

家畜改良センター 技術マニュアル 19

ウシ生体卵子吸引・体外受精マニュアル

2025 年 11 月改定

独立行政法人 家畜改良センター

はじめに

体外受精技術は、家畜の卵巣から卵子（未成熟卵子）を採取し、これを人工的環境下で成熟、受精させ、移植可能なステージまで発育させる技術です。

牛の未成熟卵子の採取方法は大きく分けて二通りあり、一つは食肉センターの屠体由来の卵巣から採取する方法です。もう一つは Callsen ら¹⁾や Pieterse ら²⁾によって開発された、超音波診断装置を用いることによる生体卵巣からの卵胞卵子の採取する方法(超音波ガイド・経腔生体卵子吸引法、以下 OPU と略す)です。Callsen ら¹⁾の方法は体表から卵巣を穿刺するものであり、Pieterse らの方法は、ヒト卵子の吸引採取法をウシに応用したもので、現在は主に Pieterse らの方法が取り入れられています。本マニュアルにおいても Pieterse らの方法についての手技を説明します。具体的には、7.5MHz 以上の超音波診断装置のプローブに加工を施したものを腔内に挿入し、プローブに装着した吸引針により腔壁を通して卵巣の卵胞を穿刺し、卵胞液ごと卵子を吸引採取するものです。これら OPU で採取した卵子を体外受精（IVF）し、胚を生産する方法（OPU-IVP）は、他排卵（過剰排卵）処理によって正常胚が採取できない供胚牛や1頭の供胚牛から多数の胚を効率よく生産する技術として利用されています。

目次

はじめに

体外胚生産	1
1. 卵巣採取	2
2. 卵子採取・検索	3
3. 体外成熟培養	8
4. 体外受精	12
(i)精子処理	12
(ii)媒精	16
6. 体外発生培養	17
7. 体外発生培養開始後 48 時間目の操作	18
超音波ガイド・経腔生体卵子吸引技術 (OPU)	
＜超音波診断装置を用いた卵巣観察＞	
1. 直腸用のプローブ (リニアタイプ) を用いた卵巣観察	19
・卵巣観察におけるイメージ	19
2. 経腔プローブ (コンベックスタイプ) を用いた卵巣観察	22
・卵巣観察におけるイメージ・卵巣の映り方、映し方	23
・卵巣の保定方法	24
＜卵子吸引＞	
1. 採卵針の形状および卵胞液の吸引方式	27
2. 腔壁への穿刺	28
3. 卵胞の移動	28
4. 吸引圧	28
5. 連続した卵子吸引	29
6. 複数の卵胞吸引	30
＜生体卵子吸引の実際＞	
1. 器具機材	32
2. 卵子保存液	32
3. 生体卵子吸引の手順	32
4. 採取液の濾過	34
5. 卵子の検索	37

目次（続き）

＜各種溶液の調製＞	38
家畜改良センターにおける培養液および試薬一覧	62
参考文献	64
あとがき	65

体外胚生産技術 (In Vitro embryo Production ; IVP)

本技術は、ウシ屠体の卵巣から卵子（未成熟卵子）を採取し、成熟、受精および移植可能なステージまで発育させる技術である。OPU-IVP との相違点は卵子の採取方法であり、成熟培養以降はほぼ同様の手法を採用する。

表 1. 体外胚生産スケジュール

	手 順	主な内容
－ 2 日目	卵巣採取 ↓ (卵巣保存)	生理食塩水 (25℃) で保存、運搬 (8 時間以内) 生理食塩水 (20℃) で約 20 時間保存する ※本工程は省略可能
－ 1 日目	卵子吸引 卵子検索 ↓ 体外成熟培養 (IVM)	1%新生子牛血清(New Born Calf Serum 以下 : NCS) 加 乳酸リンゲル液 (または 5%NCS 加 修正 TCM199) 5%NCS 及び 0.02AU/mL FSH 加 TCM-199 (または市販培地 IVMD101) 38.5℃、5%CO ₂ in air、20-24 時間
0 日目	体外受精 (IVF) { 精子処理 ↓ 媒 精 ↓ 体外発生培養(IVC)	90% パーコール液 (1)精子洗浄液 (10mM Hypotaurin、10u/mL α - α リン加 BO 液) (2)精子希釈液 (20mg/mL BSA 加 BO 液) (3)卵子洗浄液 (10mg/mL BSA 加 BO 液) ※(1)～(3)は市販培地 IVF100 に変更可能 精子濃度 (3×10^6 /mL) 38.5℃、5%CO ₂ in air、5-6 時間 5%NCS 加 CR1aa (または市販培地 BO-IVC) 38.5℃、5%CO ₂ 5% O ₂ 、90%N ₂ 8 日間
2 日目	初期発生検査	初期発生検査
(3～6 日目)	(形態観察)	(形態観察)
7～8 日目	胚盤胞発生検査	胚盤胞の発生検査 胚盤胞の移植、凍結

1. 卵巣採取

(1) 準備

- ① 生理食塩水を調製し、オートクレーブで滅菌後室温保存する。または市販の生理食塩水を用いる。
 - ② 魔法瓶に沸騰水を入れ消毒する。
 - ③ 25℃に保温した生理食塩水 1 L 当たり抗生物質（ゲンタマイシン）を 1 mL 添加する。
 - ④ 魔法瓶に生理食塩水を入れ、外科バサミ、ピンセット、ビーカー、滅菌紙タオル、滅菌ゴム手袋、滅菌済みの金属製ザル、白衣、長靴、その他必要なものを食肉処理場へ持参する。
- ※④は、③をジッパー付き保存袋（例：ジップロック）2 袋に入れ、キムタオル共に保温容器（発泡スチロール容器等）に準備する方法に変更可能。

(2) 卵巣採取

- ① 卵巣を金属製ザルに移し、別に用意した生理食塩水で血液等を洗い流す。
- ② 洗浄した卵巣をジップロックの生理食塩水に浸漬して実験室に持ち帰る。

2. 卵子採取，検索

一般的に卵巣には1卵巣当たり平均20～30個の小卵胞（直径2～6mm）があり、この小卵胞内の卵子は成熟前の卵核胞期にある。これらの未成熟卵子を採取し、成熟培養後体外受精に用いる。卵子の採取法には、大きく分けて吸引法と細切法がある。吸引法は注射筒を用いて、卵胞から卵胞液と共に卵子を吸引採取する方法である。細切法はメスまたは剃刀を用いて、卵巣皮質を切り刻み卵胞を破碎して卵子を採取する方法である。

1卵巣当たりから採取できる卵子数は細切法が吸引法と比較して多いが、吸引法は細切法に比べて処理に費やす時間が短く、発生率が若干高いことが挙げられる。本マニュアルでは、吸引法について説明する。



写真 1. 食肉処理場由来卵巣

（1）準備

① 1%NCS 添加乳酸リンゲル液を当日調製し、室温で保存しておく。

② 以下の器具等を用意する。

滅菌キムタオル、滅菌ゴム手袋、ピンセット、注射筒（5ml）、注射針（19G 針先鈍角）、シャーレ（底面外側に1cm 間隔で格子状に線を入れたもの）、パストゥールピペット、ビーカー

(2) 吸引採取

- ① 滅菌ゴム手袋を着用し、卵巢を生理食塩水で2～3回洗浄後、ビーカーに入れ室温で保持する。
- ② ピンセットまたは茶こし器等で卵巢をビーカーから取り出し、滅菌キムタオルで卵巢を清拭して、血液、生理食塩水を除去する。

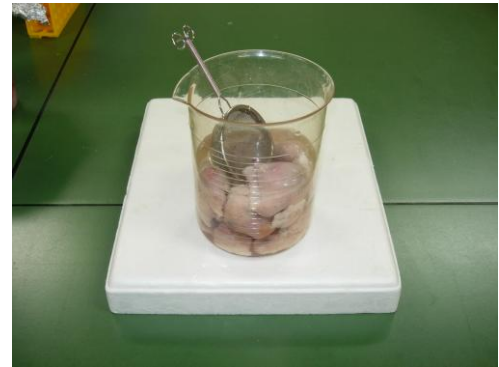


写真 2. 洗浄後の卵巢

- ③ 卵巢を保定し（図2）、19G 針付き 5ml 注射筒を持つ（図1）。

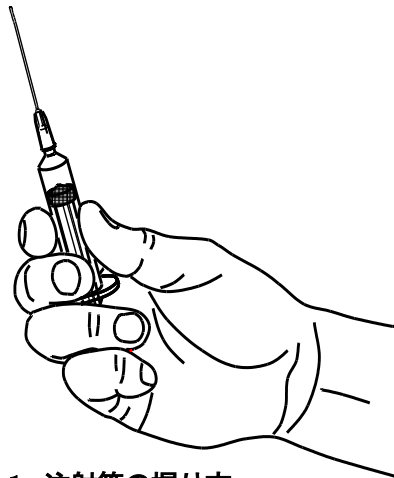
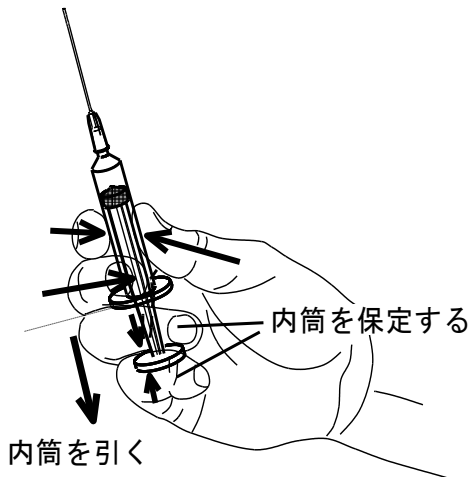


図 1. 注射筒の握り方



- ④ 卵巢皮質から針を刺し、直径2～6mmの小卵胞中の卵子を卵胞液と共に吸引する（図3）。この時、一度針を刺したら、針を抜かずできるだけ多くの卵子を吸引する。

*** 卵子吸引に使用する注射筒は、事前に洗浄して注射筒の内側のオイルや界面活性剤を除去後滅菌したものを用いる。**

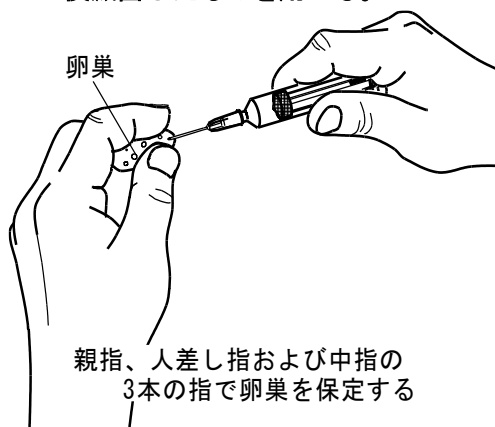


図 2. 卵巢の保定方法

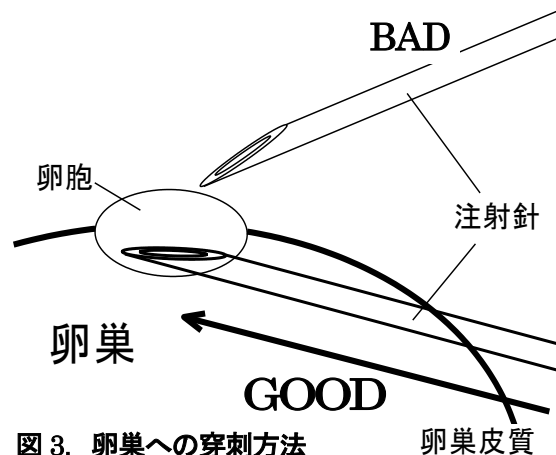


図 3. 卵巢への穿刺方法

- ⑤ 卵巢1個の吸引が終了したら、50mlの遠心管内へ吸引採取した液を静かに入れる。急激に

入れると卵丘細胞が剥離する恐れがある。

- ⑥ 全ての卵巣の処理が終了したら、遠心管内の上清をアスピレーター等で除去し、1%NCS 乳酸リンゲル液を加える（図4）。
- ⑦ ⑥と同様に上清を除去し、1%NCS 加乳酸リンゲル液を加え、同様の操作を繰り返す（図4）。
- ⑧ 顕微鏡下で観察しやすいように上清が透明になったら、90mm シャーレに沈殿物と上清を移す。その際、遠心管内に採取卵子が残らないように、1%NCS 加乳酸リンゲル液で共洗いする（図5）。
- ⑨ 卵巣数が少ない場合は、60mm シャーレに直接吸引採取した液を入れる。卵子や細胞が沈殿しても採取液が透明でなく、顕微鏡下で観察しにくい場合は、⑥～⑧と同様に 1%NCS 加乳酸リンゲル液を用いて上清を透明にする。

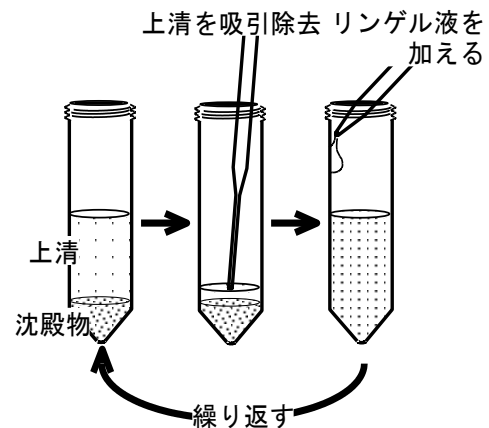


図4. 吸引液の洗浄

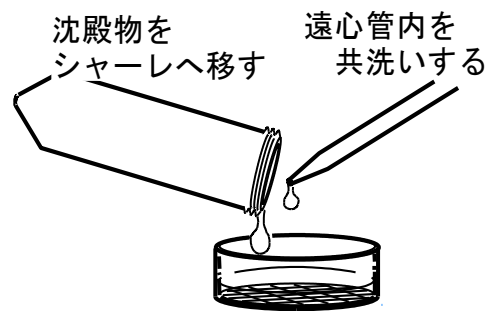


図5. シャーレへの移動

*** 上清を吸引除去して吸引液を洗浄するほかに、沈殿物をシャーレに移して検卵することも可能である。**

(3) 卵子検索

- ① 90mm シャーレを顕微鏡下に静置する。
- ② 図のように格子毎に順番に検索する。

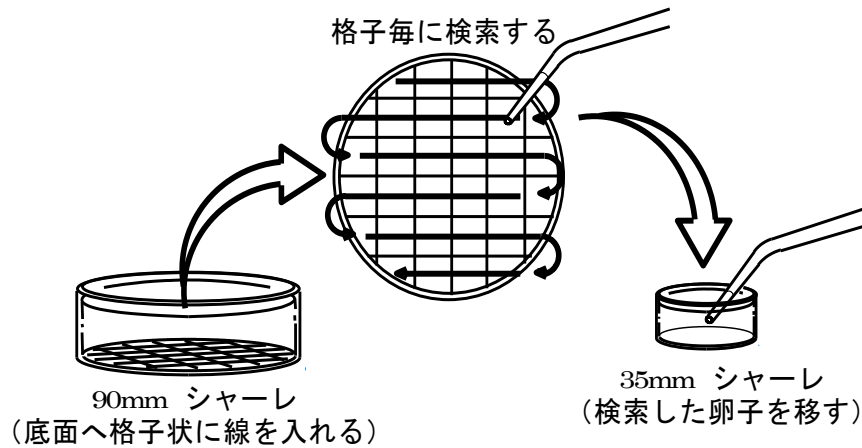


図 6. 卵子検索

- ③ 検索した卵子は、加工したパスツールピペットで吸引し、1%NCS 添加乳酸リンゲル液の入った 35mm シャーレに移す。
- ④ 35mm シャーレに回収した卵子の品質評価（鑑別）を行い、以下のように分類する。

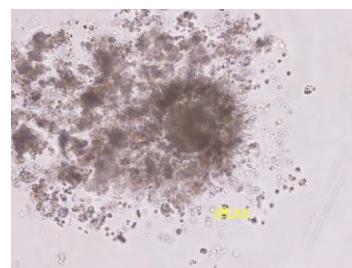
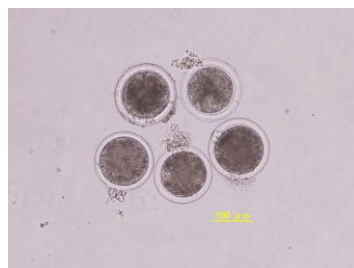
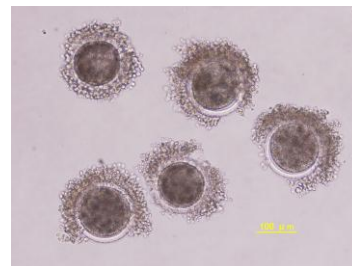
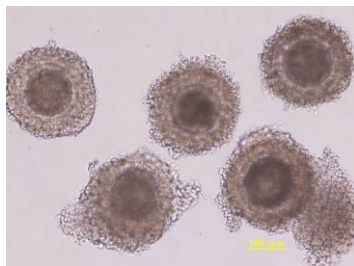


写真 3. 卵子鑑別

- A ランク：卵丘細胞が3層以上または透明帯周囲全体に付着しているもの
- B ランク：卵丘細胞が2層以下または透明帯周囲に 1/3 以上付着しているもの
- C ランク：完全な裸化卵子またはBより卵丘細胞の付着が少ないもの
- D ランク：卵丘細胞が膨化しているか蜘蛛の巣状に変性しているもの

通常、培養試験に供する卵子はAおよびBランクであるが、後継牛生産を目的とし、できる限り多くの胚盤胞を得たい場合は、CおよびDランクの不良卵子も培養する。尚、Dランクでも、細胞質が正常なものについては、胚盤胞までの発生率はA、Bランクに劣らない。逆に卵丘細胞がA、Bの形態であっても、細胞質が異常なもの（変性卵：色が薄い、細胞膜が不鮮明等）は胚盤胞まで発育しない。

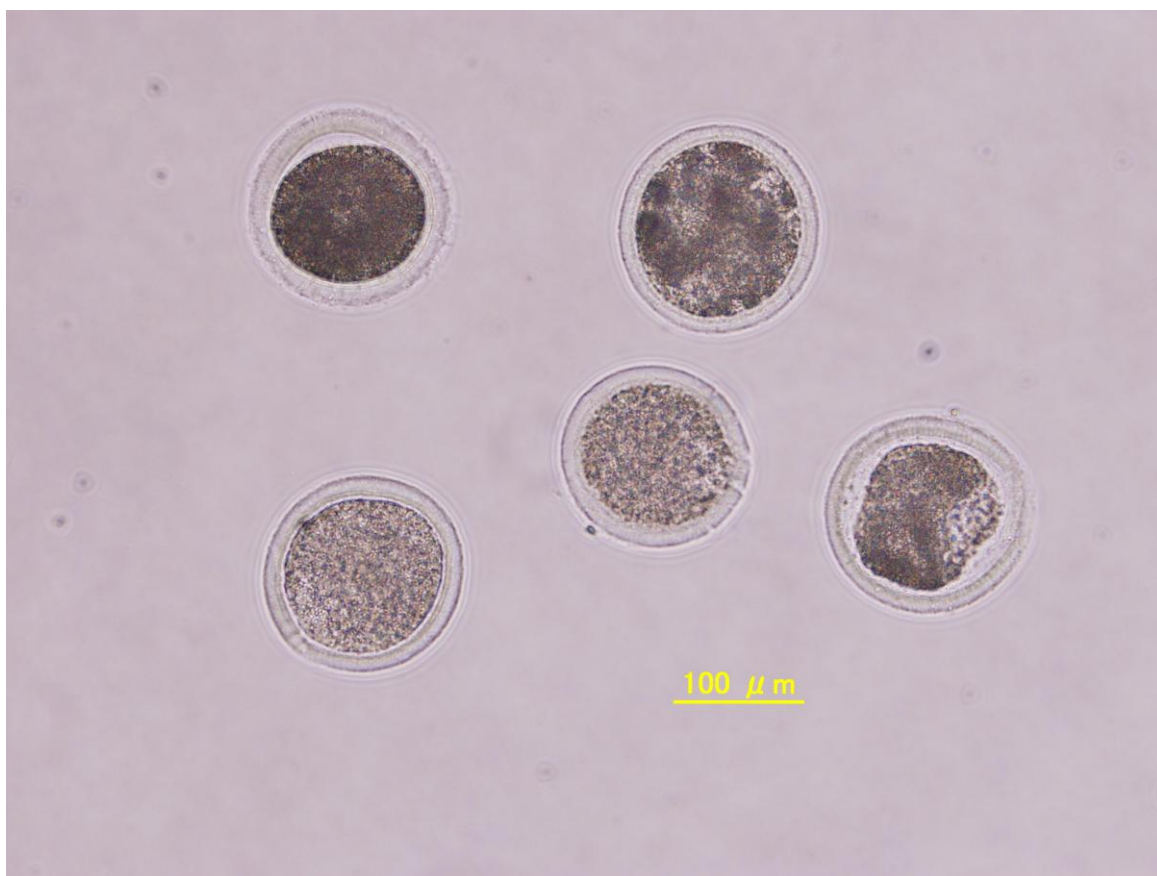


写真 4. 変性卵

3. 体外成熟培養 (In Vitro Maturation : IVM)

(1) 準備

- ① 培養液を前日または当日調製する。
- ② 35mm シャーレ (NUNC150460) にマイクロピペットで 300 μ L のスポットを作製する。
- ③ スポットの形を崩さないように流動パラフィンをシャーレの端から流し込み (4.5mL)、スポットをカバーする。
- ④ スポットにマイクロピペットで 300 μ L の培養液を追加し、総量を 600 μ L とする。
- ⑤ ドロップが完全にカバーされているか確認する。表面が流動パラフィンから出ている場合は流動パラフィンを 2、3 滴追加する。
- ⑥ 使用時まで CO₂ インキュベーターで 2 時間以上前培養する。
- ⑦ 残りの培養液を 35mm シャーレに 2.5mL ずつ分注し、流動パラフィンでカバーする (2ml)。

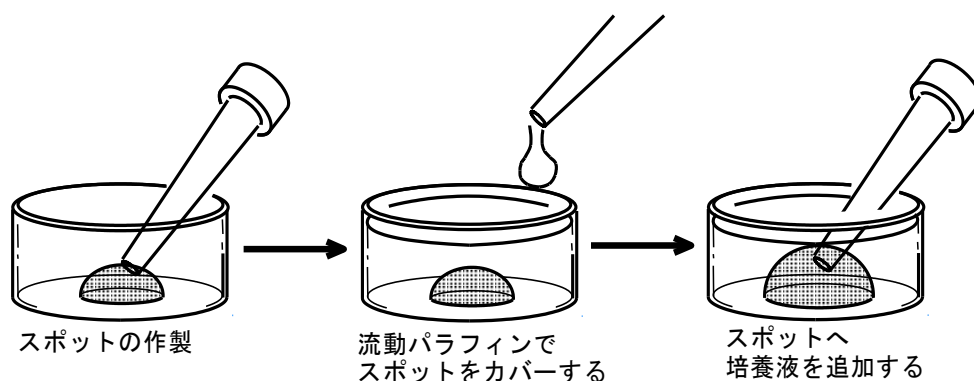


図 7. ドロップ作製法 (600 μ L)

* 培養する卵子が少ない場合は、100 μ L のドロップを 35mm シャーレに 4~5 個作製する。
100 μ L のドロップは、はじめに微小滴のスポット (約 5 μ L) を作った後、流動パラフィンでカバーし (4.5mL)、スポットに 95 μ L の培養液を追加し、総量 100 μ L とする。

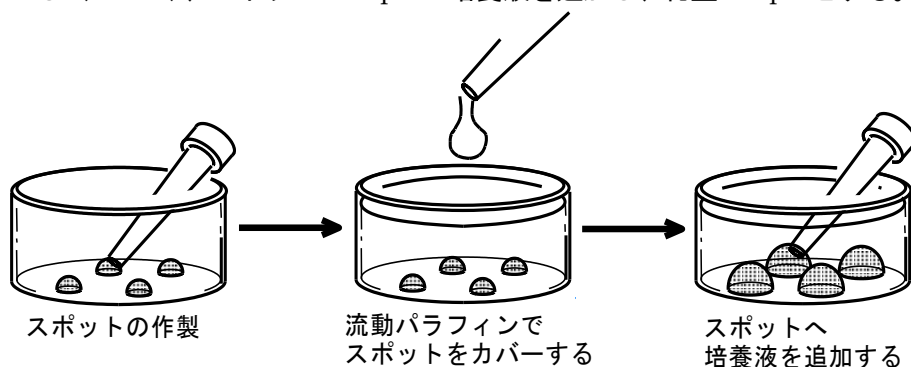


図 8. ドロップ作製法 (100 μ L)

* いずれの場合もチップの先端がシャーレの底面に触れないようにすること

(2) 培養

- ① 選別した未成熟卵子を 1%NCS 添加乳酸リンゲル液の入った 35mm シャーレで 1 回洗浄する。
- ② 洗浄液の入った 35mm シャーレで 2 回洗浄する。
- ③ 成熟培養用のマイクロドロップに以下の割合で入れる。
600 μ l ドロップ・・・80 個
100 μ l ドロップ・・・10～20 個
- ④ 38.5℃、5%CO₂ in air の気相下で 20～24 時間培養する。

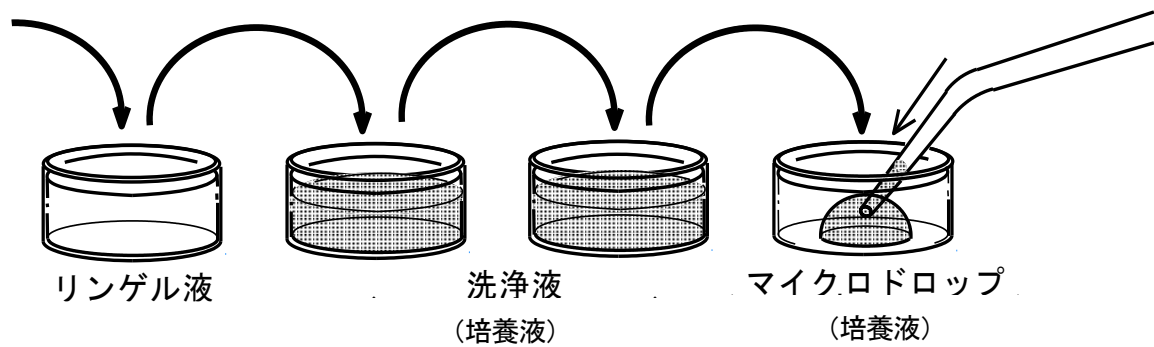


図 9. 成熟培地への卵子の導入

* 洗浄について

受精卵移植業務における「洗浄」とは、胚（卵子）を異なる培養液に移す際に胚（卵子）の周囲環境から、それまでの培養液の影響を完全に取り除くことである。成熟培地への卵子の導入を例とすると、1%NCS 添加乳酸リンゲル液を成熟培地に持ち込まないように、洗浄用の培養液で卵子の周囲環境を培養液に置き換えて（同時に剥離した顆粒層細胞等を取り除く）、成熟培養を行うこととなる。

例）成熟培地への卵子の導入

- ① 卵子は 1%NCS 添加乳酸リンゲル液中に存在する。
- ② 次のシャーレからパストールピペットで洗浄液を吸引する。
- ③ 1%NCS 添加乳酸リンゲル液中の卵子に、洗浄液を吹きかける。
- ④ 洗浄液で希釈した液と卵子を吸引する。この時はまだ卵子の周囲環境は完全に洗浄液に置き換わっていない。
- ⑤ ④の際、吸引する液量は少なく且つ多くの卵子を吸引する。これは、できるだけ卵子のみを移し、洗浄液中に 1%NCS 添加乳酸リンゲル液を持ち込まないようにするためである。
- ⑥ 卵子を洗浄液中に移す。

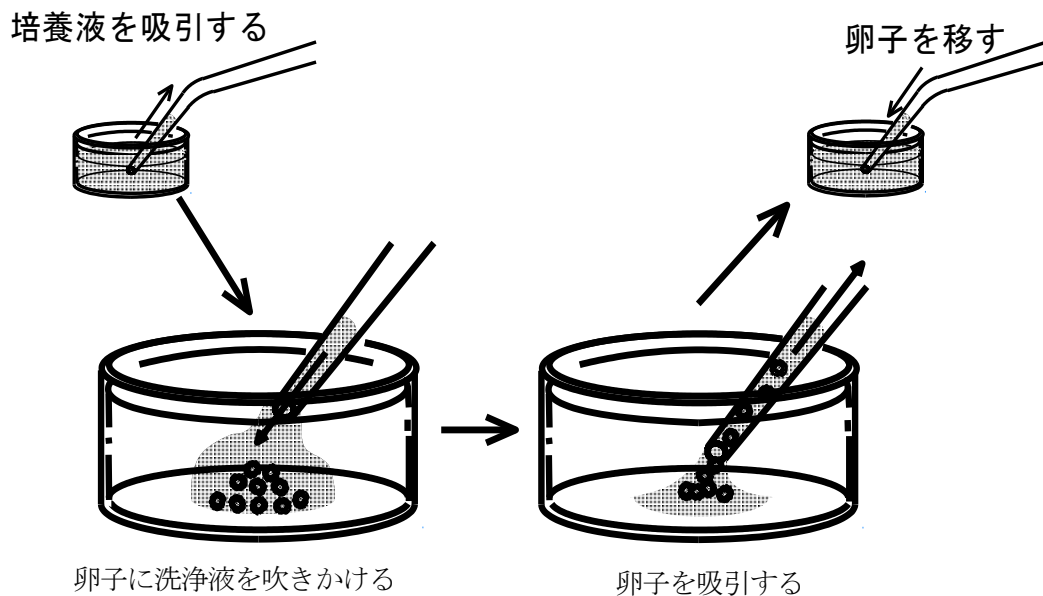


図 10. 洗浄液への卵子導入

- ⑦ 洗浄液シャーレの中で同様の操作を繰り返す。卵子とは別の位置から培養液を吸引しておき、卵子に吹きかける。この時卵子が転がるように勢いよく吹き、卵子周辺の培養液を置き換える。
- ⑧ 散らばった卵子を吸引してまとめ、シャーレ内の別の位置に移す。

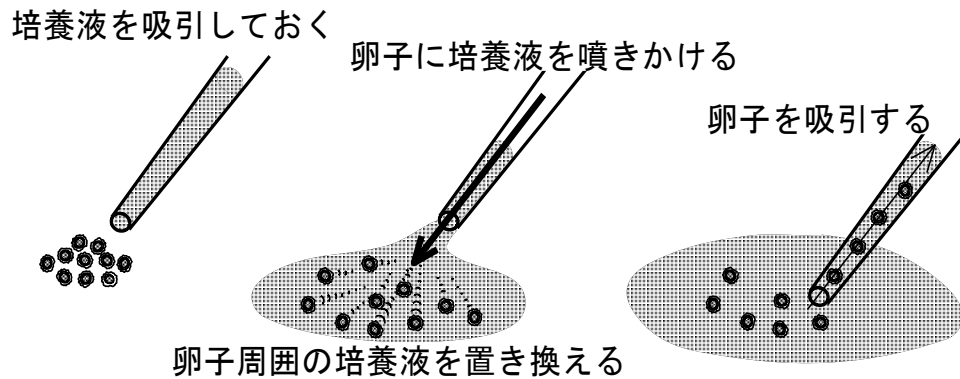


図 11. シャーレ内での卵子洗浄

- ⑨ ⑦、⑧の操作を各シャーレのA、B、CおよびDの箇所で行い、最終的に成熟培地へ移す。二枚目の洗浄用シャーレのDでの卵子の周囲環境に 1%NCS 添加乳酸リソゲル液は存在せず、培養液のみとなるようにする (図 12)。

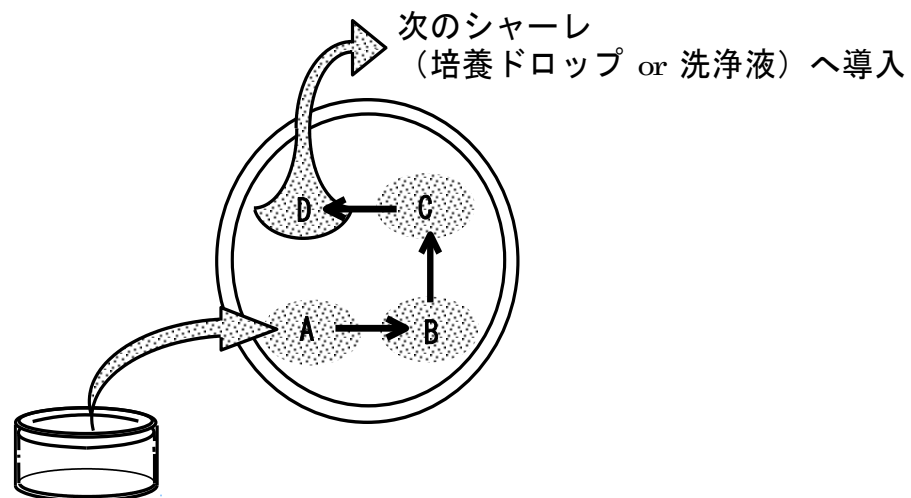


図 12. シャーレ内での卵子移動

- * この操作は体外受精以外にも基礎的な操作となるため、その概念および手法を理解しておく必要がある。

4. 体外受精 (In Vitro Fertilization : IVF)

i) 精子処理

(1) 準備

a) 90%パーコール液

- ・ 3mL を遠心管に入れ、CO₂インキュベーター内で前培養

b) 精子洗浄液 : 10mM Hypotaurin、10u/mL ヘパリン加 BO 液

- ・ 瓶等に入れ、CO₂インキュベーター内で前培養

c) 精子希釈液 : 20mg/mL BSA 加 BO 液

- ・ 遠心管等に入れ、CO₂インキュベーター内で前培養

d) 卵子洗浄液 : 10mg/mL BSA 加 BO 液

- ・ 卵子洗浄液で 35mm シャーレに 5μL のスポットを 4 つ作製し、流動パラフィンでカバーして CO₂インキュベーター内で前培養
- ・ 残りの卵子洗浄液を 35mm シャーレに 2.5~3mL 分注し、CO₂インキュベーター内で前培養

e) 3%NaCl 水溶液 (990μL を試験管に入れて室温で保持)

② 以下の器具機材を用意する。

凍結精液 1~2 本、血球計算盤 2 枚、遠心分離器、遠心管、アスピレーター、ストローカッター、メスピペット、アルコール綿花、マイクロピペット、恒温槽、カウンター、ボルテックスミキサー

*** 遠心管およびメスピペットは、予めホットプレートや恒温槽を用いて 37°C に保温しておく。**

(2) 凍結精液の融解と生存精子の選択

* 温度変化による精子活性の低下を避けるため、媒精地を作製するまではすべての操作において常に遠心管を保温する。

- ① 凍結精液を 38.5℃の温湯で融解し、遠心管中のパーコール液の表面に重層する。
- ② 遠心管を 740G（当センター機器では 2,100rpm*）で 10 分間の遠心分離を行う。
*遠心分離機の回転数は「相対遠心加速度」と「ローターの回転半径」から求める。
- ③ 上清をアスピレーターで吸引除去する（なるべくパーコール液は残さないように）。

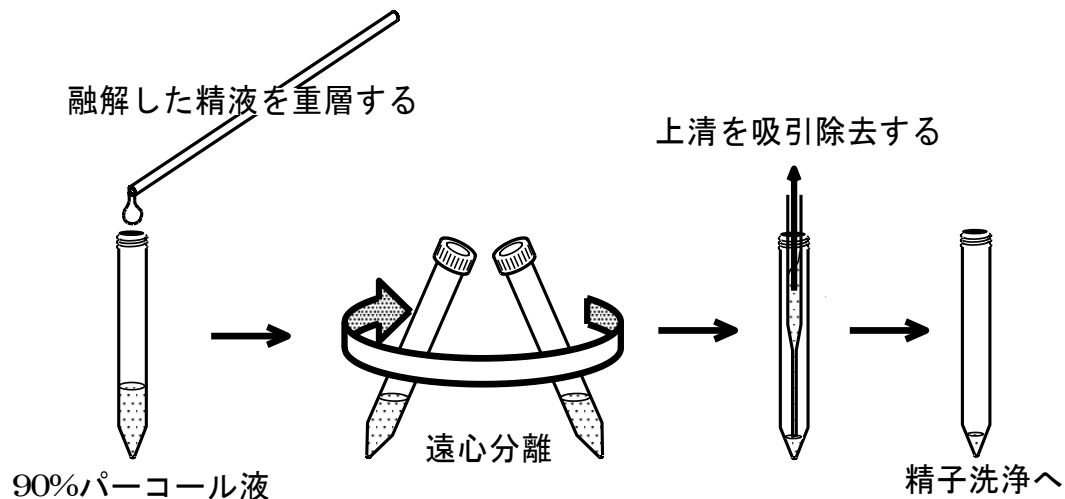


図 13. 凍結精液の融解と生存精子の選択

(3) 精子洗浄

- ① 精子が入った遠心管に精子洗浄液 6mL を加え、ピペッティングでよく混和する。
- ② 遠心管を 540G（1,800rpm）で 5 分間の遠心分離を行う。
- ③ 上清をアスピレーターで吸引除去する。
- ④ マイクロピペットで 500 μ L 前後の精子洗浄液を加え、ピペッティングをして精子を再浮遊させる(精子浮遊液)。
- ⑤ ④のマイクロピペットで精子浮遊液を吸引し(500 μ L)、さらにマイクロピペットのダイヤルを回して残りの精子浮遊液を吸引し液量を求める

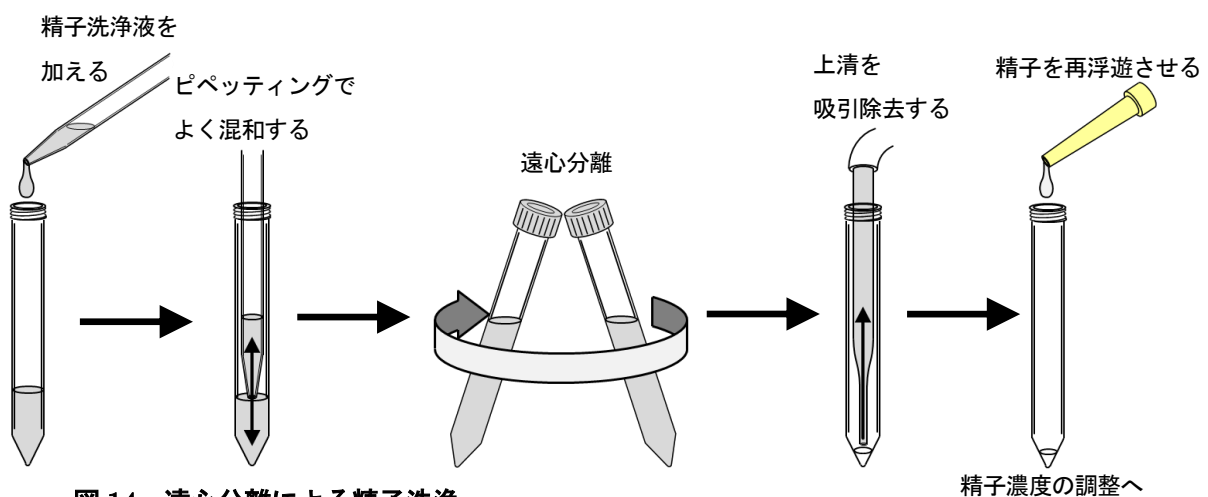


図 14. 遠心分離による精子洗浄

(4) 精子数のカウント

洗浄後の精子浮遊液内の精子数を計算するため、精子数計算溶液を調製する

- ① 3%NaCl 溶液 990 μ L に精子浮遊液 10 μ L を加えて 100 倍希釈する。
- ② ボルテックスミキサーを用いて均等に混和する。

精子数のカウント

- ① 精子数計算溶液中の精子濃度を求めるため、血球計算盤を用いて精子数をカウントする。
計算室内の 1 $\times$ 1mm のエリア中にある精子をカウントする。同じ精子を 2 回カウントしないようにする。
- ② 血球計算盤は 2 枚用意し、その平均精子数を以下の計算に用いる。

* 血球計算盤は、目盛りの刻まれ方と計算室の深さによっていくつかの種類がある。

一般的にトーマ(Thoma)が多く用いられるが、ノイバウエル(Neubauer)やビルケルチュルク(Burker-Turk)も計算室の深さがトーマと同じく 0.1mm で、中央部に 1 $\times$ 1mm の計算室があるので媒精時の精子数カウントに使用可能である。なお、最近では使い捨て型血球計算盤も一般的に利用されている。

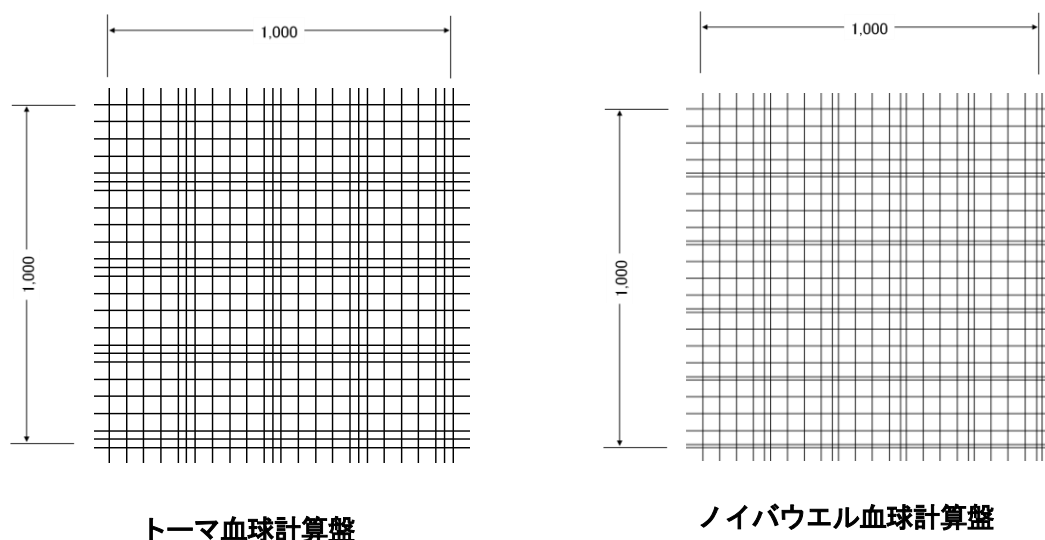


図 15. トーマおよびノイバウエル血球計算盤の計算室 (1 $\times$ 1mm のエリア)

(5) 精子濃度の調製

精子数計算溶液調製のために 10 μ L 吸引した後の精子浮遊液量 (mL) を「Sus」として以下の計算に用いる

① 第一希釈：精子濃度を 6 $\times 10^6$ /mL に調製

精子濃度が 6 $\times 10^6$ /mL になるように精子洗浄液を加えて希釈する
Sus に精子洗浄液を加えたものを**第一希釈液**とする

*まとめた計算式は以下の通り

$$\text{精子浮遊液に加える精子洗浄液量(mL)} = (\text{Ave}/6) \times \text{Sus} - \text{Sus}$$

Ave=精子数 (2 回の平均) Sus=精子浮遊液量 (mL)

② 第二希釈：精子濃度を 3 $\times 10^6$ /mL (最終濃度) に調製

精子濃度が 3 $\times 10^6$ /mL になるように精子希釈液を加えて希釈する
第一希釈液の 1/2 の精子濃度に調製するため、第一希釈液と等量の精子希釈液を加える
(等倍希釈)

$$\text{第一希釈液に加える精子希釈液(ml)} = (\text{Ave}/6) \times \text{Sus}$$

*①と②をまとめた計算式は以下の通り

$$\text{最終液 (第二希釈液) (ml)} = \text{Sus} + \underbrace{(\text{Ave}/6) \times \text{Sus} - \text{Sus}}_{\text{第一希釈液}} + \underbrace{(\text{Ave}/6) \times \text{Sus}}_{\text{第二希釈液}}$$

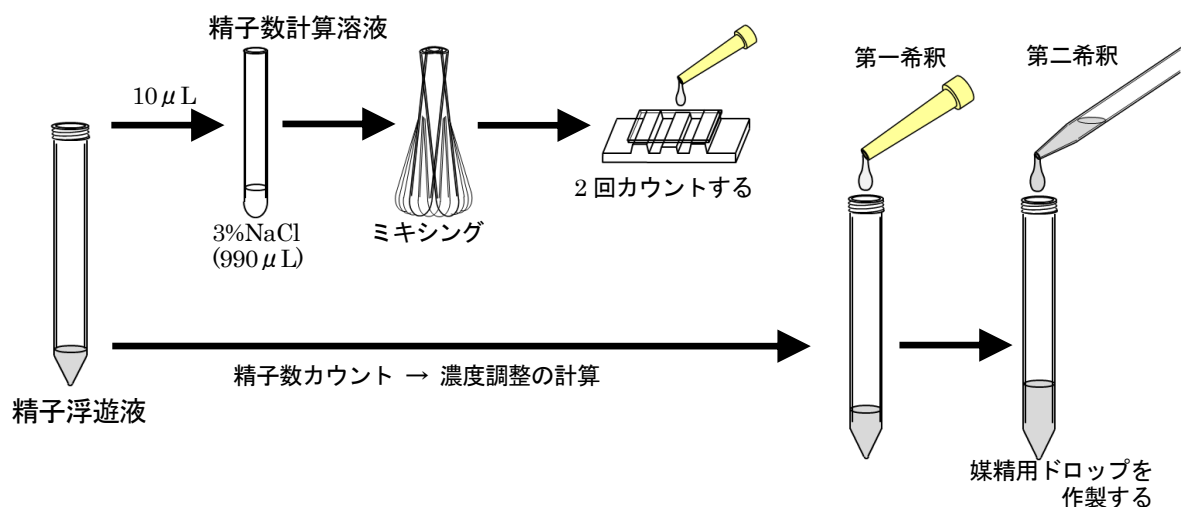


図 16. 精子数の計算および希釈

以上、第一、第二希釈の処理を経て各試薬および精子濃度が表のようになる。

表 2. 各試薬および精子濃度

試 薬	調 製 時		第一希釈液	第二希釈液 (媒精地に使用)
	精子洗浄液	精子希釈液		
BSA	—	20mg/mL	—	10mg/mL
Hypotaurin	10mM	—	10mM	5mM
ヘパリン	10u/mL	—	10u/mL	5u/mL
精子濃度	—	—	6×10^6 cell/mL	3×10^6 cell/mL

* 精子処理時の最適な最終精子濃度およびヘパリン濃度は種雄牛毎に異なるため、予め検査する必要がある。また、この方法で初期卵割率が低い場合は、媒精時間の延長もしくは精子濃度を上げる等を行い、初期卵割率を改善する。ただし、精子濃度を上げると多精子受精が増えることに留意する必要がある。

ii). 媒精

(1) 成熟卵子と精子の共培養

- ① 第二希釈液（精子濃度 3×10^6 /mL）を、予め CO_2 インキュベーター内で前培養していた媒精用シャーレ（卵子洗浄液で 5 μ L のスポットを作ったもの）に 95 μ L ずつ追加し、100 μ L の媒精用ドロップを作製する。
- ② 成熟培養した卵子を卵子洗浄液で 2 回洗浄する。
- ③ 洗浄した卵子を媒精用ドロップに入れる（約 20 個／1 ドロップ）。この時、媒精用ドロップに持ち込む卵子洗浄液によって精子濃度が低下するのを防ぐため、できるだけ卵子のみを移すようにする。
- ④ 38.5°C、5% CO_2 in air の CO_2 インキュベーター内で 5～6 時間培養する。

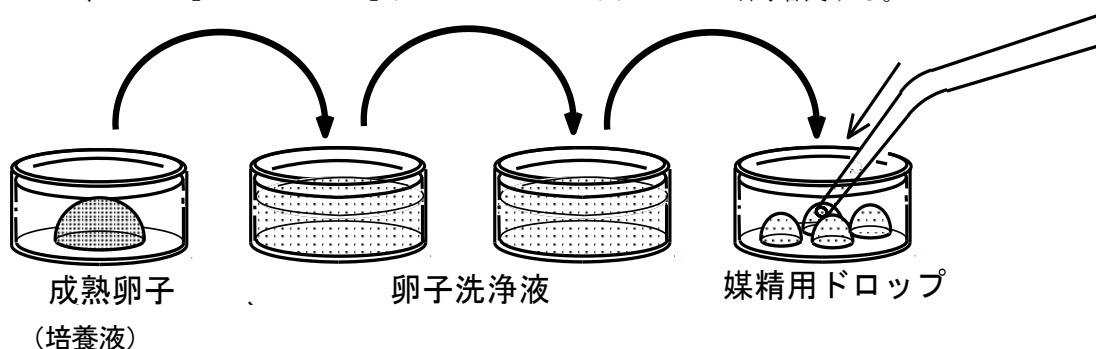


図 17. 媒精地への成熟卵子の導入

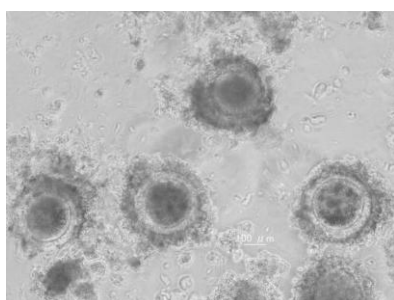


写真 5. 媒精中の卵子

5. 体外発生培養 (In Vitro Culture : IVC)

(1) 培養液

培養液：5%NCS 加 CR1aa (+0.25mg/mL リノール酸アルブミン)

*または BO-IVC 等の市販培養液

培養方法：卵丘細胞との非共培養

38.5℃、5%CO₂ in air

80 個/600 μL または 20 個/100 μL

(2) 媒精後の卵子洗浄

媒精後の卵子は、卵丘細胞および精子が付着している。これらを発生培養に持ち込むことによって多精子侵入等の危険性が高くなるので、卵子を洗浄する際これらの細胞を剥離する必要がある。

- ① 発生培養液を用いて洗浄する。
- ② 卵子を媒精用ドロップから取り出し、洗浄液 (2 枚) でピペッティングにより洗浄する。透明帯の外径よりやや太めのピペットを作製し、複数の卵子と一緒にピペッティングし、卵丘細胞を剥離する。

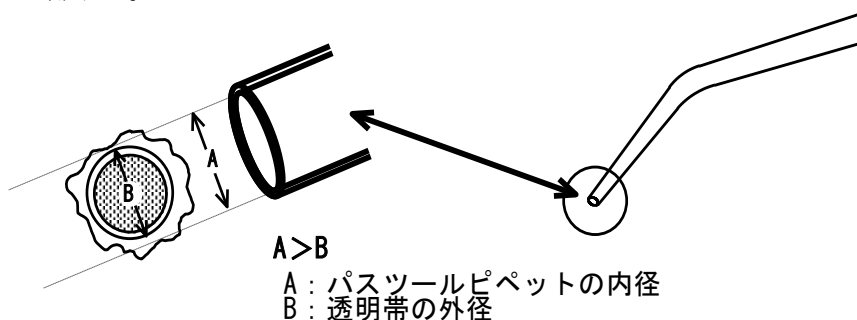


図 18. 卵丘細胞剥離用ピペットの作製

- ③ 卵子を発生培養のドロップに移す。
- ④ 媒精日を 0 日目として 8 日間発生培養する。

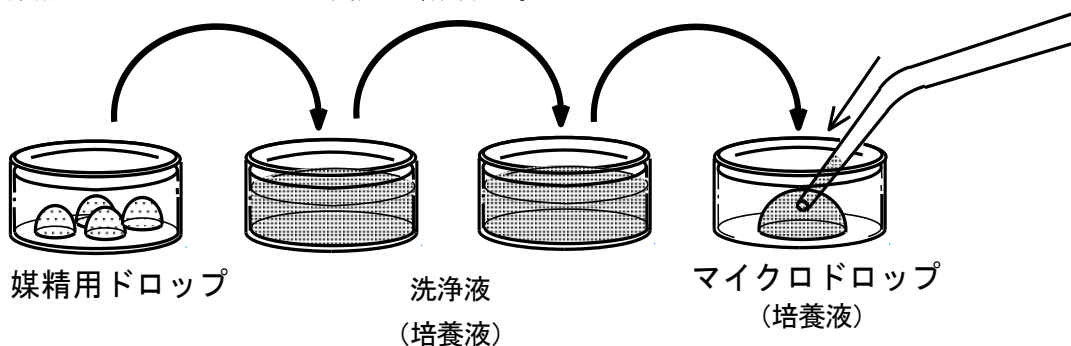


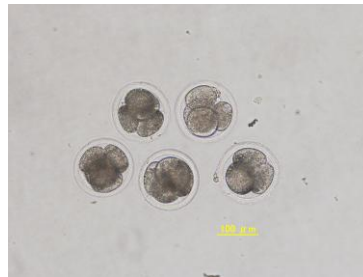
図 19. 発生培地への卵子の導入

6. 初期発生検査（媒精後 48 時間）

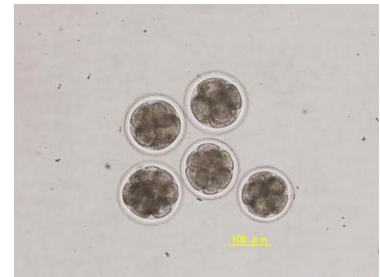
胚の発育状態（割球数）により、「変性卵」、「1 細胞期胚（未受精卵）」、「2-4 細胞期胚」および「5 細胞以上期胚」のステージに分類する。



2 細胞期胚



4 細胞期胚

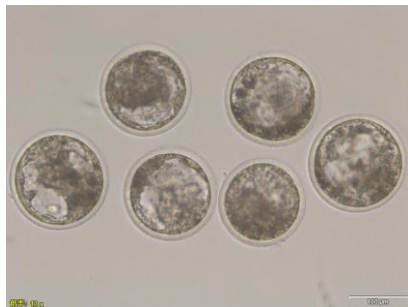


5 ≤ 細胞期胚

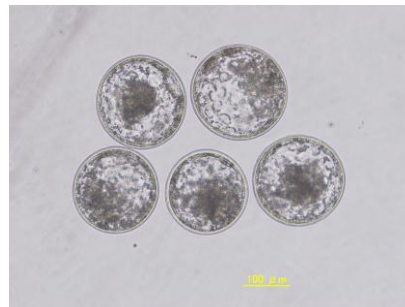
写真 6. 初期発生検査時の胚

7. 胚盤胞発生検査（媒精後 7～8 日目）

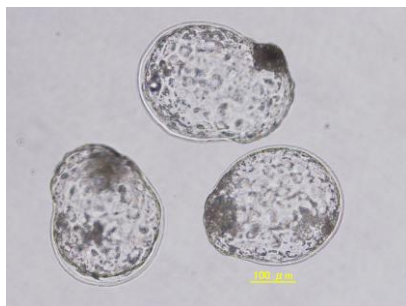
胚のステージおよび品質と胚盤胞の個数を検査する



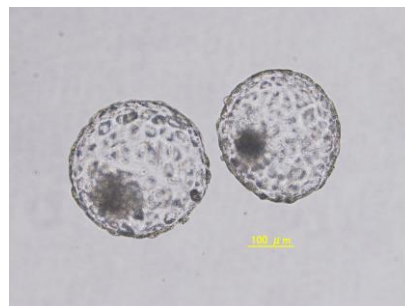
胚盤胞



拡張胚盤胞



脱出中胚盤胞



脱出胚盤胞

写真 7. 胚盤胞発生検査時の胚

超音波ガイド・経膣生体卵子吸引技術（Ovum Pick Up : OPU）

本技術は、ウシ生体から卵子を吸引採取する技術であるが、肉眼や直腸検査による卵巢触診では不可能である小卵胞の観察が必要となるため、超音波画像診断装置を用いて施術を行う。この超音波画像診断装置の使用法の是非により結果が左右されるため、本マニュアルでは手技の基礎を中心に説明する。

＜超音波画像診断装置を用いた卵巢観察＞

1. 直腸用のプローブ（リニアタイプ）を用いた卵巢観察

・ 卵巢観察におけるイメージ

卵巢を観察する際にプローブを卵巢上に保持するが、そのときに画像上に映し出される卵巢は、「プローブという刃物で切断した卵巢の断面図」というようにとらえる。プローブ部分の中心線を「刃」とイメージし、卵巢その他の組織、器官を「切断」する。そのプローブがリニアタイプでもコンベックスタイプでも考え方は同様である。

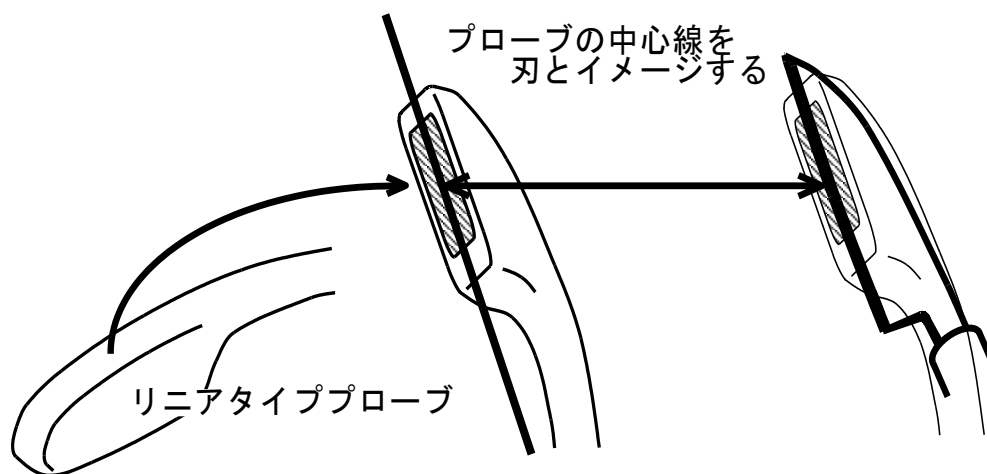
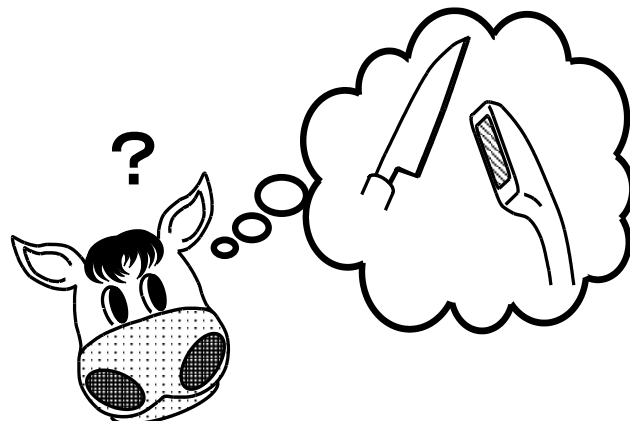


図 20. リニアタイププローブのイメージ



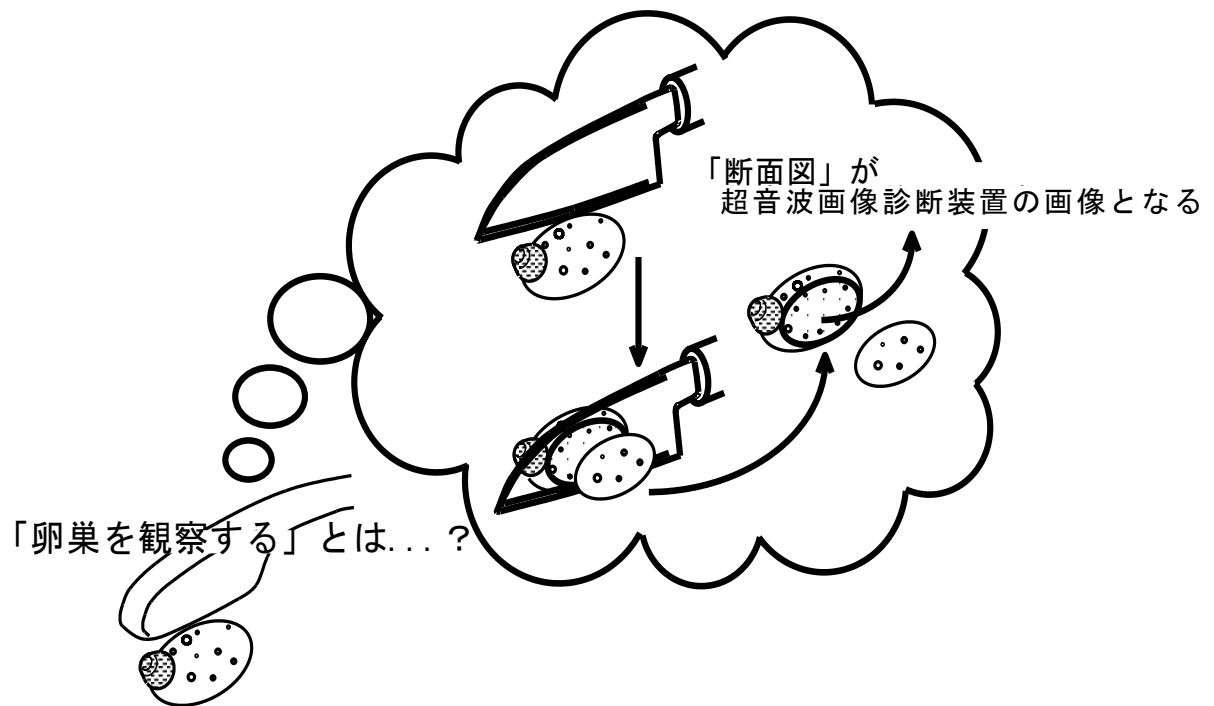


図 21. 卵巣切断のイメージ

卵巣を切断する場合は、端を薄く切断すれば小さい断面図が、中央を切断すれば大きい断面図が画像に出力される。また、卵巣内の組織である黄体や卵胞についても同様に、端を切断すれば小さく、中央ならば大きく出力される。

卵巣は、表層にある卵巣皮質と中心（核）にある卵巣髄質に分けられ、卵胞は皮質に存在する。したがって、卵巣の中央を切断した場合はその切断面の中央部は卵胞が存在しない。端を薄く切断した場合は断面図の面積は小さくなるが、卵胞は均等に存在する。

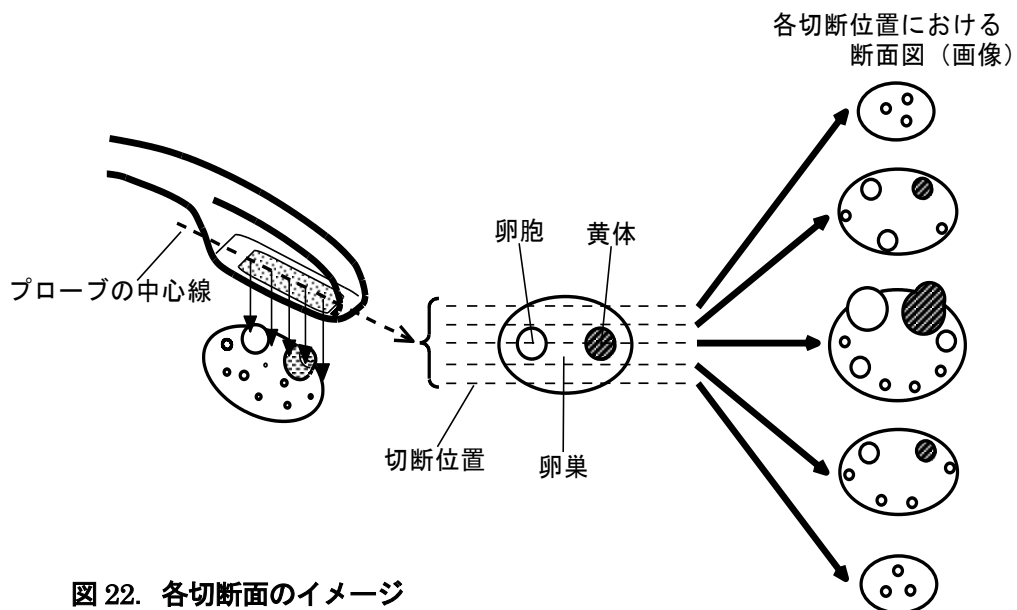


図 22. 各切断面のイメージ

図 22 の切断方法の卵巣の位置とプローブの動きの関係は図 23 の左図のようになるが、他の切断方法として図 23 の右図のようにコードを軸にしてプローブを回転させる方法もある。状況により使い分けて目的にあった画像を映し出す。

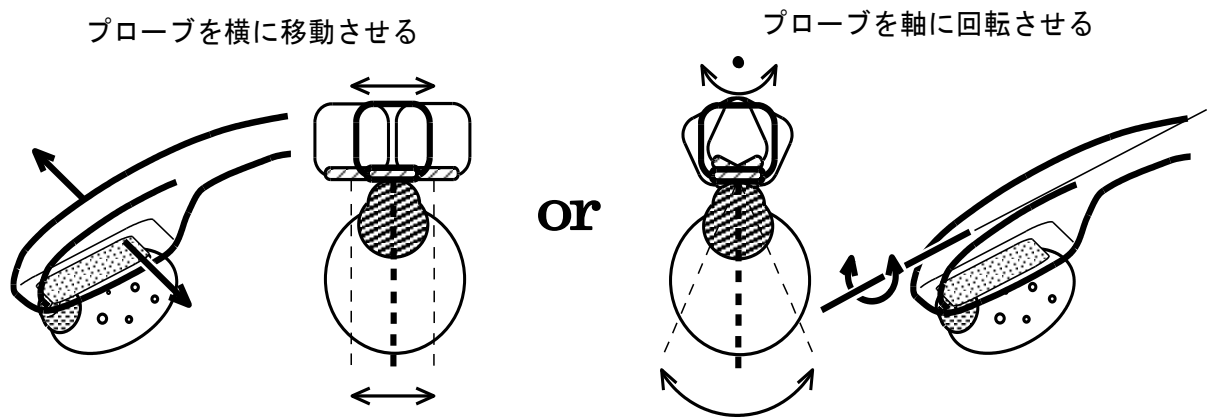


図 23. プローブによる切断方法

2. 経腔プローブ（コンベックスタイプ）を用いた卵巣観察

現在 OPU に用いられている経腔プローブのほとんどがコンベックスタイプである。プローブのタイプが異なっても、「切断 → 画像出力」の考え方は同様である。ただし、映し出される画像は、コンベックスの場合は図 24 のように扇形となる。超音波画像診断装置に映し出される画像は、プローブの位置により前後左右反転したものが4通り設定できる。術者はいずれかを選択し、施術することが出来る。本マニュアルでは図 24 の左図のような超音波診断画像を基に技術を説明する。

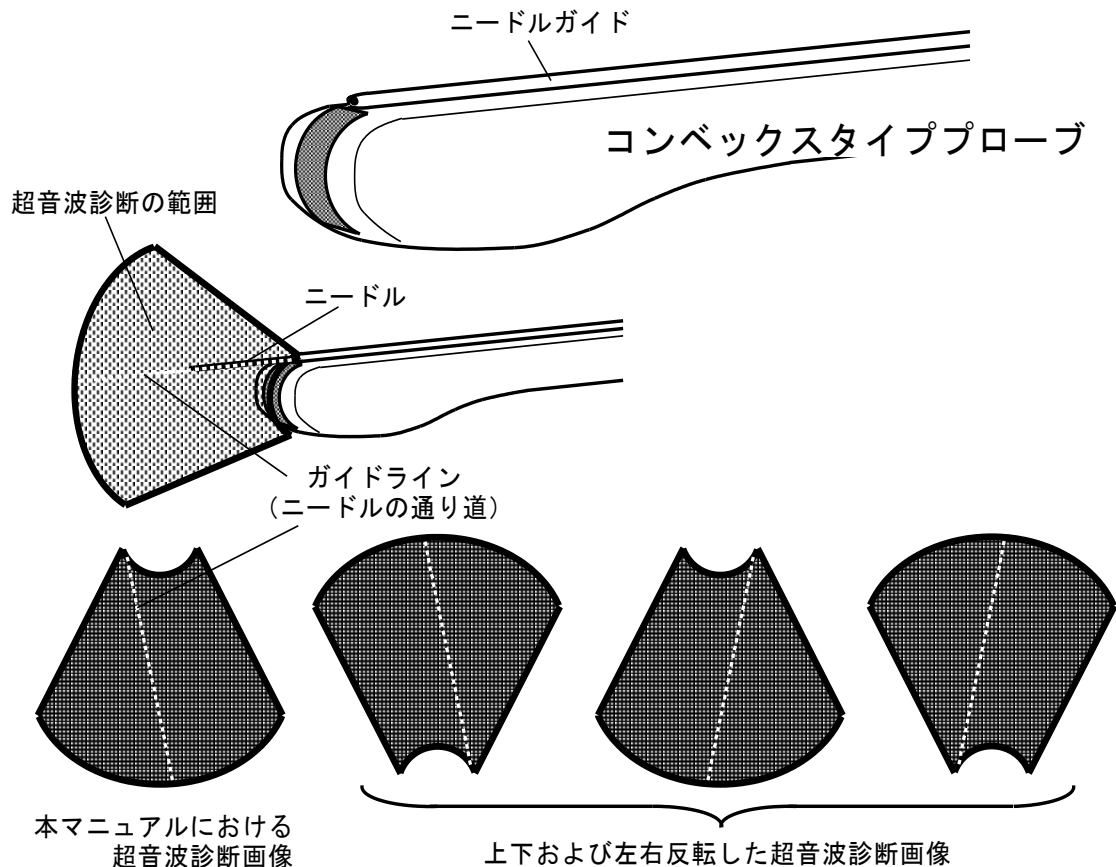


図 24. コンベックスタイププローブとその超音波診断画像

・ 卵巣観察におけるイメージ・卵巣の映り方、映し方

プローブと卵巣の位置関係がAおよびBの場合、それぞれの画像は下の図のようになる。経膈プローブを OPU 等に用いる際は（採卵針を用いる場合）、採卵針が通る目印となる「ガイドライン」を超音波画像上に表示する。

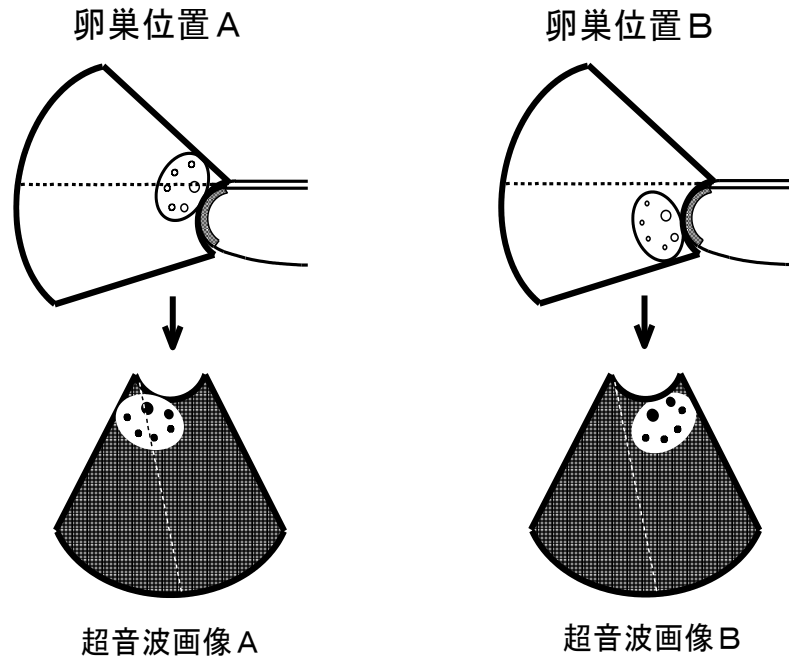


図 25. 卵巣位置とその超音波画像

楕円形の形状である卵巣をプローブへ保定する際は、卵巣の向きにより大きく分けて3通りある。それぞれの場合の超音波画像は図 26 の通りとなる。

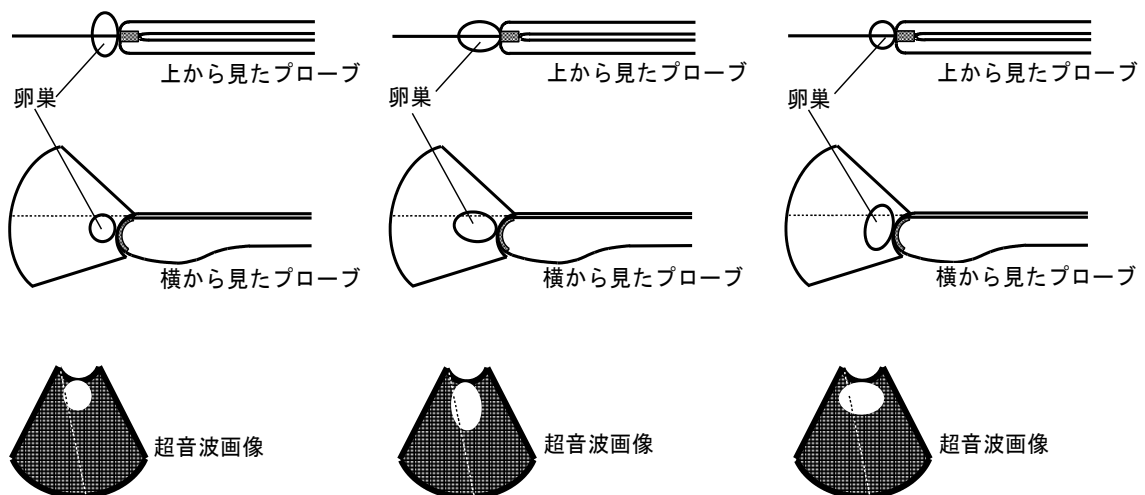


図 26. 卵巣の向きとその超音波画像

・ 卵巣の保定方法

前述の卵巣画像を映し出すには、直腸検査における卵巣の触診と同様の操作を行って卵巣をプローブに保定する必要がある。保定方法には大きく2通りある。

保定方法A

比較的簡易に保定出来る方法。卵巣を握るようにしてプローブに接触させる。卵胞数をカウントする際は、図のように左右に卵巣を動かす。卵子吸引の際は、さらに上下への卵巣移動を加えて施術する。

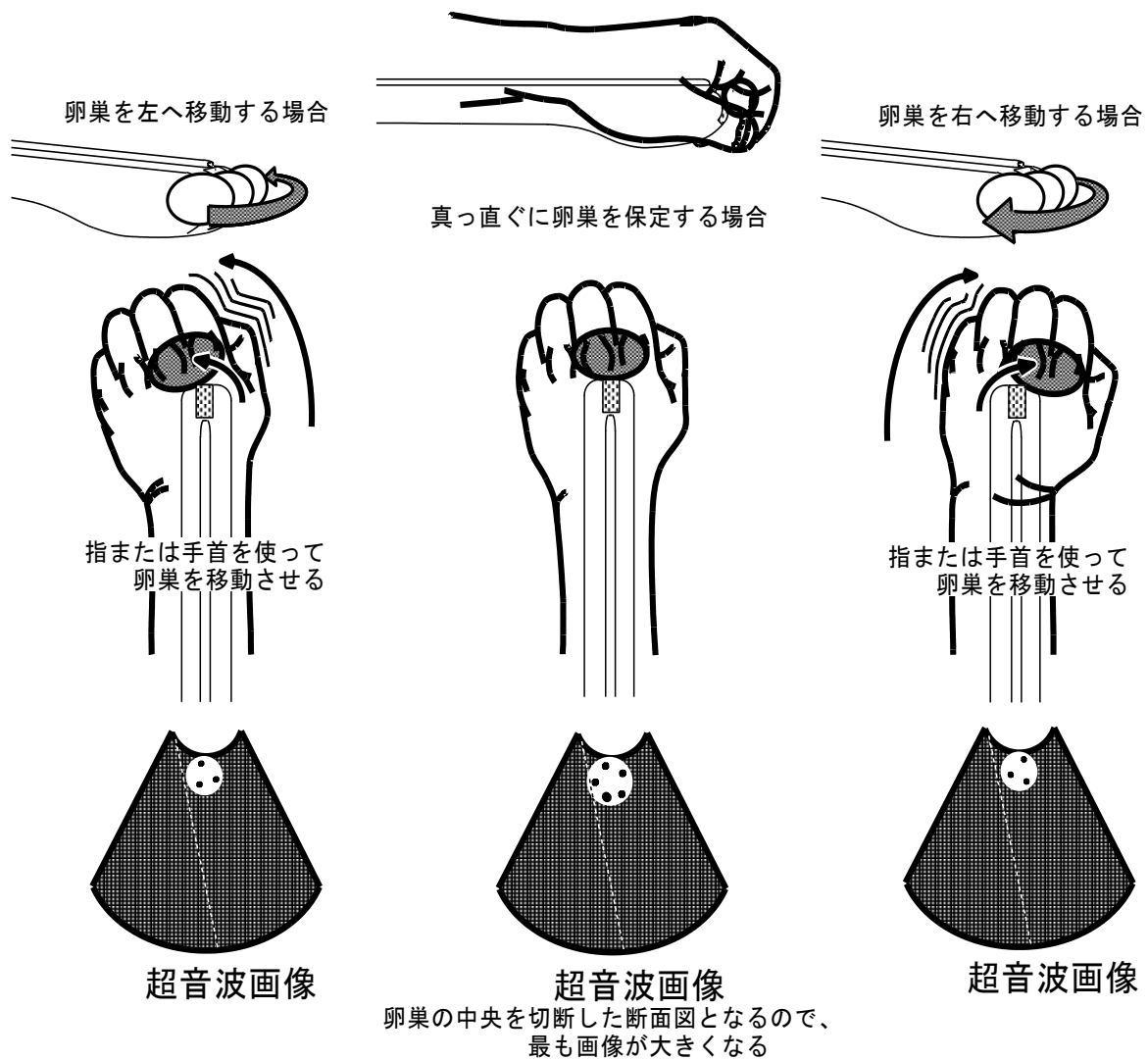


図 27. 保定方法A

保定方法B

保定方法Aの場合、出力される卵巢画像はほぼ円形となる。これに対して楕円形に出力した場合は、断面積が大きく、さらに出力される卵胞数も多くなるというメリットがある。卵胞の位置によっては保定方法Aのみでは吸引採取が困難な卵胞が存在することがあるため、保定方法Bを併用して施術する必要がある。

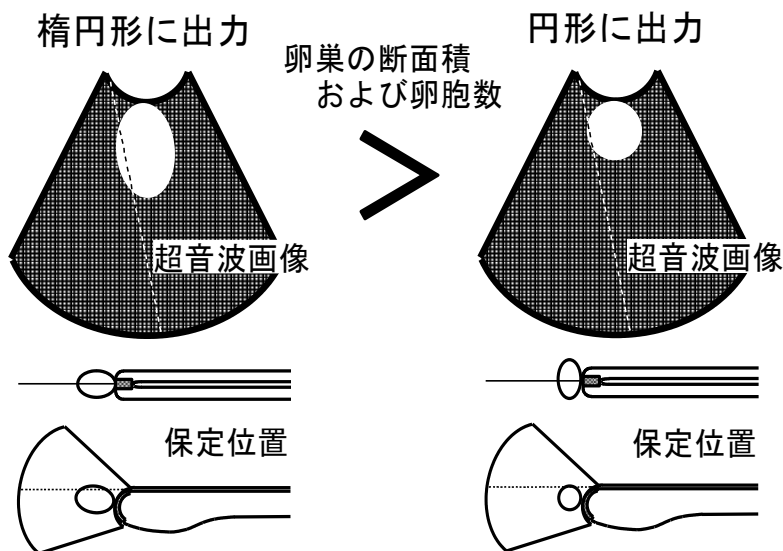


図 28. 画像から保定方法への検討

卵巢を楕円形に出力する保定方法を保定方法Bとする。保定方法Aが卵巢「握る」イメージであったのに対し、保定方法Bは卵巢を「摘む」イメージで保定する。

この超音波画像を映し出すには...

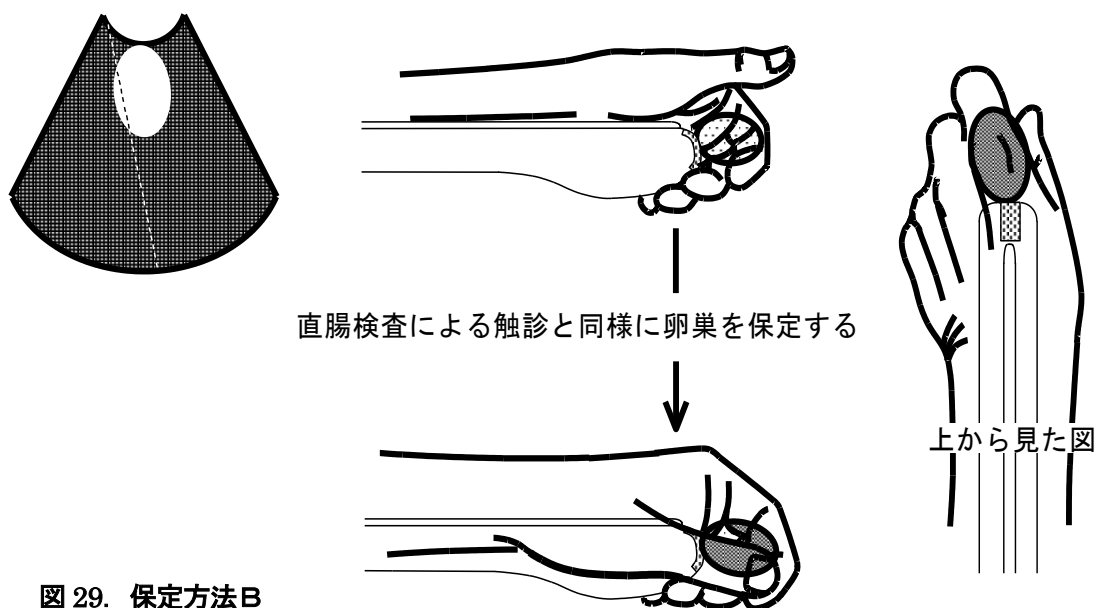


図 29. 保定方法B

保定方法AとBの比較

保定方法Aは、握るようにして卵巣をプローブに保定するため卵巣への力点が多く、力が入りやすく比較的固定しやすい。一方保定方法Bは、卵巣を摘むようにしてプローブに保定するため、中心へ向かう力点の方向が多く卵巣を動かしやすい。両方法に優劣は無く、目的および状況によって使い分ける。

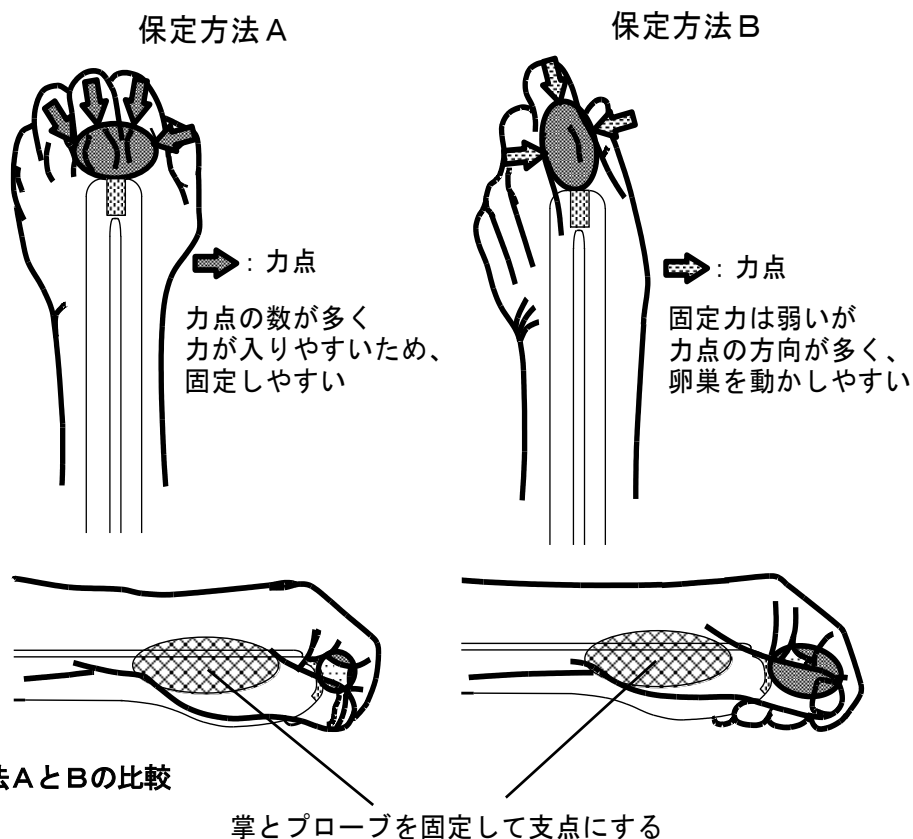


図 30. 保定方法AとBの比較

直腸プローブ使用時は卵巣を動かさないでプローブを動かして卵巣を映し出したが、経膣プローブの場合はその逆となる。直腸検査の要領で卵巣を保持し、膣壁を介してプローブに接触させる。卵巣を切断する場合は、卵巣を上下左右に動かす。膣に挿入したプローブは原則として左右に動かさず、挿入および抜去する際の前後の動きのみとなる。

卵巣を動かして画像を映し出す

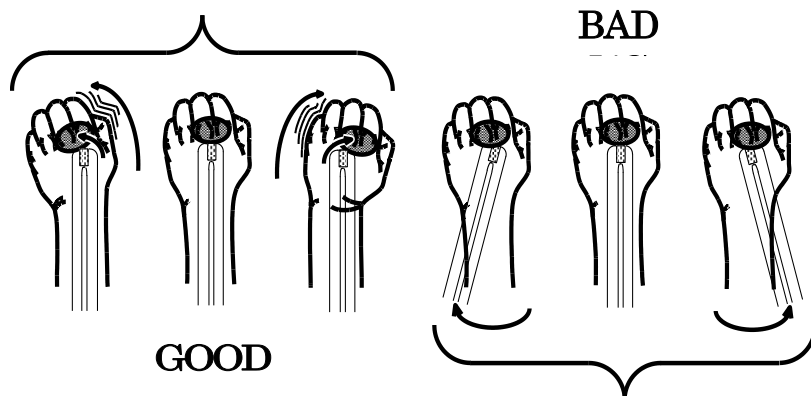


図 31. 経膣プローブにおける切断の基本

<卵子吸引>

1. 採卵針の形状および卵胞液の吸引方式

現在一般に用いられている採卵針の形状および卵胞液の吸引方式には大きく分けて4種類ある。採卵針の形状では、長さ 500mm 前後の針（長針）と長さ 50-100mm 前後の針（短針）に分けられる。卵胞液の吸引方式は、one-way 方式と two-way 方式に分けることができる。現在では使用する採卵針、プローブ、ガイドおよび付属する部品が両方式で共通ではなく、またこれらの機材はいずれも高価なものであることから、購入前にどちらの方式にするかを十分検討する必要がある。

吸引方式は、採取した卵子に対するダメージおよび吸引採取の操作性（針内部での血液凝固等）を考慮すると two-way 方式の方が one-way 方式よりも有効と思われるが、吸引装置および採卵針が高価である。当センターでは、我々も開発に携わった⁵⁾one-way 方式の COVA ニードル（ミサワ医科工業）を用いている（写真 8）。この針の特徴としては、針先が鈍角であり卵胞液の吸引の効率が良いこと、針先までブラスト加工が施してあり針先まで超音波画像に映ることおよび針ヘシリコンコートが施され、穿刺性が良いことがあげられる。

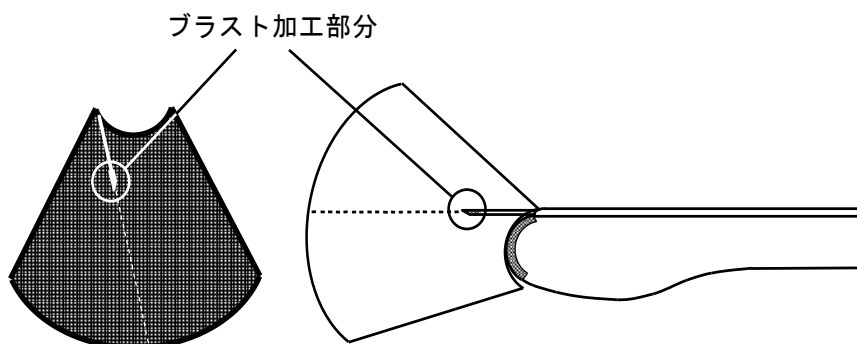
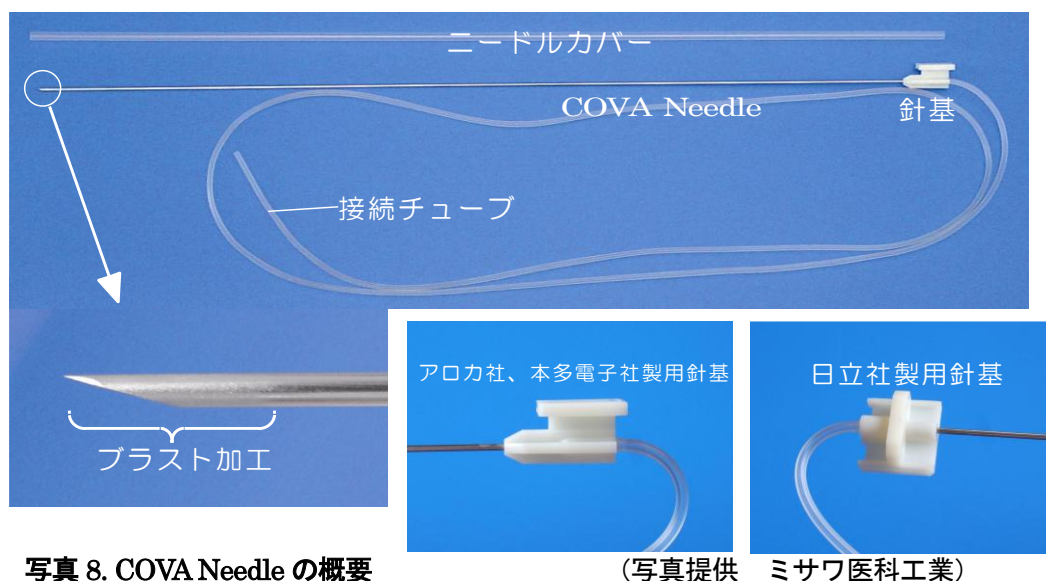


図 32. ブラスト加工部分の超音波画像イメージ

2. 腔壁への穿刺

プローブは腔内にあるため、卵胞を吸引するためにはまず採卵針を腔壁へ穿刺し、腹腔内へ貫通させる必要がある。そのためにはプローブ、腔壁および卵巣を密着させて、卵巣の中心に向けて採卵針を穿刺する。次に採卵針を腹腔内に残したまま（腔壁を貫通したまま）卵巣から一旦採卵針を引き抜き、卵巣を移動させる（図 33）。

10 個程度の卵胞の吸引を終了するまでは、このように採卵針を腔壁から引き抜かず、腹腔内に留めておく。

3. 卵胞の移動

針先端は画像上のガイドライン上を通るため、卵巣を動かしながら、吸引しようとする卵胞をガイドライン上に移動させ、採卵針を穿刺し、卵胞液ごと卵子を吸引採取する。図 34 はプローブ下部に位置している卵胞をガイドライン上に調整するものである。卵巣がプローブ上部にあれば、卵巣を下ろしつつ卵胞位置を調整する。

4. 吸引圧

吸引圧は、低すぎると卵子の採取率が低下し、逆に高すぎると採取した卵子の卵丘細胞が剥がれ、裸化卵子が増加する。吸引圧は、35～100mmHg または吸引量として 20～36ml/min が用いられているが、吸引液の動きは、採卵針および接続したチューブの太さによって異なるので、食肉処理場由来の卵巣等で事前にその吸引装置の最適な吸引圧を検査する必要がある^{6,7)}。また、吸引装置によっては、上記の吸引圧では全く卵子の吸引ができないものもあるので、この事前のチェックは重要であり、90%以上の採取率を示す吸引圧を設定することが望ましい。家畜改良センターでは富士平工業社製の FV6 を用いており、吸引圧を 100～120mmHg（吸引量として 18～22ml/min）に設定し、OPU を実施している。

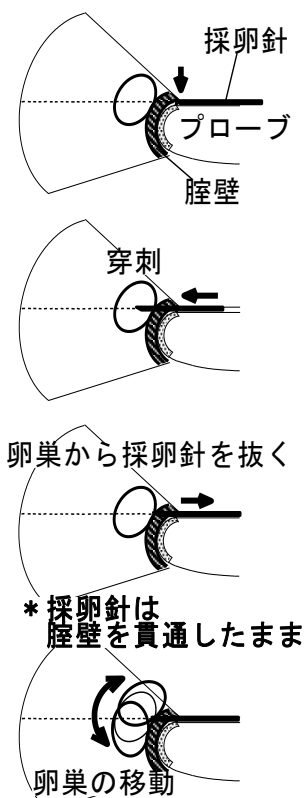


図 33. 腔壁への穿刺

卵胞をガイドラインに
合わせるには...

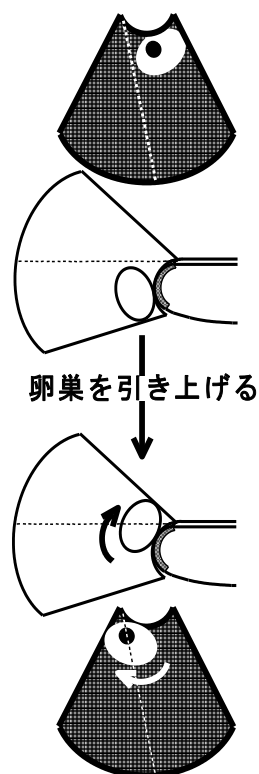


図 34. 画像を見ながらの卵巣の移動

5. 連続した卵子吸引

卵巢には複数の卵胞が存在し、その全てを吸引する。また、施術時間の短縮や供卵牛へのダメージを軽減するため、一回の腔壁への穿刺で複数の卵胞を吸引する。そのため、卵巢の移動と採卵針の穿刺、吸引を繰り返す。

例として、卵巢内の卵胞Aを初めに吸引し、次に卵胞Bを吸引する操作を解説する。

ニュートラル1

卵胞Aをガイドラインに調整する。

穿刺

卵胞A内へ採卵針を穿刺する。先端のイメージが卵胞内に入っていることを確認する。

吸引

吸引ポンプは陰圧になっているため、自動的に卵胞液ごと卵子を吸引採取する。その際、吸引によって卵胞が小さくなっていくのを確認する。

ニュートラル2

一旦採卵針を引く。その際、吸引によって卵胞が無くなっていることを確認する。

卵巢の移動

卵胞Bをガイドラインに調整する。

→ ニュートラル1に続く。

卵巢の位置および動き 超音波画像

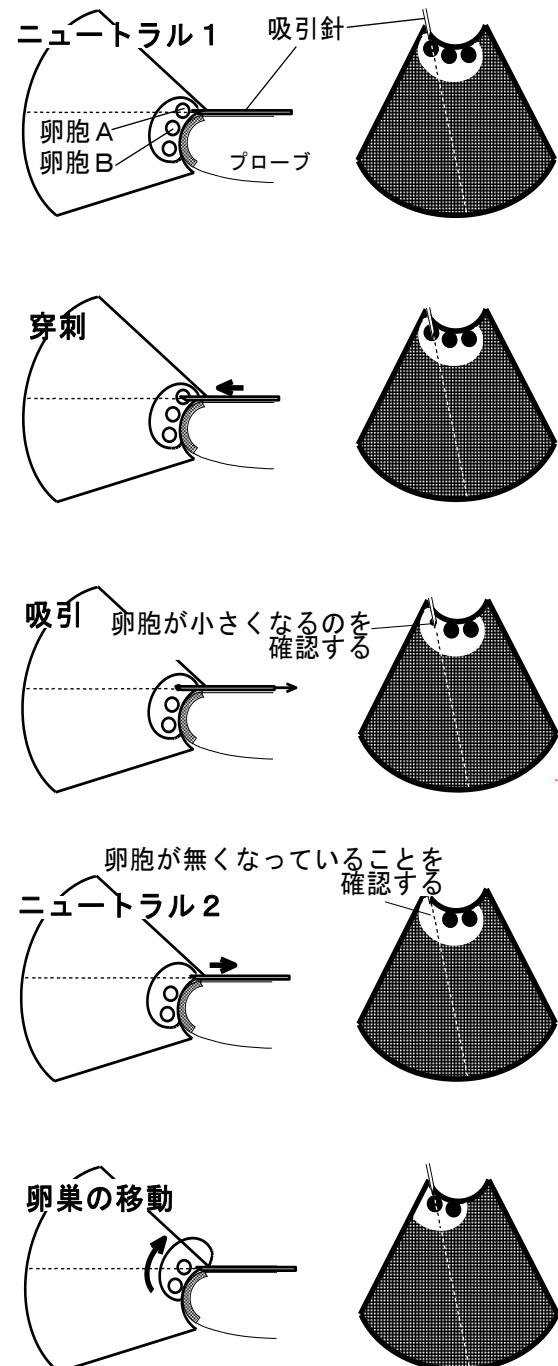


図 35. 連続した卵子吸引

6. 複数の卵胞吸引

さらに複数の卵胞を吸引する際は、どの卵胞から吸引するかが問題となる。

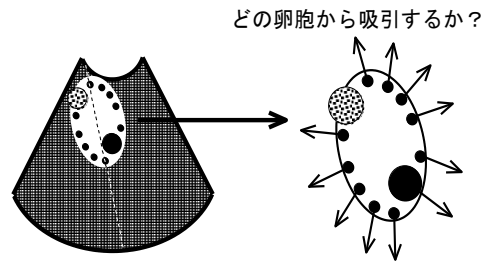


図 36. 複数の卵胞吸引

図 45 のように小中卵胞と大卵胞が存在している場合、以下（図 46）のように施術する。

- ① 超音波画像を上下に分けている点線より上（プローブ側）の小中卵胞を吸引する。
- ② 卵巣の向きを約 180 度変える。
- ③ 残りの小中卵胞を吸引した後、大卵胞を吸引する。

*** 吸引しようとする卵胞がプローブから離れるほど探卵針が卵胞からずれやすい。したがって、針を移動させる距離（ニードルガイドから針先までの距離）をなるべく短くする必要がある。**

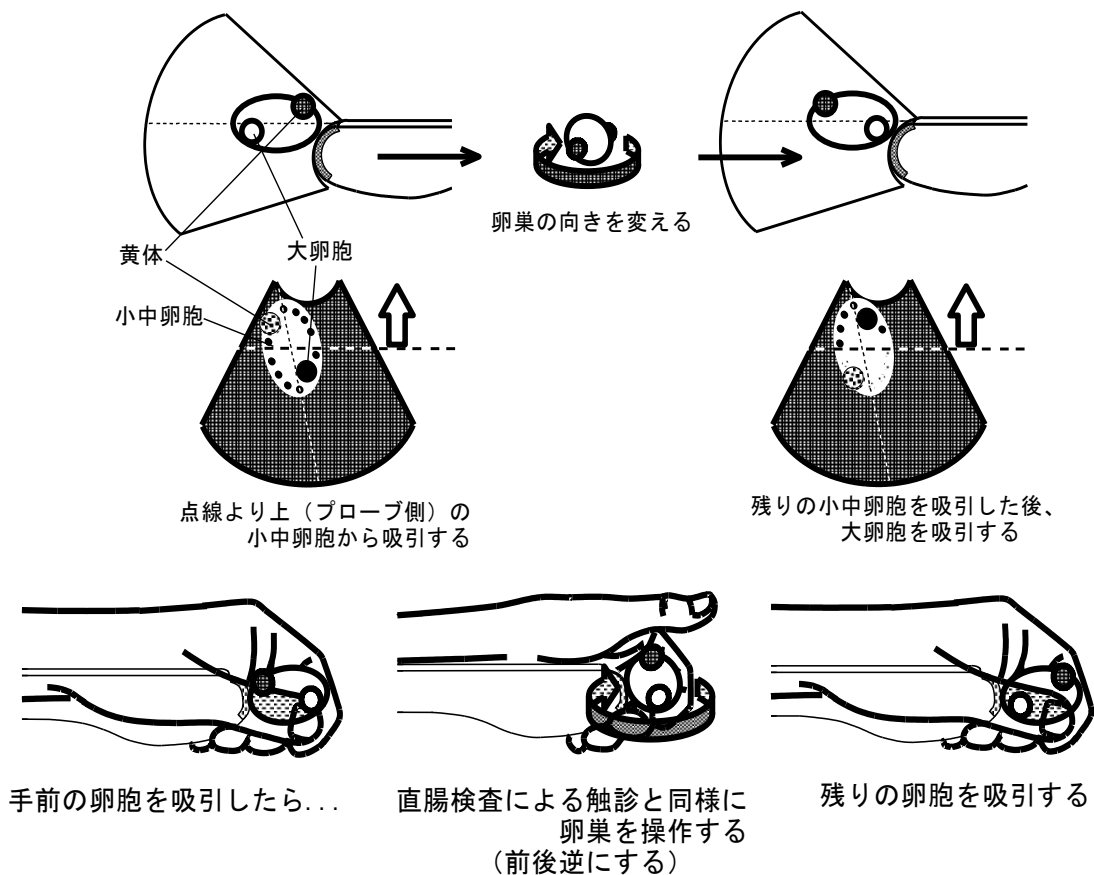


図 37. 卵巣の向きを変えながらの卵子吸引

このように、同一切断面内にある卵胞を吸引する際は、超音波画面上での左右の動きが重要となる。この動きは、実際にはプローブに保定した卵巣の上下の動きであり、画面の動きと手の動きは90度回転していることを理解して施術する必要がある。

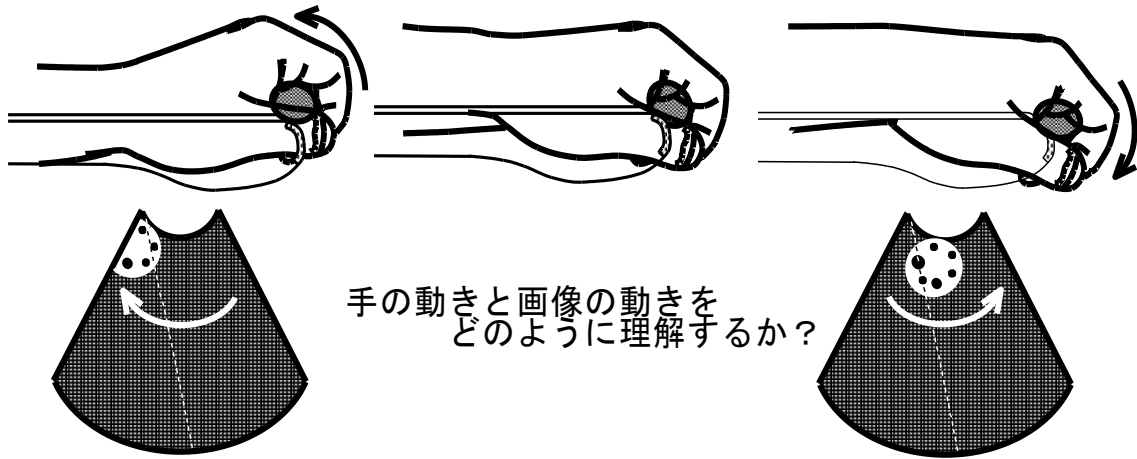
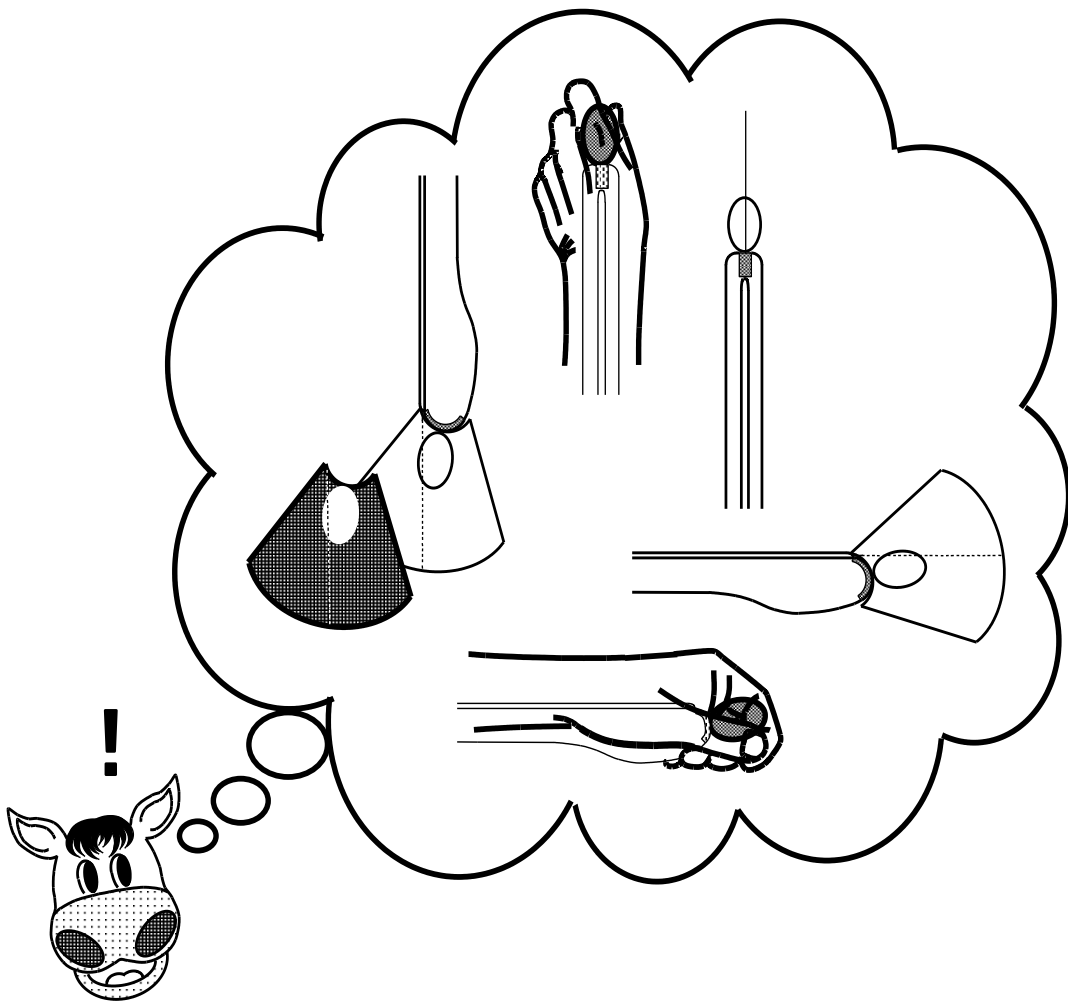


図 38. 手の動きと画像の動き



＜生体卵子吸引の実際（当センター例）＞

1. 器具機材

超音波画像診断装置（Esaote）

動物用電子コンベックス探触子（プローブ、同上）

採卵針ガイド（メディカル・タスクフォース（株））

採卵針：ディスポーザブル採卵針 A タイプ L

（エア・ウォーター・リアライズ（株））

吸引器：model FV6（富士平工業（株））

恒温器：model FV5（富士平工業（株））

採卵瓶：50ml 遠心管

2. 卵子保存液

1%NCS 添加乳酸リンゲル液（食肉処理場由来卵巣からの卵子吸引時と同様）を基礎培養液として用いるが、OPU 時の卵子吸引液と採取した卵子を検索する際の卵子検索液を調製する。二つの保存液の違いは、血液凝固防止のためのヘパリン添加の有無であり、OPU 時はヘパリンを 10U/mL となるよう添加した卵子吸引液を用いる。

3. 生体卵子吸引の手順

- 1) 供試牛を保定し、鎮静剤（キシラジン塩酸塩）を投与する。

直腸内の糞を除去後、尾椎硬膜外麻酔（プロカイン塩酸塩）を施す。尾部および外陰部をイソジン液、オスバン液、アルコール綿花の順で洗浄消毒する。

- 2) 採卵針ガイドを装着し、先端に潤滑剤を塗布したプローブを腔内に挿入し、子宮頸管外口部上方の腔壁に誘導する。
- 3) 直腸内に挿入した手で卵巣をプローブの先端付近に誘導し、超音波画像診断装置の画面に卵巣を映し出す（保定方法A）。



写真 9. 超音波画像診断装置と周辺機器



写真 10. 経腔プローブ



写真 11. 腔内へのプローブ挿入

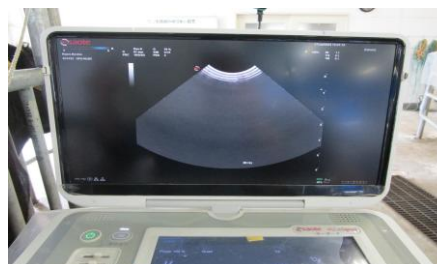
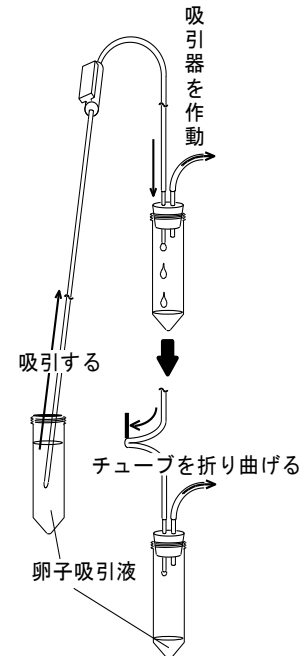


写真 12. 超音波診断画像

- 4) 画像を見ながら、卵巣内に観察される直径 2mm 以上の卵胞数（推定卵胞数）を確認する。卵巣の端（卵巣像が消えた状態）からもう一方の端まで卵巣をゆっくり移動させ、次々に現れる卵胞をカウントする。画像を静止したのちコマ送りで確認するか、スロービデオのようにゆっくりと動かしてカウントする。

- 5) あらかじめ採卵瓶に 5-15ml 程度の卵子吸引液を吸引しておく。その際、採卵針および接続チューブ内に卵子吸引液を満し、且つ液が移動しないようにチューブを閉めて液を固定する（図 48）。固定方法は、吸引器の開閉ボタンの押下、輸液チューブのストッパーの使用、接続チューブを折り曲げる等が挙げられる。



- 6) 採卵針をニードルガイドに挿入し、腔壁を穿刺・貫通させる。

- 7) 吸引器を作動する。採卵針の先が腔壁を通して腹腔内にあるときは、常に吸引器を作動させて採卵針、接続チューブおよび採卵瓶の中を陰圧に保つ。

図 39. 吸引液の吸引と停止

- 8) 卵巣を動かして超音波画面のガイドライン上に卵胞を移動させる。

- 9) 採卵針をスライドし、卵胞を穿刺することによって卵胞液を吸引採取する。

- 10) 助手は画像を見ながら接続チューブ内の吸引液の動きにも注意する。卵胞を穿刺しても卵胞の大きさが変わらなかったり、接続チューブ内の液が動かないときは、血液凝固等による採卵針やチューブ内での詰まりが考えられる。その場合は、吸引器のブーストボタンの押下や吸引圧をさらに上げることで吸引回収する。それでも詰まりが解消できない場合は、19G 注射針をつけた注射筒を用いて卵子吸引液で採卵針内を強制的に灌流する（19G 針は 17G の採卵針の内径より細く、注射針を適切に接続できる。）

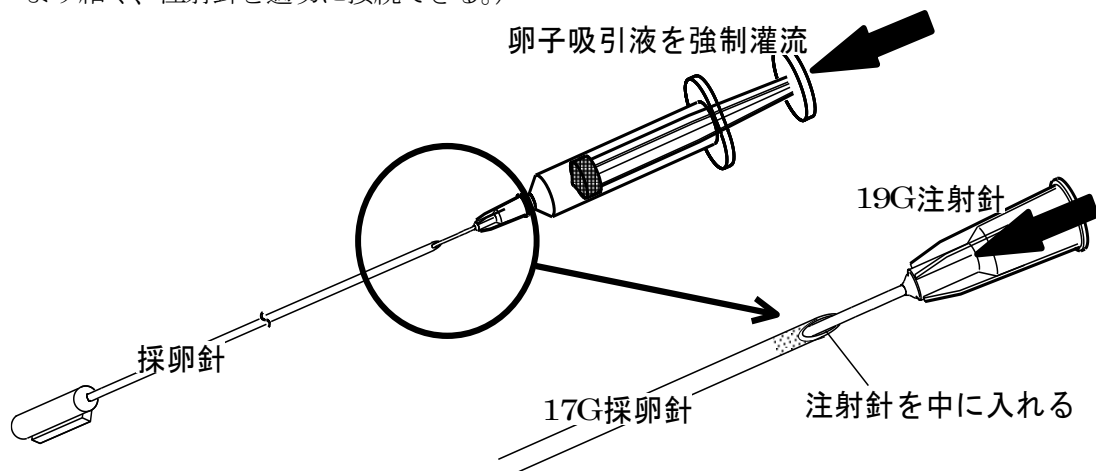


図 40. 血液凝固の対処法

- 11) 10 個程度の卵胞の吸引が終わったら、ガイドから採卵針を抜き取り、血液の凝固を防ぐために卵子吸引液で採卵針および接続チューブ内部を洗浄し、再び同様の手技で卵子の吸引採取を行う。助手は採卵瓶を軽く攪拌して血液と卵子吸引液を混和する。
- 12) 全ての卵胞（卵子）を吸引し終わったら、再度卵子吸引液で採卵針および接続チューブ内を洗浄する。

4. 採取液の濾過

- 1) 採取後の液は血液が混入して赤く色づいているため、顕微鏡下での卵子の検索が困難である。そのため、血液の濾過を目的に、採取した液をエムコンフィルターに移す。
- 2) 血液の色が無くなり、透明になるまで卵子検索液（卵子吸引液でも可）を入れて濾過を繰り返す（図 41）。
- 3) このとき採卵針あるいは接続チューブ内で凝固したと思われる血餅（イトミミズ状）があれば、駒込ピペットで血餅をほぐしながら攪拌し、液を透明にする。
- 4) 血餅が大きい場合は、ほぐすためのピペッティングが強くなり、フィルター内に存在する卵子の卵丘細胞を剥離してしまうおそれがある。そのような場合は、一旦血餅をビーカーや遠心管等の容器に移し、その中でピペッティングする（図 43）。

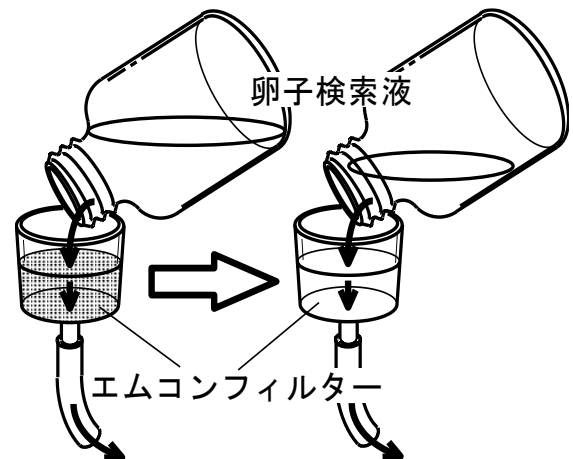


図 41. 採取液の濾過

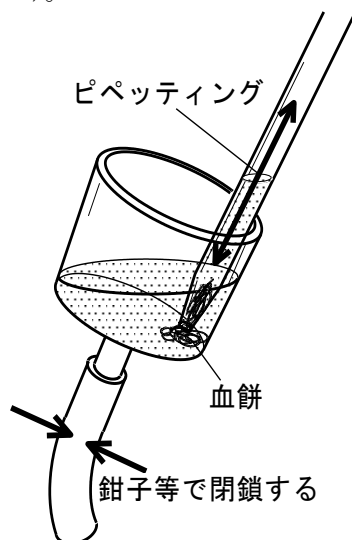


図 42. フィルター内での血餅のピペッティング

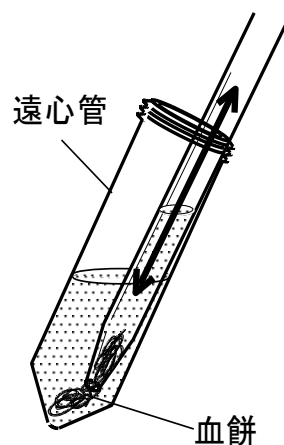


図 43. 遠心管内での血餅のピペッティング

5) 4) でピペッティングした液は、エムコンフィルターに戻す。一回の操作では液が透明にならない可能性があるので、数回繰り返す。透明になった後の血餅は、卵子検索性の 90mm シャーレに移す。

6) 液が透明になったら、「フィルター内の液を軽く攪拌 → 90mm シャーレに移す → 再度フィルター内に卵子検索性液を入れる」という操作を 2-3 回繰り返す。初めからピペッティングによりフィルターの表面に付着している卵子を回収しようとする、卵丘細胞が剥離するおそれがあるため、この操作を行う。

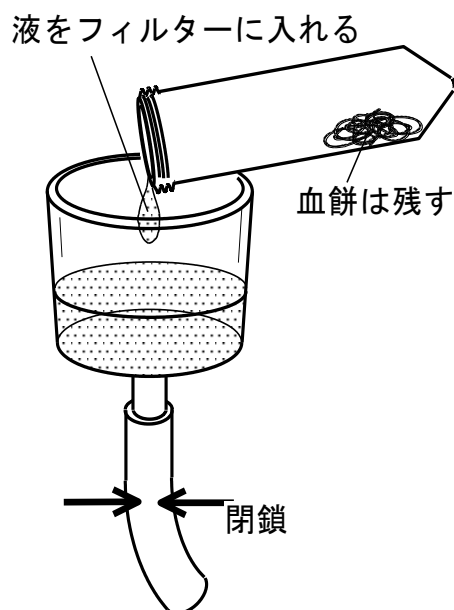


図 44. フィルターへの液の回収

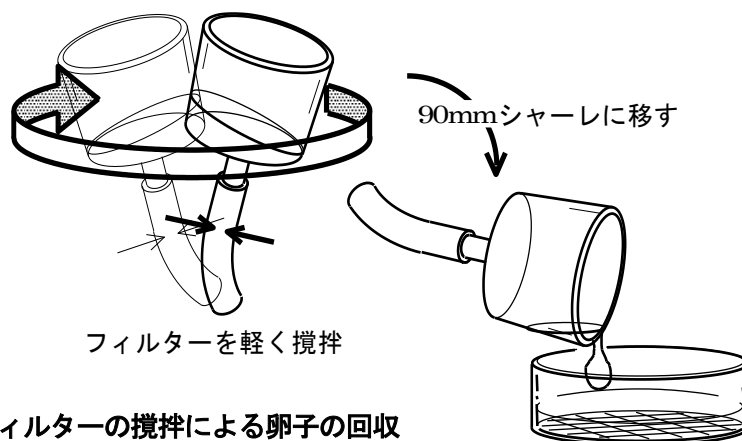


図 45. フィルターの攪拌による卵子の回収

7) 駒込ピペットでピペッティングして、フィルター表面に付着した粘液および細胞を剥がし、再びシャーレに液を移す。この操作をフィルター表面に何も残らなくなるまで繰り返す。

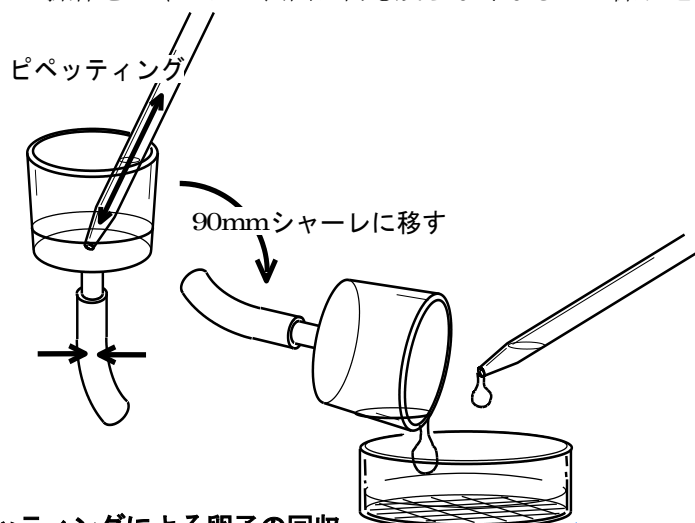


図 46. フィルター内のピペッティングによる卵子の回収

8) 採取卵子を実体顕微鏡下で検索する。

* ピペッティングは卵子の卵丘細胞の剥離が起こりやすいため、攪拌を主とし、ピペッティングは弱く行うか、なるべく回数を少なくする。卵丘細胞の剥離は、その後の成熟培養の成績に影響を及ぼす。

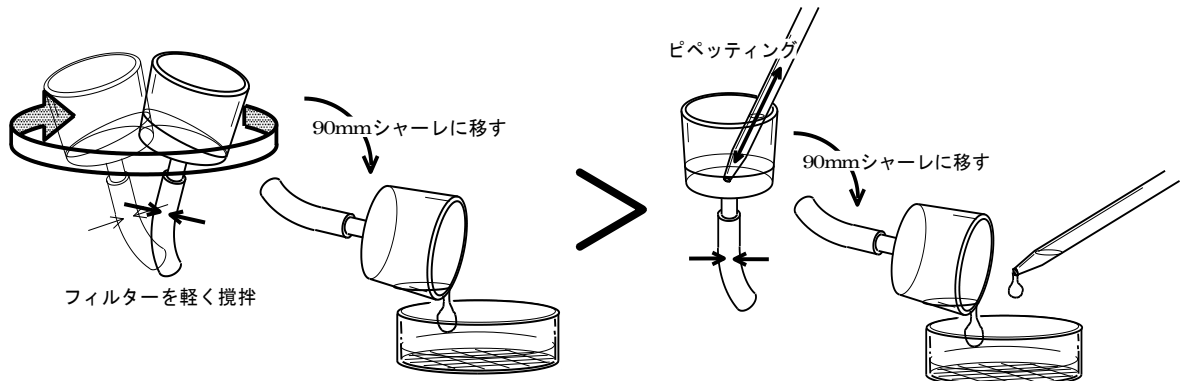


図 47. 攪拌とピペッティングの比較

* 検卵には、セルコレクター（フィルターつき升目シャーレ）も有用である。壁面のフィルターを卵子検索液で洗うことにより、吸引液中の卵子を容易に回収できる。

5. 卵子の検索

- 1) 基本的に食肉処理場由来卵巢から吸引採取した卵子の検索と同様である。しかし、OPU の場合は、血餅が存在することが多いため、以下のような方法を用いる。
- 2) 採取卵子は、血餅中に紛れていることが多いため、検索時はガラス棒（またはパスツールピペットの先を熱して丸く加工した検索棒等）を用いて、血餅をほぐすように検索する。
- 3) 一回、シャーレを検索したら、検索棒で血餅をよくほぐし、かき混ぜて二回目の検索に移る。食肉処理場由来卵巢から吸引採取した卵子の検索を経験した者でも卵子の見落としがあるため、三回以上検索した方が良い。
- 4) 血餅が複数ある場合や、シャーレ底面に広範にわたって存在する場合は、血餅のみを別のシャーレ（90mm or 60mm シャーレ）に移し、それぞれを検索する（図 48）。
- 5) いずれの方法であっても、血餅を攪拌していると検索液が再度赤くなったり、血餅が絡み過ぎてほぐれない場合がある。その場合は、再度エムコンフィルターに血餅を移し、ピペットティングを行う。
- 6) 同様にして検索を繰り返す。

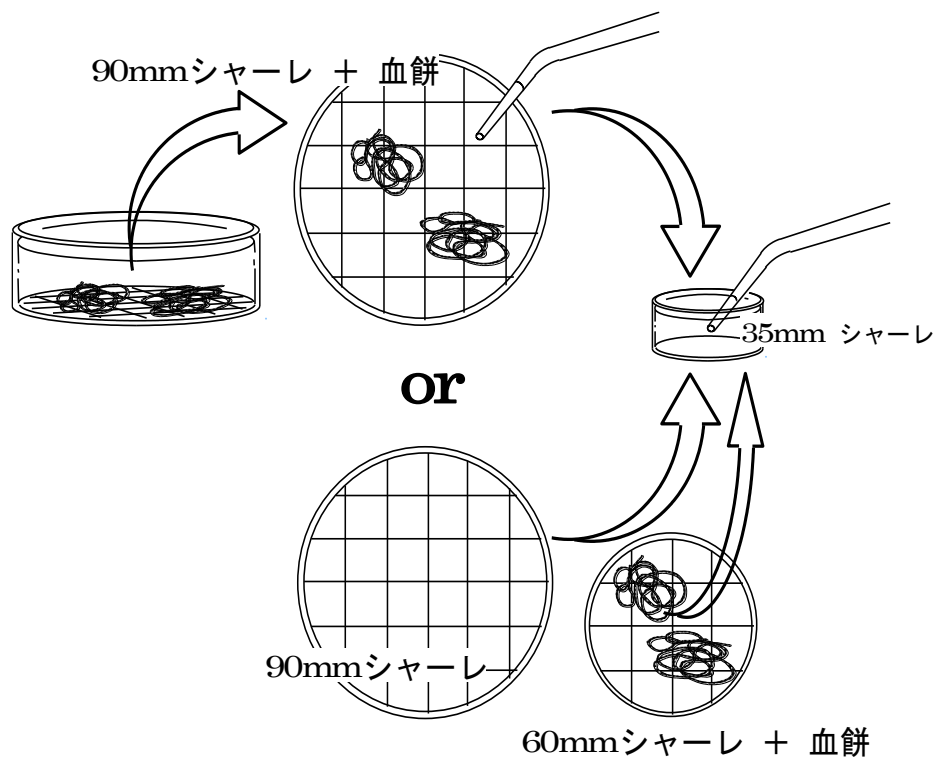


図 48. 血餅が存在する場合の卵子検索

各種溶液の調製

<卵子吸引>

【食肉処理場由来卵子】

◎生理食塩水（1 L）：卵巣運搬液

塩化ナトリウム	NaCl	9.0 g
---------	------	-------

- ① NaCl (9.0 g) を超純水で攪拌溶解後、1 L にメスアップする。
- ② ガラス瓶に移し、キャップを緩く閉め、キャップから瓶の上部をアルミホイルで被う。
- ③ オートクレーブ（121℃、15 分間）で滅菌する。

◎1%NCS 添加乳酸リンゲル液（1 L）：採取卵子検索用

乳酸リンゲル液	1, 000.0 mL
---------	-------------

NCS	10.0 mL
-----	---------

抗生物質 PC-SM（29 頁参照）	1, 000 μL
--------------------	-----------

- ① 市販の乳酸リンゲル液 1,000mL に、NCS を 10mL 入れ、抗生物質を 1, 000μL 添加して転倒混和する。
- ② 保存する場合は、冷蔵保存する（約 1 週間）。

◎10U/mL ヘパリン加 1%NCS 添加乳酸リンゲル液（100mL）：OPU 卵子吸引液

1%NCS 添加乳酸リンゲル液	100.0 mL
-----------------	----------

ヘパリンナトリウム注射液	1.0 mL
--------------	--------

- ・上記 1%NCS 添加乳酸リンゲル液にヘパリンナトリウムを 1mL 加える。調製量は、OPU 頭数やドナーごとの卵胞数により変更する。

【生体由来卵子】

◎11mM HEPES、9mM Na-HEPES 緩衝 TCM199 (1,000mL) : 修正 TCM199

a) Medium199 粉末 (1,000 mL 用)		1	袋
b) 炭酸水素ナトリウム	NaHCO ₃	0.42005	g
c) HEPES		2.62	g
d) HEPES sodium salt		2.35	g
e) 抗生物質 PC-SM		1000	μL

- ① a)を約 800mL の超純水に溶解する。
- ② b)の試薬を加え、よく攪拌する（最終的に 5mM とする）。
- ③ 別の容器で、c)と d)を約 100mL の超純水に溶解し、混和したら②に添加する（最終的にそれぞれ 11mM、9mM とする）。
- ④ e)を③に混和し、超純水で 1, 000mL にメスアップししばらく攪拌する。
- ⑤ 0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、滅菌済み小瓶または遠沈管（95mL または 47.5mL）に分注し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

◎5%NCS 加 修正 TCM199 (100mL) : 卵子の検索・保存液

修正 TCM199	95.0	mL
NCS	5.0	mL

- ① 分注した修正 TCM199 に NCS を 5%になるように添加して転倒混和する。
- ② 0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 週間）。

<卵子の成熟培養>

◎FSH ストック (5mL)

- ①FSH10AU を 25mM HEPES 緩衝 TCM199 5.0mL で溶解する (FSH2AU/mL となる)。
- ②分注し、冷凍保存する。

◎未成熟卵子培養液

5%NCS および 0.02AU/mL FSH 加 25mM HEPES 緩衝 TCM199 (10mL) :

25mM HEPES 緩衝 TCM199	9.5 mL
NCS	0.5 mL
FSH ストック	100 μ L
抗生物質 PC-SM	10 μ L

- ① メスシリンダーに上記試薬を入れ、開口部をパラフィルムで被い転倒混和する。
- ② 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する。

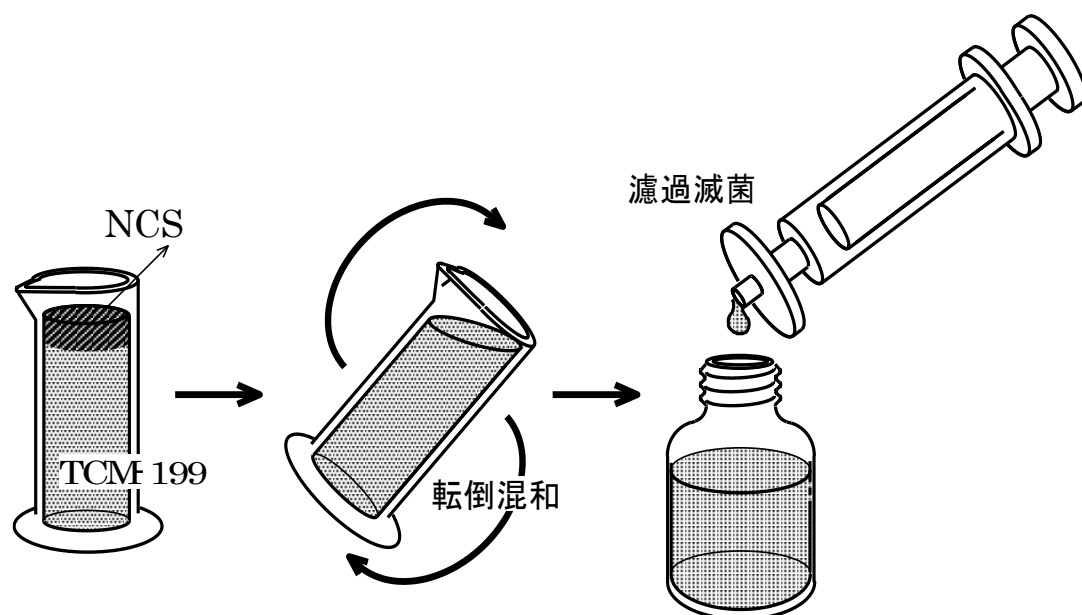


図 49. 5%NCS および 0.02AU/mL FSH 加 25mM HEPES 緩衝 TCM199 の調製

<精子処理～媒精>

1. パーコール液関連の調製

凍結融解後の生存精子を選別する際に 90%パーコール液を用いるが、パーコール液（100%濃度：Percoll）を希釈するために 10 倍濃度の sperm TL を調製する。

◎10 倍濃度 sperm TL（100mL）：Percoll 希釈液

塩化ナトリウム	NaCl	4.675	g
塩化カリウム	KCl	0.23	g
リン酸二水素ナトリウム（無水）	NaH ₂ PO ₄	0.035	g
HEPES		2.38	g

① ビーカーに 50mL 程度の超純水を入れ、上記薬品を溶解する。

② pH メーターを用いて pH=7.3 に調製する（NaOH を用いる）。

* この液は pH が極めて低いため、約半分の溶液量で調製し、NaOH を加えていくことで pH=7.3 に調製する。

③ メスシリンダーに溶液を移し、100.0mL にメスアップする。

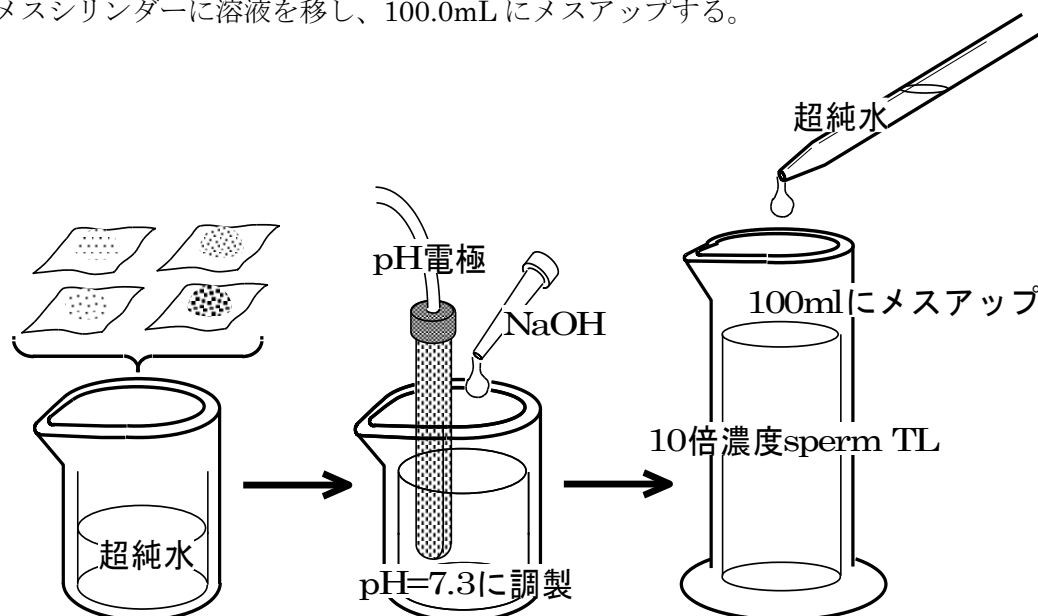


図 50. 10 倍濃度 sperm TL の調製

◎90%パーコール液（50mL）：生存精子選別溶液

a) Percoll		45.0 mL
b) 10 倍 sperm TL		5.0 mL
c) 塩化カルシウム 1M 水溶液	CaCl ₂	98.5 μL
d) 塩化マグネシウム（六水塩） 0.1M 水溶液	MgCl ₂ · 6H ₂ O	197 μL
e) Sodium DL-Lactate solution		184 μL
f) 炭酸水素ナトリウム	NaHCO ₃	0.1045 g
g) 0.5% フェノールレッド		10 μL
* c) 1M CaCl ₂ : 1.1098g/10 mL		
1M CaCl ₂ ·2H ₂ O : 1.4701g/10 mL		
d) 0.1M MgCl ₂ · 6H ₂ O : 0.2985g/10 mL		

- ① a)と b)を混和し、50.0 mL に調製する。
- ② c)～g)の試薬を加え、転倒混和する。
- ③ 0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する。

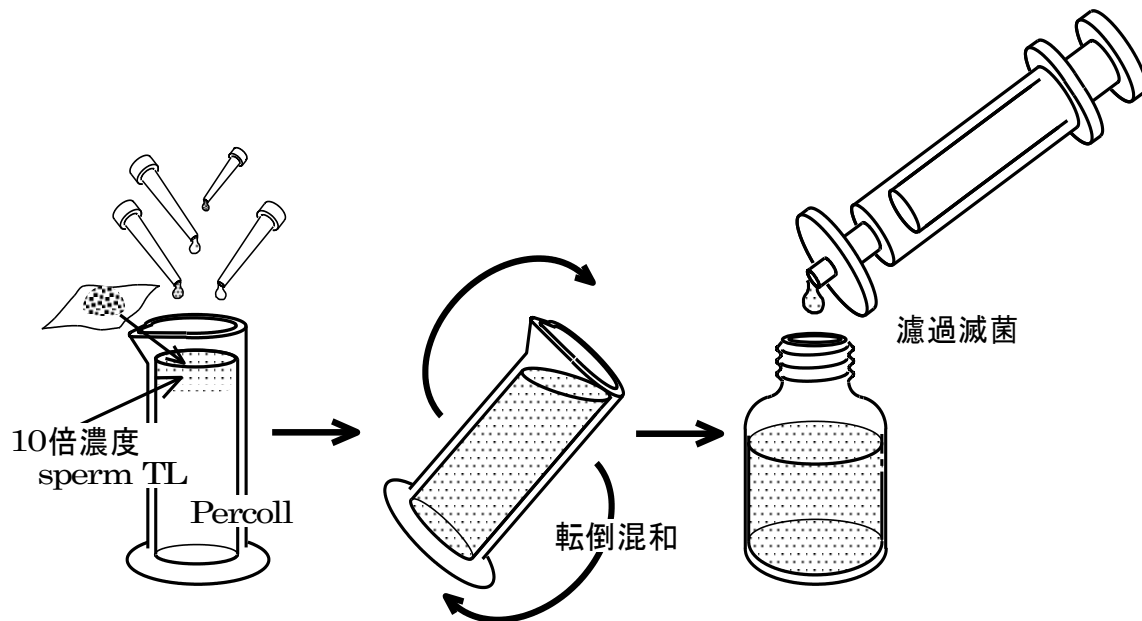


図 51. 90%パーコール液の調製

2. BO 液の調製

予めストック液（BO-A 液および BO-B 液）を調製する

◎BO-A 液（500mL）：BO 液調製用ストック液

塩化ナトリウム	NaCl	4.3092 g
塩化カリウム	KCl	0.1974 g
* 塩化カルシウム二水塩 （塩化カルシウム無水塩の場合：	CaCl ₂ ·2H ₂ O CaCl ₂ 0.1639 g)	0.2171 g
リン酸二水素ナトリウム二水塩 （リン酸二水素ナトリウム無水塩の場合：	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O NaH ₂ PO ₄ 0.0646 g)	0.0840 g
* 塩化マグネシウム六水塩	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.0697 g
0.5% フェノールレッド		100 μL

- ① 500mL のメスフラスコに上記試薬を超純水で順次溶解し、メスアップする。
- ② 0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

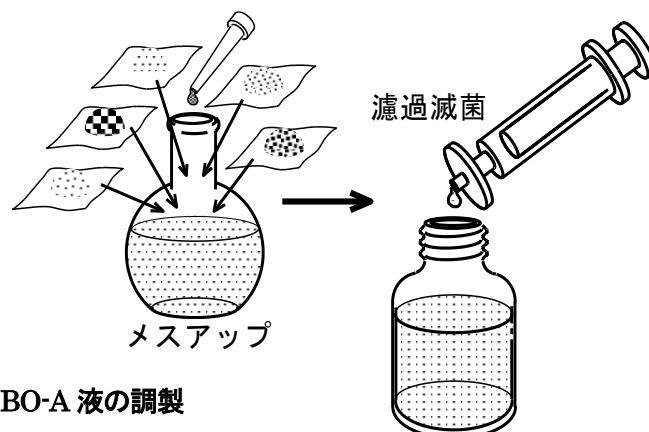


図 52. BO-A 液の調製

* 塩化カルシウム二水塩（CaCl₂ · 2H₂O）および塩化マグネシウム六水塩（MgCl₂ · 6H₂O）は水分を吸着しやすいため、以下の方法で秤量する。

- ① 秤量皿で秤量する。
- ② 超純水を用いて試薬を秤量皿中で溶解し、メスフラスコに入れる。
- ③ ②を数回繰り返す。

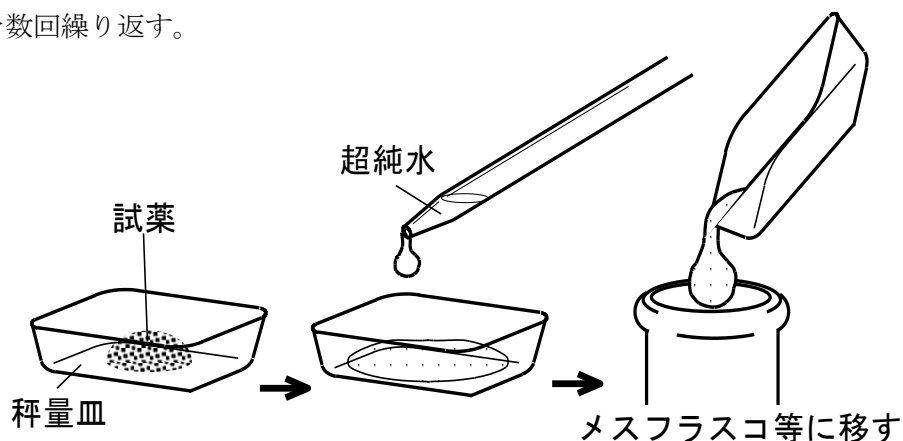


図 53. 秤量皿での秤量

試薬が少量の場合や、水分の吸着が速すぎて秤の数値が数秒ごとに増えてしまう場合は、以下の要領で秤量する。

- ① 秤量皿で試薬の 10 倍の量を秤量する。
- ② 少量の超純水を加えて試薬を溶解する。
- ③ 溶解した液をメスピペット等で量る。
- ④ 溶解液の 1/10 量を調製液（メスフラスコ等）に入れる。

*** ①の量について、場合によっては 2～5 倍でも構わない。③の秤量法も同様で、メスシリンダー等でも良い。BO-A 液にこの方法を用いる場合は、10mL 程度の超純水をメスピペットで量ることによって試薬を秤量出来る。**

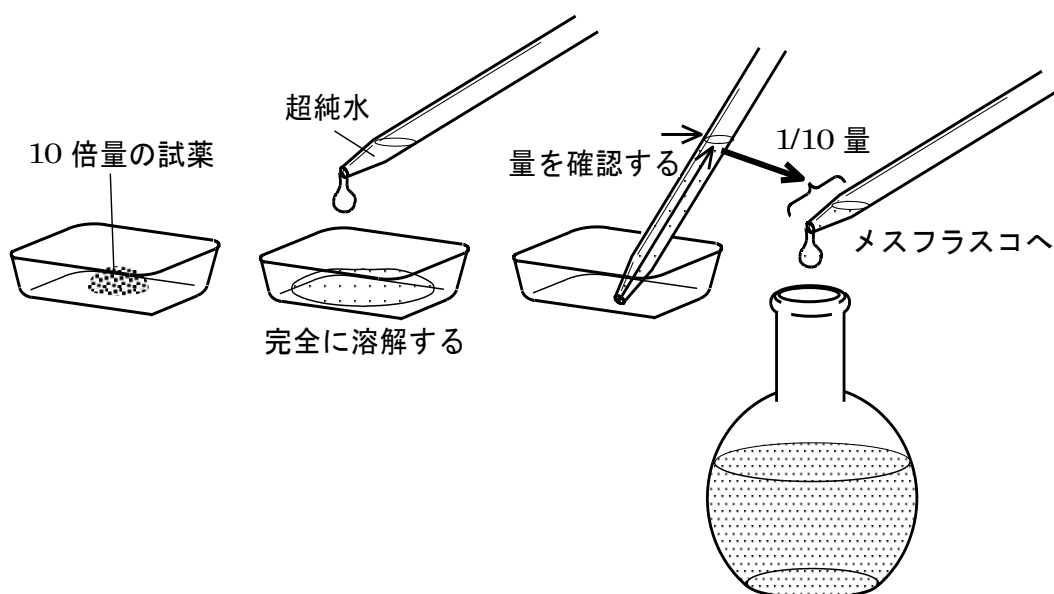


図 54. 10 倍量秤量法

◎BO-B 液（200mL）：BO 液調製用ストック液

炭酸水素ナトリウム	NaHCO_3	2.5873	g
-----------	------------------	--------	---

0.5% フェノールレッド	40	μL
---------------	----	---------------

- ① 200mL のメスフラスコに上記試薬を超純水で溶解し、メスアップする。
- ② 溶液の色が淡赤色から淡黄色に変わる中間色になるまで直接 CO_2 ガスを通気する。
- ③ 0.2 μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

フェノールレッドは水素イオン濃度（pH）指示薬の一つで、pH6.4～8.2 の範囲で色調が淡黄色から淡赤色を示す。水溶液に CO_2 ガスを吹き込むと、水溶液が酸性に傾くので淡赤色から黄色に変化する。

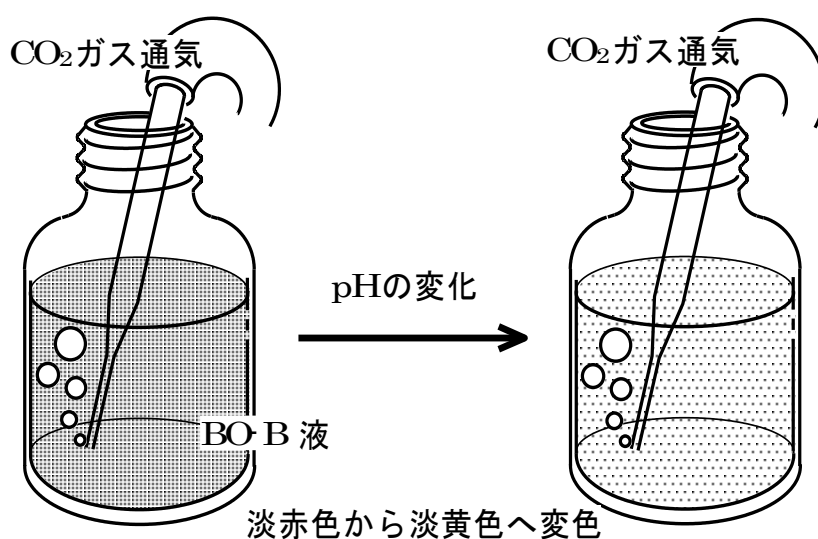


図 55. BO-B 液への CO_2 ガス通気

- * ストック液調製の際に CO_2 ガス通気して pH 調整するが、冷蔵保存中に元の色に戻る場合があるため（容器内の空気に変化する）、後述の BO 液調製の際に再び CO_2 ガス通気する。

◎BO 液（100mL）：精子洗浄液、精子希釈液および卵子洗浄液の基礎培地
使用する前日または当日に調製する

ピルビン酸ナトリウム	0.01375 g
BO-A 液	76.0 mL（メスアップ）
BO-B 液	24.0 mL（メスアップ）
抗生物質 PC-SM	100 μ L

- ① 100mL のメスシリンダーにピルビン酸ナトリウムを入れる。
- ② BO-A 液でピルビン酸ナトリウムを溶解し、76.0mL までメスアップする。
- ③ BO-B 液に CO₂ を淡黄色になるまで通気する。
- ④ ②の液に BO-B 液を 24.0mL 加える（100mL の目盛りまでメスアップ）。
- ⑤ 抗生物質を 100 μ L 加える。
- ⑥ 転倒混和後、以下の精子処理液（精子洗浄液、精子希釈液および卵子洗浄液）を調製する。

3. 精子処理液（精子洗浄液，精子希釈液および卵子洗浄液）の調製

BO 液（100mL）を元にして、以下の培養液を調製する

◎精子洗浄液（10mL）：パーコール処理後の精子洗浄（遠心分離）用

BO 液+10mM Hypotaurine+10U/mL ヘパリン

BO 液	10.0	mL
Hypotaurine	0.01091	g
ヘパリンナトリウム注射液	100	μL

- ① 以上を順次溶解し、転倒混和する。
- ② 0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する。
- ③ 使用前に容器の蓋をゆるめて CO₂ インキュベーター内でガス平衡を行う。

◎精子希釈液（10mL）：第二希釈時に使用

BO 液+20mg/mL BSA

BO 液	10.0	mL
BSA (Fraction V)	0.2	g

- ① BO 液をビーカー等に移し、BSA を静置溶解する。
- ② 0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する。
- ③ 使用前に容器の蓋をゆるめて CO₂ インキュベーター内でガス平衡を行う。

◎卵子洗浄液（50mL）：成熟卵子の洗浄用

BO 液+10mg/mL BSA

BO 液	50.0	mL
BSA (Fraction V)	0.5	g

- ① BO 液をビーカー等に移し、BSA を静置溶解する。
- ② 0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する。
- ③ 媒精用のスポットと成熟卵子の洗浄用のシャーレを作製し、CO₂ インキュベーター内でガス平衡を行う。

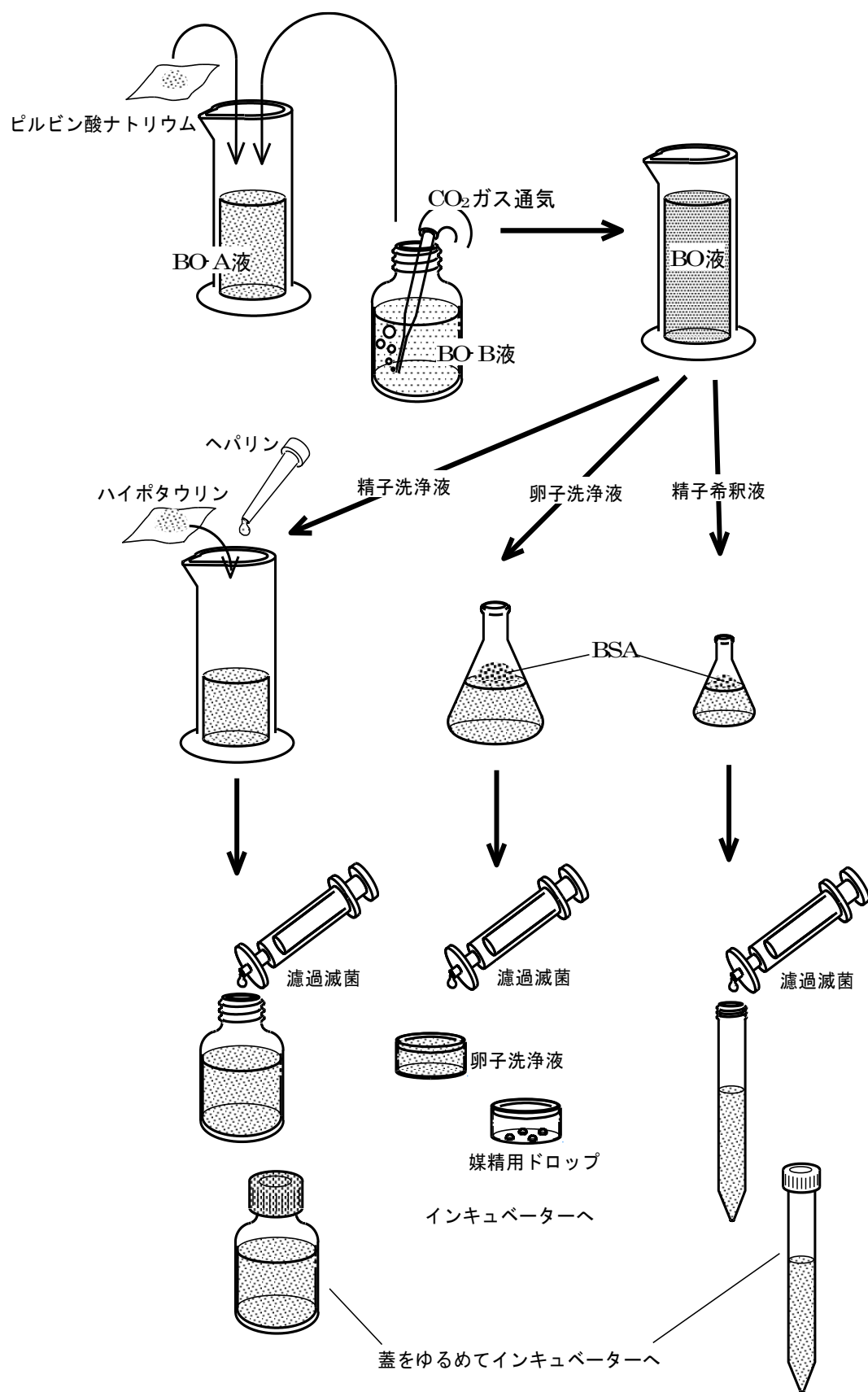


図 56. 精子処理液調製法

<発生培養>

1. CR1aa の調製：発生培養の基礎培地（NCS および LAA を添加して使用）

予めストック液（CR1-A 液および CR1-B 液）を調製する

◎CR1-A 液（760mL）：CR1aa 調製用ストック液

塩化ナトリウム	NaCl	6.7031 g
塩化カリウム	KCl	0.2311 g
ピルビン酸ナトリウム		0.0440 g
炭酸水素ナトリウム	NaHCO ₃	2.2011 g
0.5%フェノールレッド		2.0 mL

- ① 1L のメスシリンダーに上記試薬を超純水で順次溶解し、760.0mL までメスアップする。
- ② 0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

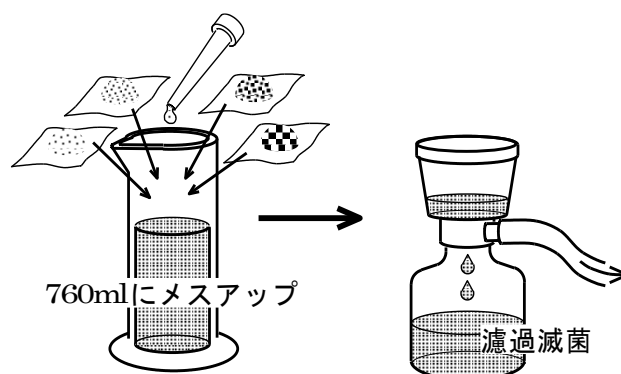


図 57. CR1-A 液の調製

◎CR1-B 液（200mL）：CR1aa 調製用ストック液

L(+)-Lactic Acid Hemicalcium Salt	0.5996 g
-----------------------------------	----------

- ① 200.0mL のメスフラスコに上記試薬を超純水で溶解し、メスアップする。
- ② 0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

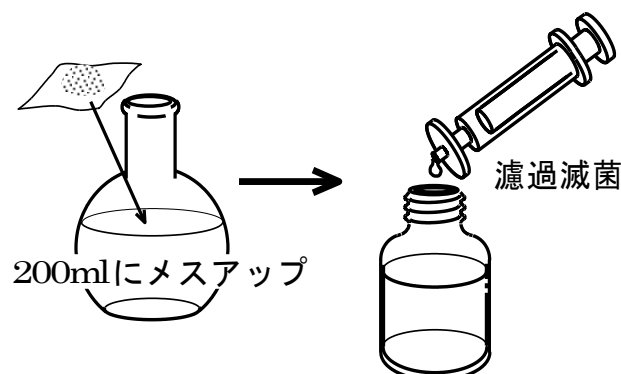


図 58. CR1-B 液の調製

◎CR1aa (100mL) : : 発生培養の基礎培地 (NCS および LAA を添加して使用)

a) CR1-A 液	76.0 mL
b) CR1-B 液	20.0 mL
c) BME Essential Amino Acids (× 50)	2.0 mL
d) MEM Nonessential Amino Acids (× 100)	1.0 mL
e) L-Glutamic acid (17mg を超純水 10mL で溶解)	1.0 mL
f) BSA (Fatty Acid-free)	0.3 g
g) 抗生物質 PC-SM	100 μ L

- ① ビーカー等に a)～e)をメスピペットで入れ混和する。
- ② BSA (Fatty Acid-free)を静置溶解する。
- ③ 抗生物質 PC-SM を入れ、混和する。
- ④ NCS を添加して使用の場合は、5%NCS 加 CR1aa の調製に従う。
- ⑤ NCS を添加しない場合は、0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。

◎5%NCS 加 CR1aa (105.26mL) : 発生培養液

CR1aa	100.0 mL
NCS	5.26 mL

- ① 100mL の CR1aa に、NCS を 5.26mL 加え転倒混和する。
- ② 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。

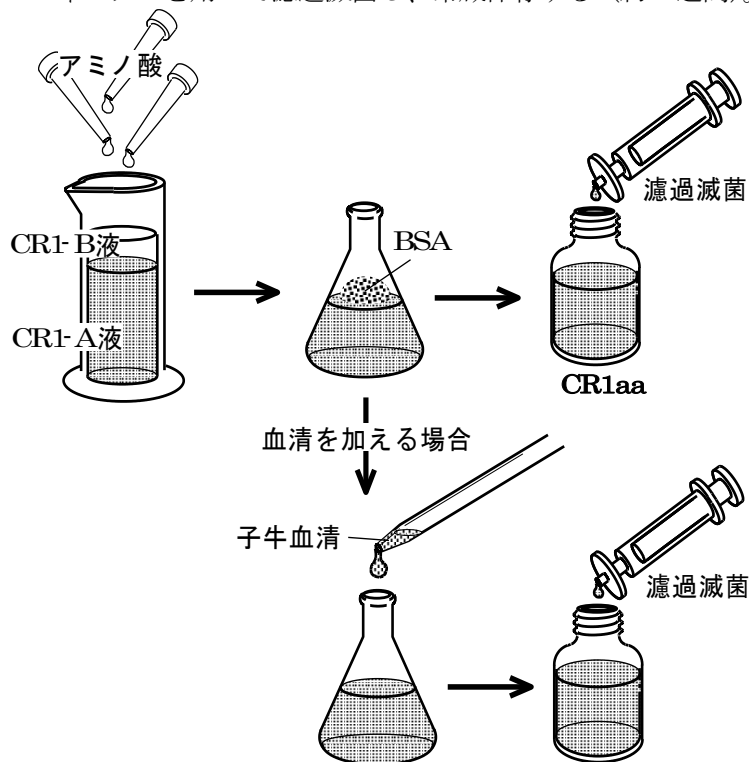


図 59. CR1aa および 5%NCS 加 CR1aa の調製

2. リノール酸アルブミン (LAA) : 体外受精卵の耐凍性を向上

◎50mg/mL LAA ストック液 (10mL) : 5%NCS 加 CR1aa に添加するストック液

LAA (500mg) の瓶に CR1-A 液を 10mL 加え、完全に溶解する。0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷凍保存する。(約 1 ヶ月間)。

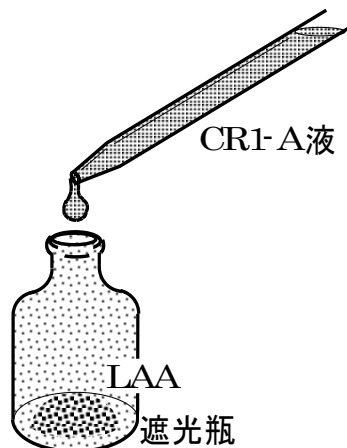


図 60. LAA ストック液の調製

◎0.25mg/mL LAA+5%NCS 加 CR1aa (10 mL) : 耐凍性を向上させた発生培養液

- ① 5%NCS 加 CR1aa 10.0 mL からマイクロピペットを用いて 50 μ L 取り除く。
- ② LAA ストック液を 50 μ L 加え、転倒混和する。
- ③ 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。

* 使用する頻度が少ない場合は、LAA を秤量して 0.25mg/ mL となるように直接培養液へ溶解する。

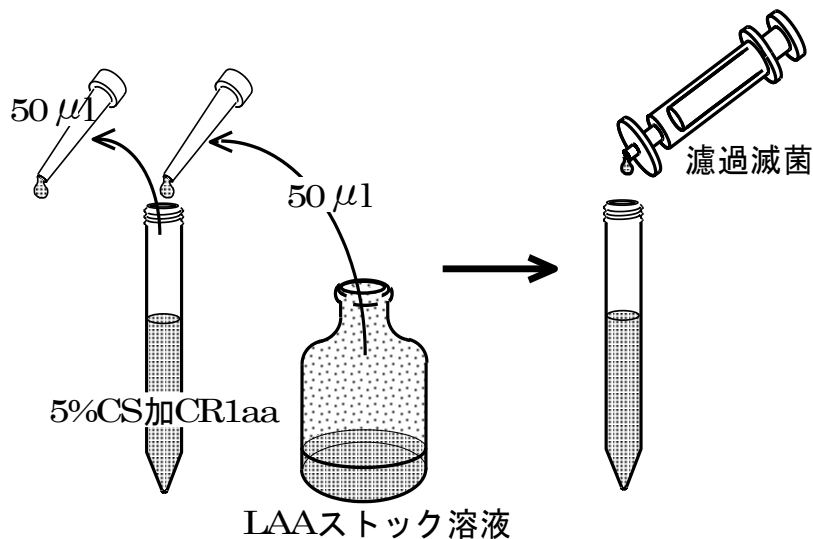


図 61. 0.25mg/ mL LAA+5%NCS 加 CR1aa の調製

<体外受精卵の凍結・融解>

1. 修正 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS)の調製

PBS-A 液と PBS-B 液を混和して D-PBS を調製し、ピルビン酸ナトリウムとグルコースを添加する。本来の修正 D-PBS は BSA が含まれるが、保存期間を延ばすため本マニュアルでは不含としている。なお、市販品の利用も一般的である。

◎PBS-A 液（約 700mL）：D-PBS(-)液

塩化ナトリウム	NaCl	8.0 g
塩化カリウム	KCl	0.2 g
リン酸一水素ナトリウム（無水）	Na ₂ HPO ₄	1.15 g
リン酸二水素カリウム（無水）	KH ₂ PO ₄	0.2 g

- ・ 1L のメスフラスコに約 700 mL の超純水で上記試薬を順次溶解する。
- ・ 市販の D-PBS(-)粉末あるいは錠剤を利用すると、簡便に調製できる。
- * いずれの場合も、マグネティックスターラーを用いて溶解する。**

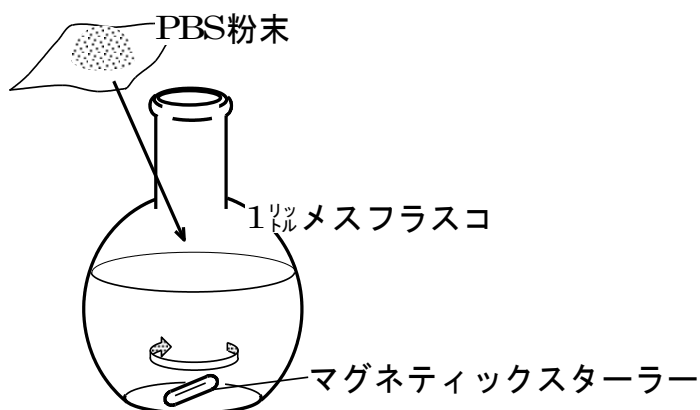


図 62. PBS-A 液の調製

◎PBS-B 液：金属塩類希釈液

予め金属塩類ストック液を調製し、修正 D-PBS 調整時にストック液を希釈して PBS-B 液とし、PBS-A 液と混和する（D-PBS(+)液）。

1) 金属塩類ストック液（100mL）

塩化カルシウム	CaCl_2	1.0 g
(塩化カルシウム二水塩の場合 : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.1395 g)		
塩化マグネシウム（六水塩）	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 g

- ① 上記試薬を超純水で溶解し、100.0 mL にメスアップする。
- ② 0.2 μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

2) PBS-B 液（約 100 mL）

10mL の金属塩類ストック液を約 100.0 mL の超純水で希釈し、PBS-B 液とする。

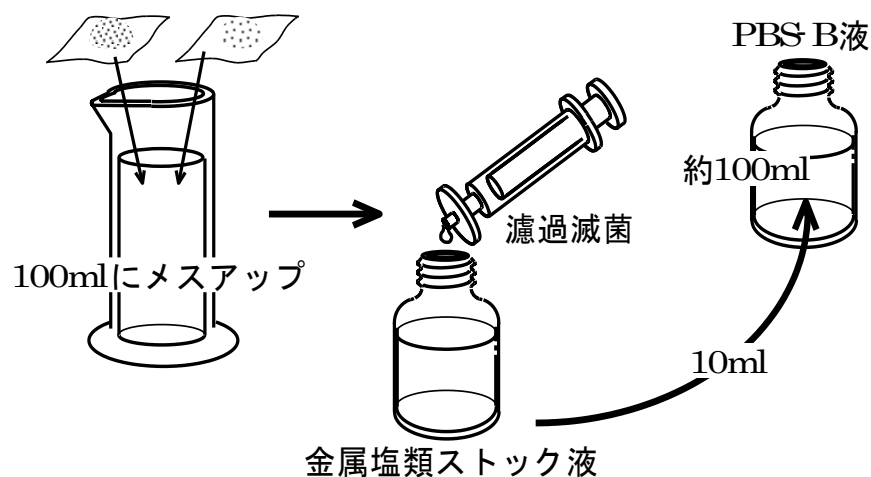


図 63. PBS-B 液の調製

◎修正 D-PBS : D-PBS+ピルビン酸ナトリウム+D(+)-グルコース (1L) :

凍結および移植後の基礎培液

PBS-A 液	約 700 mL
PBS-B 液	約 100 mL
D(+)-グルコース	1.0 g
ピルビン酸ナトリウム	0.036 g

- ① スターラーで攪拌している PBS-A 液中に、PBS-B 液を少量ずつ 4~5 回に分けて添加し、D-PBS(+)液とする。
- ② 約 800mL の D-PBS(+)液に D(+)-グルコースおよびピルビン酸ナトリウムを加え、完全に溶解してから 1.0 L にメスアップする。
- ③ 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 ヶ月間)。

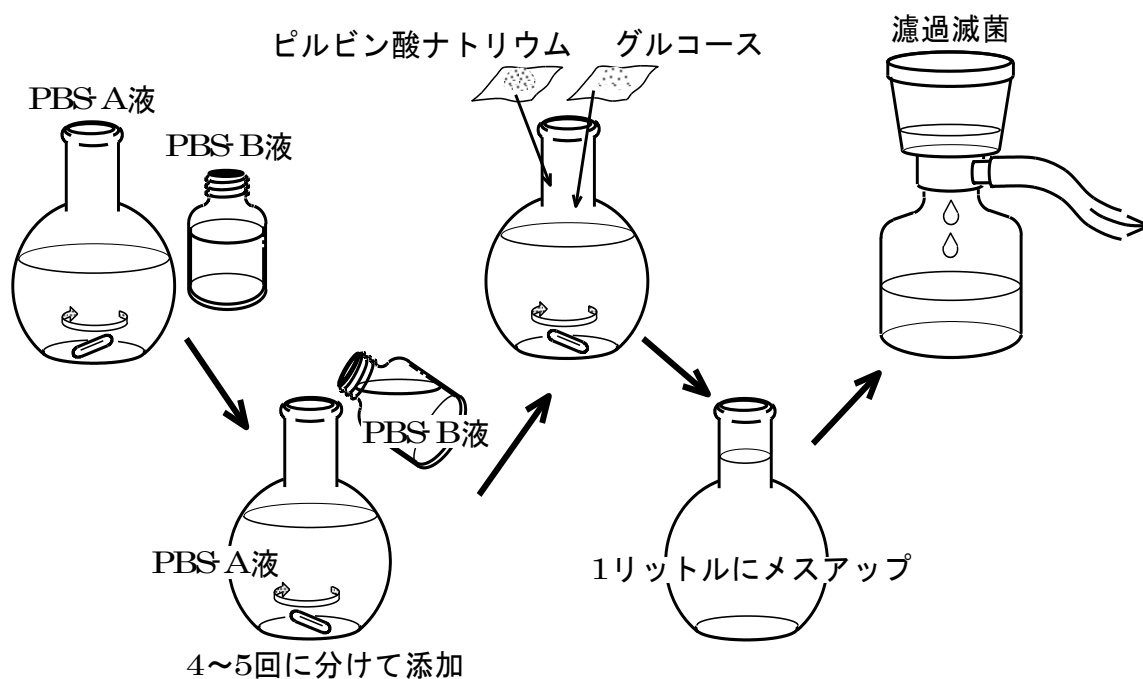


図 64. 修正ダルベッコ PBS の調製

2. 凍結保存液の調製

◎20%NCS 加 修正 D-PBS (10mL) : 体外受精卵の凍結保存に用いる基礎培地

a) 修正 D-PBS (m-PBS)	8.0 mL
b) NCS	2.0 mL
c) BSA (Fraction V)	0.04 g
d) 抗生物質 PC-SM	10 μ L

- ① ビーカー等に a)、b)をメスピペットで入れ混和する。
- ② BSA(Fraction V)を静置溶解する。
- ③ 抗生物質 PC-SM を入れ、混和する。
- ④ 凍結保存液を調製する場合は、1.5M EG + 0.1M Suc + 20% NCS 加 m-PBS の調製方法に従う。
- ⑤ 凍結保存液を調製しない場合は、0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する(約 1 週間)。

◎1.5M エチレングリコール + 0.1M スクロース + 20% NCS 加 m-PBS (10mL) : 凍結保存液

スクロース (Suc)	0.3423 g
エチレングリコール (EG)	0.83 mL
20%NCS 加 m-PBS	10 mL (メスアップ)

- ① メスシリンダーに Suc を入れる。
- ② 20% NCS 加 m-PBS を 5~6 mL 加え、Suc を完全に溶解する。
- ③ EG を 0.83 mL 加える。
- ④ 20% NCS 加 m-PBS で 10 mL までメスアップする
- ⑤ パラフィルムでシールし、転倒混和する。
- ⑥ 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。

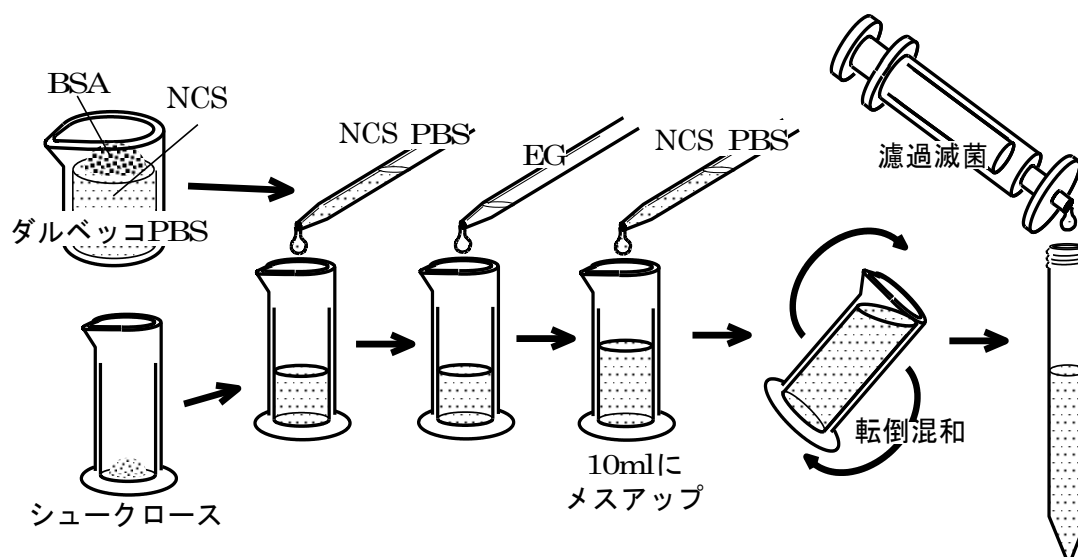


図 65. 20%NCS 加 修正 D-PBS

および 1.5M EG + 0.1M Suc + 20% NCS 加 m-PBS の調製

3. 融解後の培養液の調製

20%NCS + 0.1mM β -メルカプトエタノール + TCM-199 を調製するが、添加する β -メルカプトエタノールは 0.1mM と微量であるため、予め 100 倍濃度のストック液を調製する。

◎ β -メルカプトエタノールストック液 (10mL)

TCM-199	10 mL
β -メルカプトエタノール (β ME)	7 μ L

- ① 10mL の TCM-199 を試験管に入れる。
- ② マイクロピペットを用いて試験管中の TCM-199 を 7 μ L 取り除く。
- ③ β ME を 7 μ L 加える。
- ④ パラフィルムでシールし、転倒混和する。
- ⑤ 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。または、マイクロチューブ等に分注し、冷凍保存する。

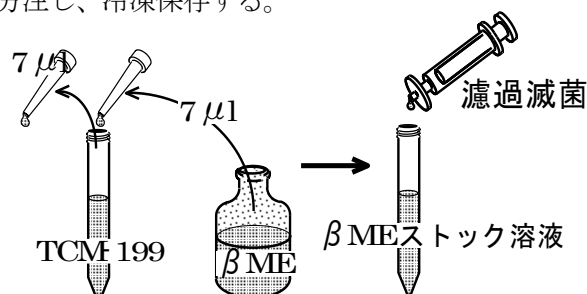


図 75. β -メルカプトエタノールストック液の調製

◎20%NCS + 0.1mM β ME + TCM-199 (10ml) : 融解後の生存性確認用培養液

TCM-199	7.9 mL
β ME ストック溶液	100 μ L
NCS	2.0 mL
抗生物質 PC-SM	10.0 μ L

- ① TCM-199 を 7.9mL 試験管に入れる。
- ② マイクロピペットを用いて β ME ストック溶液を 100 μ L 加える。
- ③ NCS を 2.0mL 加える。
- ④ 抗生物質を 10 μ L 加え、パラフィルムでシールし転倒混和する。
- ⑤ 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。

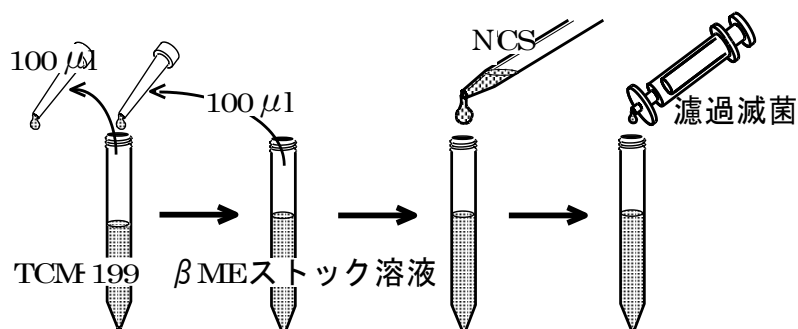


図 76. 20%NCS + 0.1mM β ME + TCM-199 の調製

＜培養液全般＞

1. NCS の非働化

方法①

NCS の融解

- ① 凍結状態の NCS 容器を 25℃のウォーターバスで完全に融解する。
 - ② 液体の状態になっても NCS 中の成分が完全に溶解するまで 5～6 時間保温する。
- * この時、効率的に溶解するため、NCS を攪拌する必要がある。攪拌の方法は以下の通り。尚、これらの攪拌操作は非働化処理時も同様に行う。**
- a) 数分おきに手で容器を振って攪拌する。
 - b) シェーカーを用いる。
 - c) ウォーターバスとマグネティックスターラーを組み合わせる（図 68）。

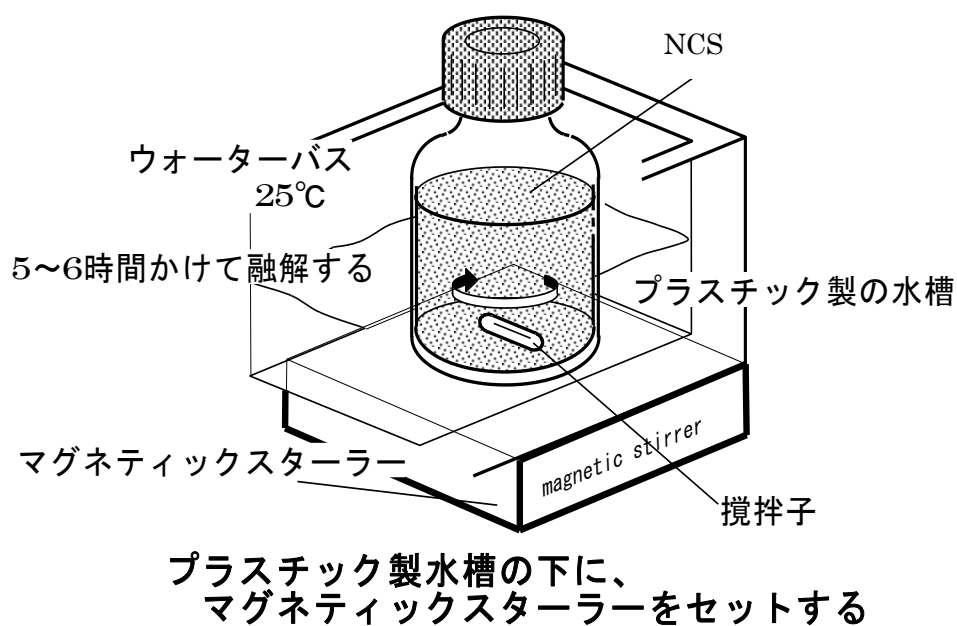


図 66. NCS の融解 c)法

方法②

融解した状態から非働化を開始する。非働化の条件は 56℃で 30 分間であるが、融解温度の 25℃から非働化温度の 56℃まで上昇する時間は非働化の処理時間には含まれない。NCS の融解方法同様に様々な方法が考えられるが、本マニュアルでは以下の 2 つの方法を説明する。

a) プログラム通りに 56℃へ徐々に温度を上昇させる方法

- ① 5-6 時間保温した状態 (25℃) から非働化を開始する。
- ② ウォーターバスの設定を 56℃にし、徐々に温度を上昇させる。
- ③ 56℃になった時点で非働化を開始する (30 分間)。
- ④ 終了したら NCS の容器を取り出し、室温程度まで NCS の温度を下げ、ボトルフィルタユニット等 (0.2μm) で濾過滅菌を行う。
- ⑤ 1 回に使用する量により容器 (冷凍保存に適する材質のもの: ポリプロピレン製のチューブ、遠心管) に分注し、冷凍保存する。

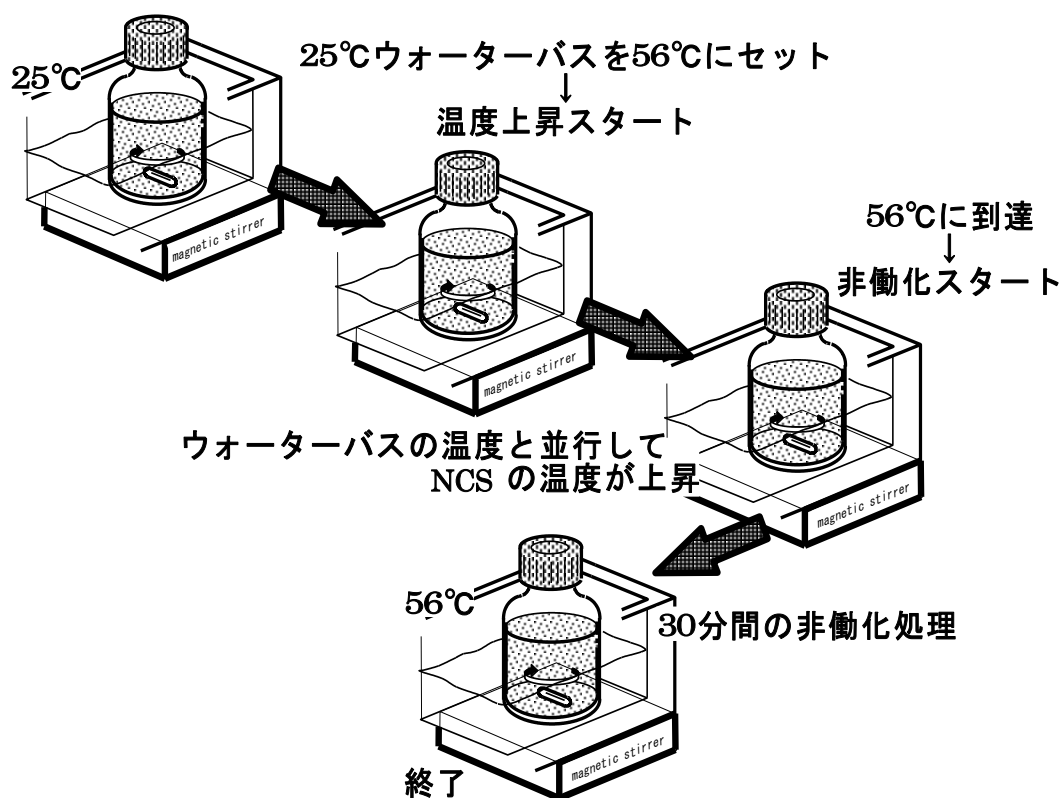


図 67. NCS の非働化 a) 法

b) 56℃の温湯へ容器を投入し、温度を上昇させる方法

予め 25℃の NCS 容器中の液体が、何分で 56℃になるかダミーを使用して確認する。

- ① 空の NCS 容器中に水を入れ、温度計を挿入しパラフィルムで密閉する (ダミー)。
- ② ダミーを発泡スチロール容器等で 25℃に保温しておく。
- ③ ウォーターバスの温度を 56℃にする。
- ④ ダミーをウォーターバスに投入し、タイマーをスタートさせる。
- ⑤ ダミーの温度計が 56℃になった時間を記録する。
- ⑥ 数回繰り返し、その平均時間を求め、「温度上昇時間」とする。当センターでは 500mL の容器を用いて、温度上昇時間を 15 分間としている。

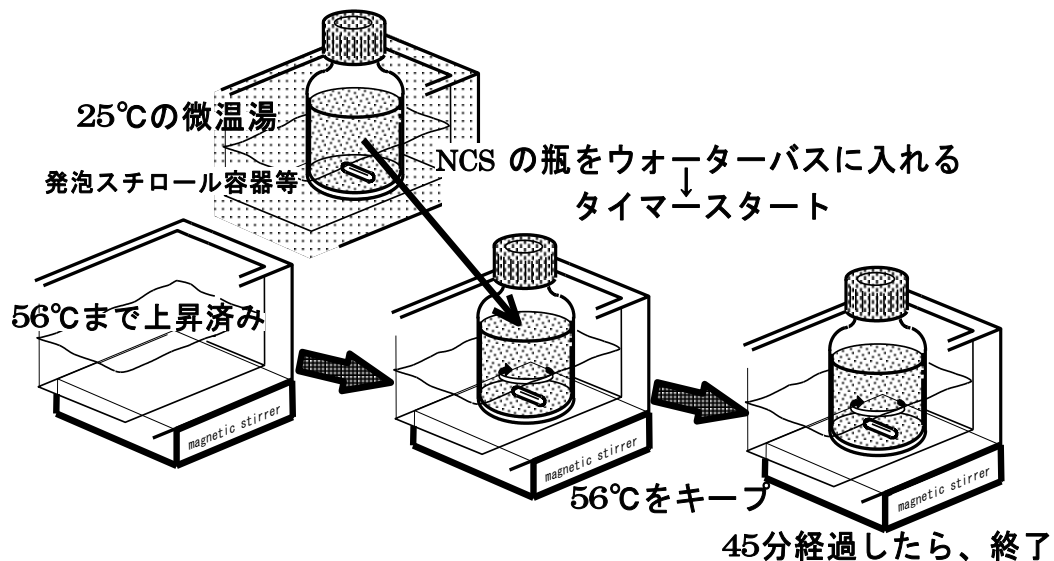


図 68. NCS の非働化 b) 法

温度上昇時間を求めたら、同条件 (室温等も) で NCS を非働化する。

NCS 融解後... (図 70)、

- ① NCS 容器を発泡スチロール容器等で 25℃に保温しておく。
- ② ウォーターバスの温度を 56℃にする。
- ③ NCS 容器をウォーターバスに投入し、タイマーをスタートさせる。
- ④ 温度上昇時間 + 非働化時間が経過したら非働化を終了し、NCS 容器を取り出して室温程度まで NCS の温度を下げ、ボトルフィルタユニット等 (0.2 μ m) で濾過滅菌を行う。
- ⑤ 1 回に使用する量により容器 (冷凍保存に適する材質のもの: ポリプロピレン製のチューブ、遠心管) に分注し、冷凍保存する。

*** 当センターでは、タイマーをスタートさせてから 45 分間 (温度上昇時間: 15 分間 + 非働化時間: 30 分) で終了としている。**

抗生物質：培養液、凍結媒液等に添加する。雑菌の増殖を防ぐ。

◎ペニシリンーストレプトマイシン（PC-SM）混合液

ペニシリン（PC）		
結晶ペニシリン G カリウム明治	10 万	単位
streptomycin（SM）		
硫酸streptomycin明治 1 g カ価入	0.1	g
D-PBS (-)	1	mL

- ① SM 0.1g を秤量し、PC 10 万単位が入っている小瓶に入れる。
- ② 使用するまでパラフィルムで被い、冷蔵保存しておく。
- ③ 使用時に D-PBS (-) 1mL で溶解し、よく混和する。

*** 溶解してから 1 週間冷蔵保存可能**

各種溶液への添加量は、PC-SM が 1000 倍希釈されるようにする

例 PC-SM 1 μ L／溶液 1mL

PC および SM の最終濃度は、以下のようになる

PC : 100 U／mL

SM : 100 μ g／mL



図 80. ペニシリンーストレプトマイシンの調製

PC-SM 混合液を短期間で多くの培養液調整に使用する場合の調整方法

◎ストレプトマイシン (SM)

硫酸ストレプトマイシン注射用 1g「明治」	1 バイアル
D-PBS (-)	5 mL

- ① 硫酸ストレプトマイシン注射用 1g「明治」を D-PBS (-)で溶解し、よく混和する。

◎ペニシリンーストレプトマイシン (PC-SM) 混合液

注射用ペニシリン G カリウム (20 万単位)	1 バイアル
ストレプトマイシン (SM)	1 mL
D-PBS (-)	1 mL

- ① 注射用ペニシリン G カリウムを SM で溶解し、よく混和する。
② D-PBS (-)を加え、よく混和する。
③ 冷蔵保存または分注して冷凍保存 (-30℃)。

家畜改良センターにおける薬品一覧

品名	規格等	製造元	品番
2-メルカプトエタノール(β メルカプトエタノール)	25mL/本	Sigma-Aldrich®	M3148
BME Amino Acids Solution 50x	100mL/本	Sigma-Aldrich®	B6766-100mL
B0-IVC	10mL/本	IVF Bioscience	71005
Bovine Serum Albumin (Fatty acid free)	50g/本	Sigma-Aldrich®	A7030-50G
Bovine Serum Albumin (Fraction V)	10g/本	Sigma-Aldrich®	A9647-10G
D(+)-グルコース	500g/本	富士フィルム 和光純薬工業(株)	049-31165
DPBS (-)Ca、(-)Mg	500mL/本	Gibco™	Thermo Fisher SCIENTIFIC 14190-144
DPBS (+)CaCl ₂ 、(+)MgCl ₂ 、(+)glucose、(+)pyruvate	500mL/本	Gibco™	Thermo Fisher SCIENTIFIC 14287-080
HEPES	500g/本	Sigma-Aldrich®	H4034-500G
HEPES sodium salt	100g/本	Sigma-Aldrich®	H3784-100G
Hypotaurin	1g/本	Sigma-Aldrich®	H1384-1G
IVF100	30mL/本×5本	(株)機能性ペプチド研究所	IFP9630
IVMD101	25mL/本×5本	(株)機能性ペプチド研究所	IFP9641
L(+)-LACTIC ACID	50g/本	Sigma-Aldrich®	L-4388
L-GLUTAMIC ACID	100g/本	Sigma-Aldrich®	G-8415
Linoleic Acid-Albumin from bovine serum albumin	500mg/本	Sigma-Aldrich®	L8384-500MG
Medium199 (+)25mM HEPES (TCM199)	500mL/本	Gibco™	Thermo Fisher SCIENTIFIC 12340-030
Medium199 , Powder (TCM199)	10×1L	Gibco™	Thermo Fisher SCIENTIFIC 31100-035
MEM NEAA	100mL/本	Gibco™	Thermo Fisher SCIENTIFIC 11140-050
Percoll™	1000mL/本	cytiva	17089101
Phenol red solution (0.5%)	100mL/本	Sigma-Aldrich®	P0290-100ML
Sodium DL-Lactate solution	100mL/本	Sigma-Aldrich®	L7900-100mL
Sodium Pyruvate	25g/本	Sigma-Aldrich®	P3662-25G
Sucrose	500g/本	ナカライテスク(株)	30404-45
アントリン® R・10	10AU/管×5管	FSH製剤	共立製薬(株)
エチレングリコール	500mL/本		ナカライテスク(株)
塩化カリウム(KCl)	500g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)
塩化カルシウム(CaCl ₂)	500g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)
塩化カルシウム・二水塩(CaCl ₂ ・2H ₂ O)	100g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)
塩化ナトリウム(NaCl)	500g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)
塩化マグネシウム・六水塩(MgCl ₂ ・6H ₂ O)	25g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)
ゲンタマイシン硫酸塩注射液60mg「日医工」	60mg力価/管×10管		日医工(株)
システアミン塩酸塩	25g/本		Sigma-Aldrich® M6500-25G
セラクター2%注射液	25mL/本	キシラジン塩酸塩	エランコジャパン(株)
炭酸水素ナトリウム(NaHCO ₃)	500g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)
注射用ペニシリンGカリウム	20万単位/管×10管		Meiji Seika ファルマ(株)
動物用塩ブロ注	100mL×5管	ブロカイン塩酸塩	共立製薬(株)
ハルゼン-V注射液	1000mL/本		日本全薬工業(株)
ヘパリンNa注 1万単位/10mL「モチダ」	10mL/本	10,000単位	持田製薬(株)
硫酸ストレプトマイシン注射用 1g「明治」	1g力価/管×10管		Meiji Seika ファルマ(株)
流動パラフィン	500mL/本		ナカライテスク(株)
リン酸一水素ナトリウム・無水(Na ₂ HPO ₄)	500g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)
リン酸二水素カリウム・無水(KH ₂ PO ₄)	500g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)
リン酸二水素ナトリウム・二水塩(NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O)	25g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)
リン酸二水素ナトリウム・無水(NaH ₂ PO ₄)	500g/本		富士フィルム 和光純薬工業(株)

家畜改良センターにおける器具機材等一覧

品名	規格等		製造元	品番
ART CULTURE DISH 12 (12穴)	100枚/箱	個包装	ニプロ(株)	87-434
ART CULTURE DISH 25 (25穴)	100枚/箱	個包装	ニプロ(株)	87-435
Disposable hemocytometer (4-chambers)	50枚/箱		フナコシ株式会社	521-10
Minisart®(濾過滅菌用フィルター)	50個/箱	0.2µm 個包装	SARTORIUS	S6534
MultiDish 4well ,Nunc	4枚/袋×30袋		Thermo Fisher SCIENTIFIC	176740
NUNC イージーディッシュ(35mm)	10枚/袋×50袋	35mm	Thermo Fisher SCIENTIFIC	150460
NUNC イージーディッシュ(卵子検索用)	10枚/袋×24袋	100mm	Thermo Fisher SCIENTIFIC	150466
TCディッシュ(35mm)	10枚/袋×50袋	35mm	SARSTEDT	83.3900
エムコン(EmCon) フィルター		個包装	(株)野澤組	04135
コニカルチューブ	50本/袋×10袋	15mL	FALCON	352096
コニカルチューブ	25本/袋×20袋	50mL	FALCON	339652
スナップコニカルチューブ	5本/包×24包	50mL	住友ベークライト(株)	MS-58500
セルコレクター	10個/箱	個包装	富士平工業(株)	2167000
ディスポーザブル採卵針 Aタイプ L	20本/箱	17G×500mm(LONG) Aタイプ L	エア・ウォーター・リアライズ(株)	
ディスポーザブルピペット	200本/箱	5mL 個包装	Thermo Fisher SCIENTIFIC	170355
ディスポーザブルピペット	200本/箱	10mL 個包装	Thermo Fisher SCIENTIFIC	170356
ディスポーザブルピペット	200本/箱	25mL 個包装	Thermo Fisher SCIENTIFIC	170357N
テルモシリンジ	100本/箱	10mL	テルモ(株)	SS-10SZ
テルモシリンジ	50本/箱	20mL	テルモ(株)	SS-20ESZ
テルモシリンジ	20本/箱	50mL	テルモ(株)	SS-50ESZ
テルモシリンジ(卵子吸引採取用)	100本/箱	5mL	テルモ(株)	SS-05SZ
バスツールピペット	250本×4セット/箱	150mm	ヒルゲンベルグ	31 501 01
ボトルトップフィルター	12個/箱	0.2µm 250mL 個包装	Thermo Fisher SCIENTIFIC	568-0020
ボトルトップフィルター	12個/箱	0.2µm 500mL 個包装	Thermo Fisher SCIENTIFIC	566-0020
ボトルトップフィルター	12個/箱	0.2µm 1000mL 個包装	Thermo Fisher SCIENTIFIC	567-0020
リブプレート(6穴)	10枚/袋×10袋		(株)機能性ペプチド研究所	IFP9670

ディスポーザブルタイプの遠心管、培養フラスコおよびメスピペットは、どのブランドもほぼ一定の品質であるが、培養に使用するシャーレ等は発生成績等に影響するため、当センターでは記載のブランドを使用している。

参考文献

- 1) Callesen H, Greve T and Christensen F. Theriogenology 27:217 (1987).
- 2) Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM and Taverne MAM. Theriogenology 30:751-762 (1988).
- 3) 今井 敬・富澤宗高・的場理子・小林修司・後藤祐司・奥地弘明・堂地 修・下平乙夫 哺乳動物卵子学会誌 Vol.12:S3(1995).
- 4) K. Imai, S. Kobayashi, Y. Goto, O. Dochi, I. Shimohira Theriogenology 47:347 (1997).
- 5) 小林修司・今井 敬・御澤弘靖・矢嶋 茂・信戸一利・田川真人・小島敏之, 第 15 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 p56-57 (2000).
- 6) 小林修司・今井 敬・堂地 修・高橋博人・小島敏之, 第 11 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 p40-41 (1996).
- 7) 小林修司・今井 敬・新納正之・後藤裕司・辻野堂士・小島敏之, 第 4 回日本胚移植研究会大分大会講演要旨集 p30 (1997).

あ と が き

OPU-IVP を利用した体外受精胚生産は、スケジュールを十分考慮することにより、多排卵（過剰排卵）処理から得られた体内胚生産に比較して効率的に胚を生産できる可能性があります。また、発生した胚盤胞の移植についても、新鮮胚移植においては体内受精由来胚と同等の受胎率を期待できます。

本マニュアルでは、超音波画像と卵巣の操作法についてイラストを用いてわかりやすく説明しました。これらはすべて基礎段階としての技術解説ですが、これから牛体外受精を実施されようとする技術者の参考となり、OPU-IVP 技術のより一層の普及に少しでも寄与することができれば幸いです。

マニュアル執筆者 家畜改良センター 企画調整部 管理課 繁殖技術チーム

日本の畜産 改良と技術で育てます



執筆者 企画調整部管理課繁殖技術チーム

家畜改良センター技術マニュアル 19

ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル

発行／独立行政法人 家畜改良センター

〒961-8511 福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原 1

TEL : 0248-25-2231 (代表) FAX : 0248-25-3990

[http:// www.nlbc.go.jp](http://www.nlbc.go.jp)

発行日／平成 19 年 3 月

第 7 版／令和 7 年 1 1 月
