

3. 体外受精

1) 精液の融解と洗浄

1. 密栓して 37°C に保温した 60% と 45% パーコール密度勾配液を、2 mL ずつ 15 mL 遠沈管に重層する。
2. その上に凍結融解した性選別精子を重層する(図 6)。
3. 37°C、2000rpm(740 × g)で 10 分間遠心分離し、精子と夾雑物を分離する。
4. 上澄みを精液ペレットの上限までアスピレーター等で吸引除去する。
5. 37°C に加温した IVF100 (機能性ペプチド研究所) を 5.5 mL 添加する。
6. 2~3 回静かに反転混和したのち、37°C、1800rpm(540 × g)で 5 分間遠心分離する。
7. 上澄みを吸引除去し、37°C に加温した IVF100 を約 40 μL 添加し、タッピングで静かに全体を混和する。

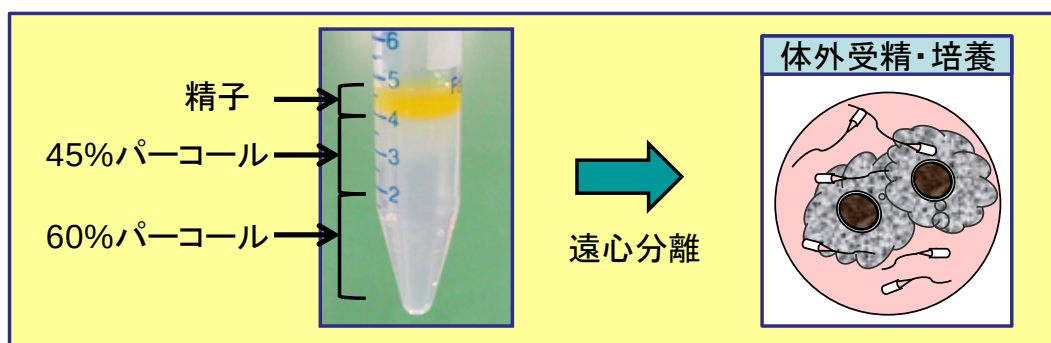


図 6. パーコールおよび精液の重層と体外受精

(解説)

- ① パーコール密度勾配液は混合しやすいため、遠心管を斜めに傾けマイクロピペットを用いて液面近くにゆっくり静かに入れる。
- ② 45%と60%のパーコールを用いているのは性選別精液を使うからであり、一般精液では45%と90%パーコールを用いる。
- ③ 精液はマイクロピペットを用いるか、精液ストローの綿栓部分を半分にカットして押棒で押し出し、パーコール密度勾配液の上にゆっくり重層する。この時も遠心管を斜めに傾けると混合を防ぐことができる。
- ④ 凍結精液に含有されている物質と IVF100 液が混合されると、精子浮遊液が白濁し、卵子が観察できないことがあるため、上澄み液は精子ペレットの上限まで吸引除去する。
- ⑤ これらの処理は、凍結精液に含まれる凍結保護物質および精漿などの夾雑物を洗浄除去し、精子の受精能獲得を促すものである。
- ⑥ 精子の処理は 37°Cで行うのが望ましいが、できない場合はできるだけ 37°Cに

温度を近づける。

- ⑦ 2 回目の遠心分離の後、加える IVF100 の量は精子数により、変更する。性選別精液の場合は 40 μ L、一般精液の場合は 300 μ L 程度とする。

2) 精子濃度の調整

1. 媒精用シャーレは、空のシャーレの底に IVF100 を 1 μ L ずつドロップにし、オイルカバーして使用するため、2 時間以上前からガス平衡しておく。
2. 血球計算盤を準備する。
3. PCR チューブに 3 % NaCl を 99 μ L 入れ、混和した精子浮遊液を 1 μ L 加える。すなわち 100 倍希釈する。
4. 残りの精子浮遊液の量はマイクロピペットを使い計量する。
5. PCR チューブをボルテックスミキサー等でよく混和する。
6. 混和した液を血球計算板に入れて精子数をカウントする。
7. IVF100 で最終精子濃度が 100 万-500 万精子/mL (種雄牛により異なる) となるよう精子浮遊液量を調製する。
8. 媒精用シャーレのドロップに精子浮遊液を加え、必要な数のドロップ (~100 μ L/ドロップ) に分注する。
9. 卵子を IVF100 で洗浄し、精子浮遊液のドロップに移し (~25 個の卵子/1ドロップ)、38.5°C、5%CO₂、95%空気、湿度飽和下で 6 時間媒精する。

(解説)

- ① 性選別処理あるいは種雄牛によって卵子の精子進入時間が異なる。
- ② マイクロピペットでの精子浮遊液の計量は精子浮遊液をある一定量マイクロピペットで吸引し、その後ピペットのつまみを廻しダイヤルを上昇させ、液が無くなったところで、値を読み取り、量を推定する。