植技術の問題なのか、卵の品質の問題なのか))

### ②移植用ピペット

・移植に用いるピペットは先端を丸くする。胚をピペット内に吸引した後、培養液を1cm程度吸引する。



### コンタミ防止

クリーンベンチ内で培地作成時における無菌操作に注意！

○培養ビンの火炎滅菌

○培地上には手をかざさない

○手の触れた部分には全て菌が存在する考える

胚操作のピペット作成には細心の注意を払う

### ③移植の操作

具体的な操作は以下の通りに行います。

受精卵(桑実胚)をPB1から199に移し替える

↓

麻酔薬ネンブータル1.5～2mlを静注(個体差があるのでゆっくり注入)

↓

強制排尿・腹側部の毛を刈る

↓

ウサギを保定し、局所麻酔(塩酸プロカイン9:ボスミン1を左右5mlずつ)し、10分待機

↓

腹側部中央で皮膚を切開し、筋膜にメスで小穴を開けてからハサミ(先端の丸いもの)を挿入して開口部を広げる(切開するより傷口の治癒が早い)

↓

[局所麻酔及び切開部位]

腰骨・肋骨突起部を底辺に正三角形を作った重心部  
(中心)よりやや下部から上に2cm程度

開口部から卵巣を捜す(卵巣周囲に付着する脂肪(白色)が指標) 脇腹のやや上部

↓

卵巣を引き出し卵胞を観察の上、乾燥防止のために卵巣にキムワイプ(ペーパータオル)を乗せてコンドロイチン(保水性の高いムコ多糖類)を散布

↓

1卵管当たり桑実胚10個を移植(卵管采から注入)

↓

ピペット先端をバーナーで溶かしてつぶしたものをリードにしてその脇を胚を充填したピペットをスライドさせるようにして卵管深部に導入

ピペットから受精卵が全て出たのを確認後

卵巣を体内に戻し、コンドロイチン5mlを注入後縫合

↓

縫合口にマイシリン(抗生物質)及びイソジン(外傷薬)を塗る

コンドロイチン及び塩酸プロカインは  
使用前に冷蔵庫から出し、室温に暖めておくこと。



図44 切開部位

#### 【注 意 点】

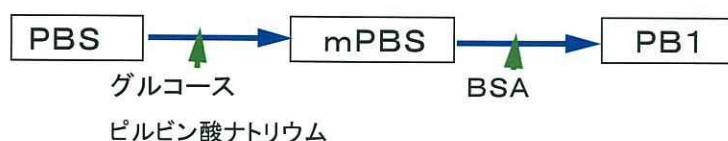
- ・ 移植に用いるピペットは1頭につき2本(左右1本ずつ)を移植の直前に作成する
- ・ 直前に作らなかった場合はコンタミ防止のため移植の直前にバーナーで滅菌

## 8. 試薬等の作成

◆操作はクリーンベンチ内で行うよう心掛けて下さい。

### (1) PB1液

PB1液はPBS液(リン酸緩衝液)からm(修正)PBS液を作成し、これにBSA(牛血清アルブミン)を加えることにより作成します。以下に順を追って作成方法を解説します。



#### ① P B S の作製 (保存期限は6ヶ月)

ア. 超純水を利用する。

イ. 500mlビーカーに攪拌石を入れ、超純水を約350ml、フェノールレッドを0.002g加えた後、以下の試薬を順番に入れ、各々が完全に溶けてから次の試薬を入れていく。

|                                                      |        |
|------------------------------------------------------|--------|
| NaCl                                                 | 4.000g |
| KCl                                                  | 0.100g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・12H <sub>2</sub> O | 1.450g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0.100g |

ウ. ミニビーカーに以下の試薬を測り、超純水で流しながら50～100mlビーカーへ移したのち、500mlビーカーへ移す。

|                                      |        |                      |
|--------------------------------------|--------|----------------------|
| MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O | 0.050g | (潮解性: デシケーターに入れておく。) |
|--------------------------------------|--------|----------------------|

エ. ミニビーカーに以下の試薬を測り、超純水で流しながら50～100mlビーカーへ移す。

|                                      |        |                      |
|--------------------------------------|--------|----------------------|
| CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O | 0.065g | (潮解性: デシケーターに入れておく。) |
|--------------------------------------|--------|----------------------|

オ. 500mlビーカーの液と50～100mlビーカーの液を氷水(冷蔵庫)で冷やしたのち、少しずつゆっくりと混合します(氷を使用する際には、培地に水が絶対に入らないように注意！)。

カ. ビーカー内を超純水で数回洗いながら、500mlメスシリンダーに移し換えて 500mlにメスアップします。

キ. ボトルに保存します。

#### ② m (修正) P B S の作製 (保存期限は1ヵ月)

シリンダーにPBSを500mlをとり、以下の試薬を添加し、よく攪拌する。

|            |         |                   |
|------------|---------|-------------------|
| グルコース      | 0.500g  |                   |
| ピルビン酸ナトリウム | 0.018g  | ← 冷蔵庫から出し常温にしておく。 |
| K-ペニシリン    | 0.0375g |                   |

これらのエネルギー源を添加することにより保存期限は短くなる。

### ③ P B 1 液の作製 (保存期限は1ヵ月)

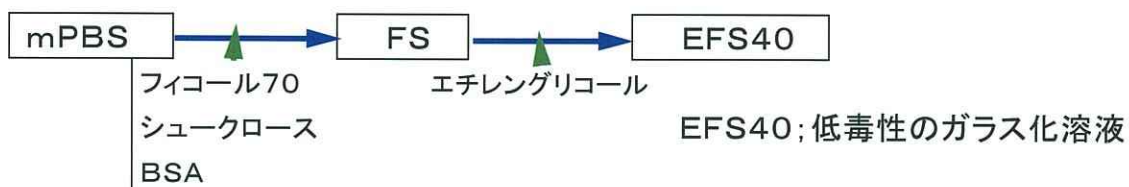
シリンダーにmPBS100mlを採り以下の試薬を添加する。そのまま放置して溶かす。

**\* 絶対に攪拌はしない事。(攪拌によって泡立ち、BSAが塊状になり溶けにくくなるため)**

|     |              |                    |
|-----|--------------|--------------------|
| BSA | 0.3g         | ← 冷蔵庫から出し常温にしておく。  |
|     | 0.45 $\mu$ m | mフィルターで濾過滅菌して保存する。 |

### (2) E F S 4 0 液の作製

EFS40液はmPBS液からFS液を作成し、これに耐凍剤エチレングリコールを加えることにより作成します。以下に順を追って作成方法を解説します。



#### ① F S 液の作成

FS液 = 30%フィコール(F) + 0.5Mシュクロース(S) 添加PB1液

ア. mPBSを10mlのメスピペットで 35.1ml測り100mlのビーカーに入れ、以下の試薬をを加え攪拌子を入れマグネチックスターラーで完全に溶かす。

|         |       |
|---------|-------|
| フィコール70 | 15.0g |
| シュクロース  | 8.56g |

**\* フィコール量が多いためなかなか溶けない。**

イ. 溶かした後、BSA(牛血清アルブミン)を添加する。そのまま放置して溶かす。

|     |        |
|-----|--------|
| BSA | 0.105g |
|-----|--------|

**\* 絶対に振ったりしない。**

#### ② E F S 4 0 (低毒性のガラス化溶液)の作製

FS液とエチレングリコール(E)を同じLot.の1mlシリンジで、3:2の容積比で10mlスピッツ管もしくは50mlビーカーにとり、混合させる。

**\* 混合しにくいので、シリンジで何度もピペティングし完全に混合させる。**

1mlずつ0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し1mlガラスアンプル管に保存する。

**\* 溶液がアンプル管壁に付着するとバーナーで封をするとき焦げ付くので慎重に分注！**

### (3) シュクロース液の作製 (約6カ月保存可能)

シリンダーにPB1液を100ml採り、シュクロース 17.115gを添加する。0.22  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4.5mlずつクライオチューブへ分注。



図45 フィルター

### (4) 1%コンドロイチン溶液の作成

100mlビーカーに攪拌石を入れ生理食塩水100mlに対してコンドロイチン硫酸塩を1g加えます。

↓

完全に溶解したらクリーンベンチ内にて、0.45  $\mu$ mフィルターで濾過滅菌します。

生理食塩水：蒸留水100mlにNaCl 0.9g加える。NaClが完全に溶けたら100mlコルベンに移し替え、蓋を1/4ほど閉めます。さらにアルミ箔で蓋を覆い、オートクレーブで121℃ 15分間滅菌します。生理食塩水は前日に準備しておくことで作業がスムーズです。

注：コンドロイチンは溶けるまで時間がかかります。また、試薬瓶が遮光タイプ（茶色）のため作成後、ストックするガラス瓶はアルミ箔を巻いて遮光します。

### (5) PVP-FSHの作成

アントリン（FSHの商品名）40AUあたり生理食塩水20mlで溶かし、PVP（ポリビニールピロリドン）2gを加えます。生理食塩水は付属しているアンプルを使用するか、前述したように作成しても問題ありません。具体的な作業手順は次の通りです。

100mlビーカーに攪拌石を入れておきます。

↓

5mlのシリンジに18G針を装着し生理食塩水を吸います。

↓

FSHの入ったアンプルを開け生理食塩水を回しながら入れます。（壁に試薬が付着しているため）入れた生理食塩水を再び吸い込み100mlビーカーに移します。この作業を3回ほど繰り返す事でアンプル内の試薬を残す事なく回収出来ます。

↓

PVPが完全に溶解したらクリーンベンチ内で2mlと1mlで分注し、凍結保存します。

分注量の違い：粘性があるためロスがどうしても出ます。FSHは2ml/頭必要であるが足りない。  
不足分を1ml分注容器からまかなう。（容量が2.5mlチューブを使用した方が良い場合もある。）

注；PVPの添加量の増加は溶解時間に比例する。例えば、PVP8gは完全に溶けるまで10時間程必要な場合がある（水温が低い場合）。

## （6）hCGの準備

調製方法はFSHと同様である。生食で融解後、よく攪拌したらクリーンベンチ内で2mlずつ分注し凍結しておく。

## （7）ウサギ血清の作成

手順としては以下のとおりです。

- （1）心臓採血を行う（50～70ml/頭）
- （2）血液を血清用真空採血管へ入れ静置→30分後 遠心分離
- （3）.ガラス瓶に血清を移し替え56℃、30分間で非動化（滅菌）します。
- （4）.クリーンベンチ内で0.45  $\mu$ mフィルターで濾過滅菌・分注し凍結保存します。



図46 非動化（ウォーターバス内）

## 9. ガラス器具等の洗浄

使用するガラス器具は汚染原因となる雑菌が付着していないことは当然のこととして、試薬や洗剤等が器具の内面に付着していることで胚の生存性等に大きな影響を与えることもあるので徹底的に行うべきです。洗浄の手順は以下の通りです。

洗浄液としてはネオバリュー及びスキヤットを水道水に希釈したものに1晩浸漬  
（洗浄液は1週間毎に作り直すこと）



水道水又は温湯で10回以上すすぐ



流水（水道）中に90分間置く（流量としては細い糸状）



蒸留水で5回以上洗い流した後で乾燥させる



アルミ箔で覆い、感熱滅菌（160℃、2時間）を行う



滅菌後温度が下がったら取り出す

（滅菌器内の温度が高い時に扉を開けると器内に外気が入り込むため滅菌効果がなくなる）