

超音波ガイド・経膣生体卵子吸引技術（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、超音波診断装置を用いて施術を行う。この超音波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。

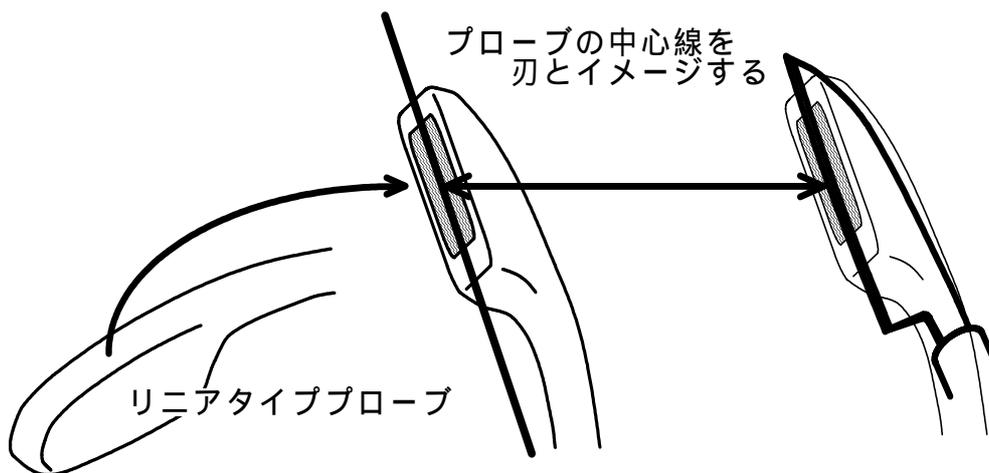
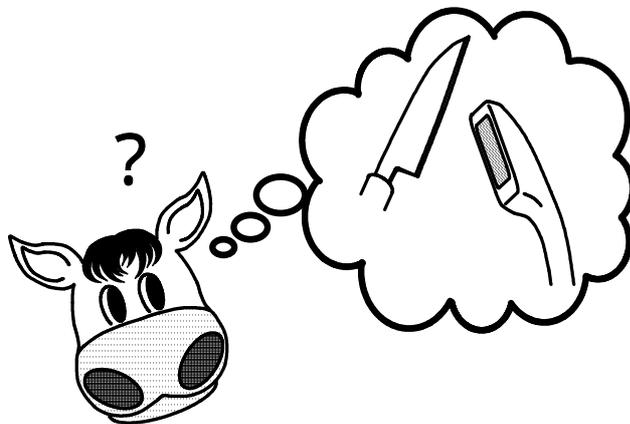


図 29 . リニアタイププローブのイメージ



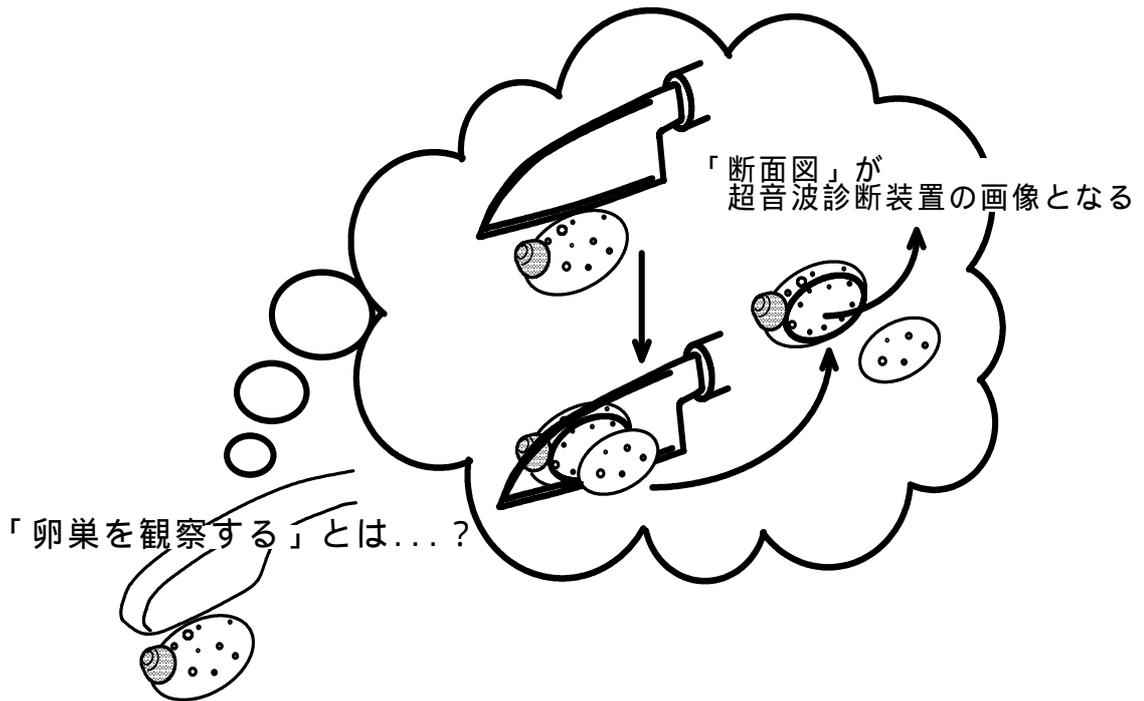


図 30 . 卵巣切断のイメージ

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で、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。

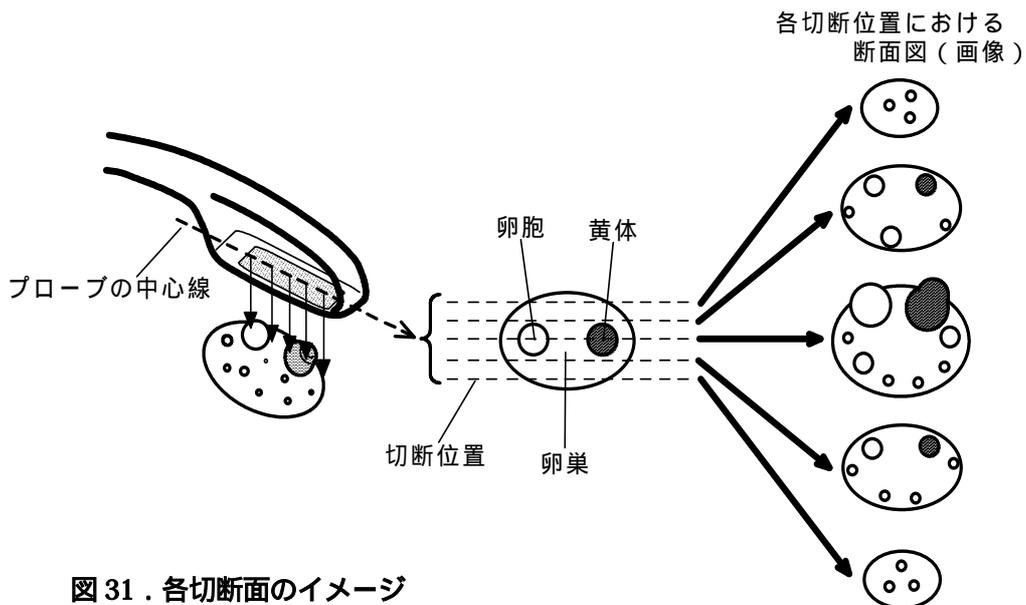


図 31 . 各切断面のイメージ

図 31 の切断方法の卵巣の位置とプローブの動きの関係は図 32 の左図のようになるが、他の切断方法として図 32 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。

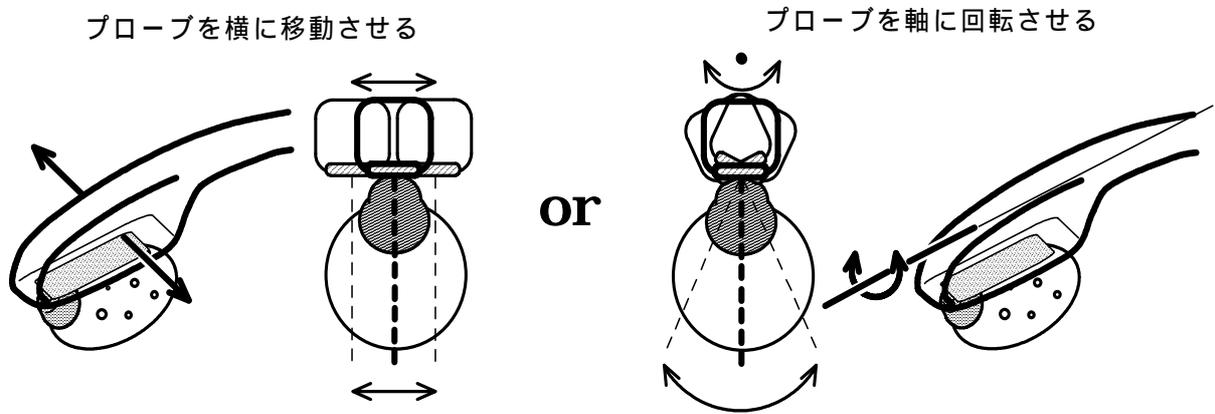


図 32 . プローブによる切断方法

2. 経膈プローブ（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膈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 33 のように扇形となる。超音波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 33 の左図のような超音波診断画像を基に技術を説明する。

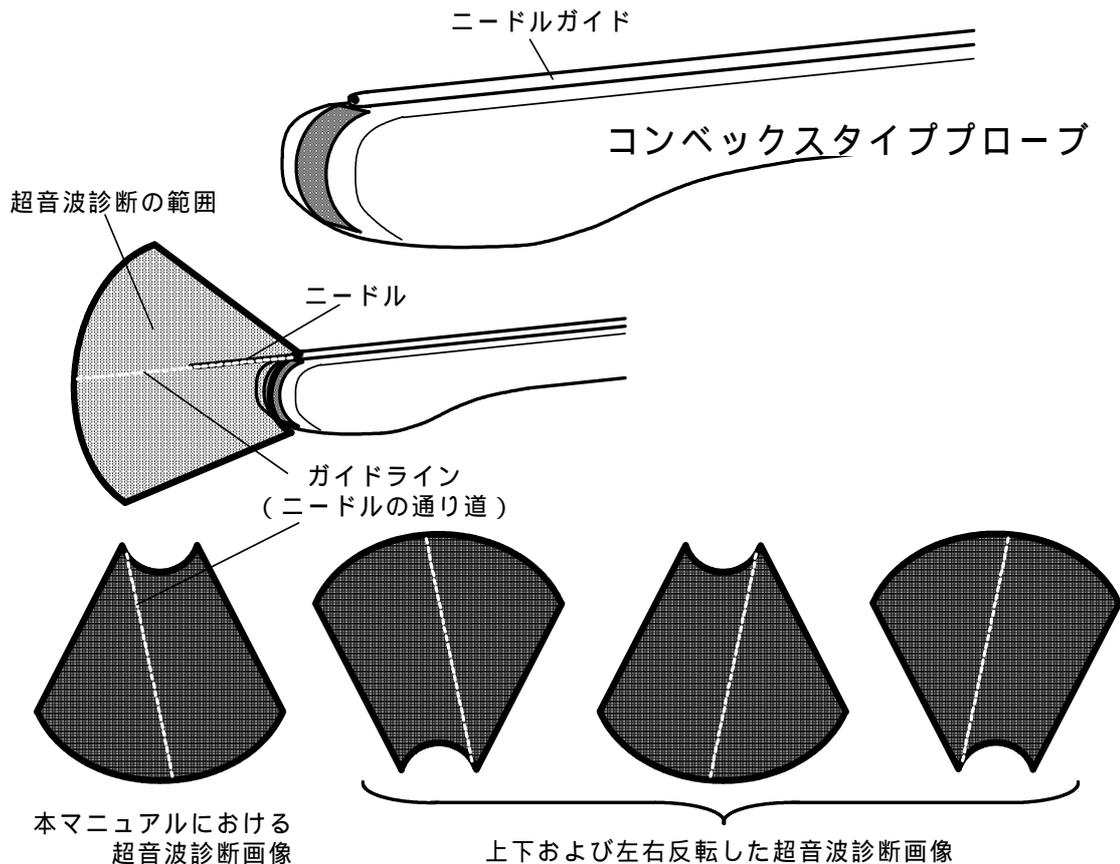


図 33 . コンベックスタイププローブとその超音波診断画像

・ 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（吸引針を用いる場合）、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。

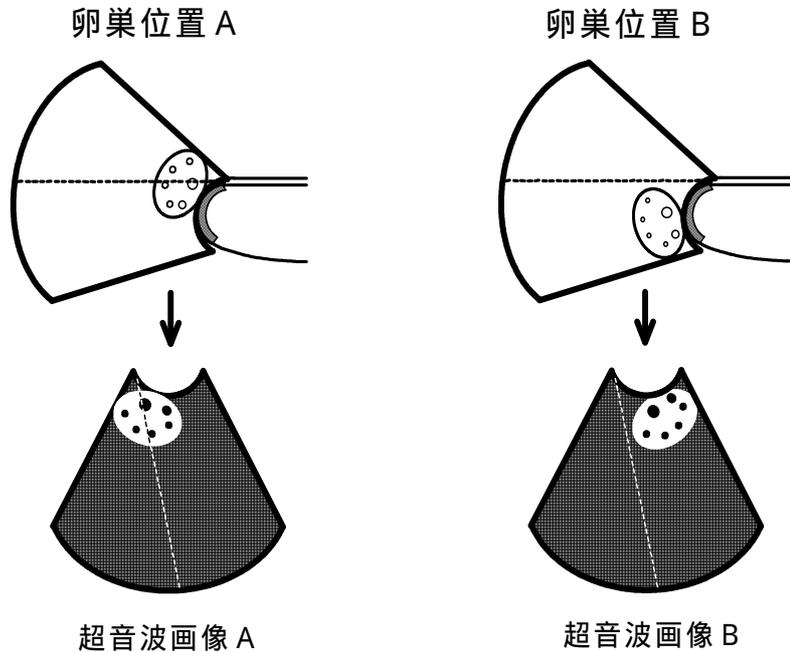


図 34 . 卵巣位置とその超音波画像

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 35 の通りとなる。

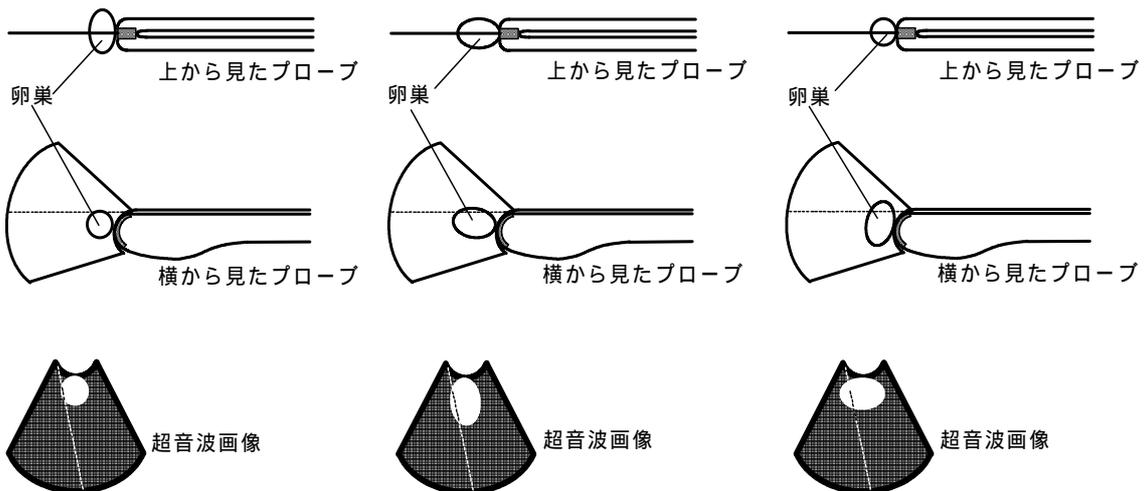


図 35 . 卵巣の向きとその超音波画像

・ 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。

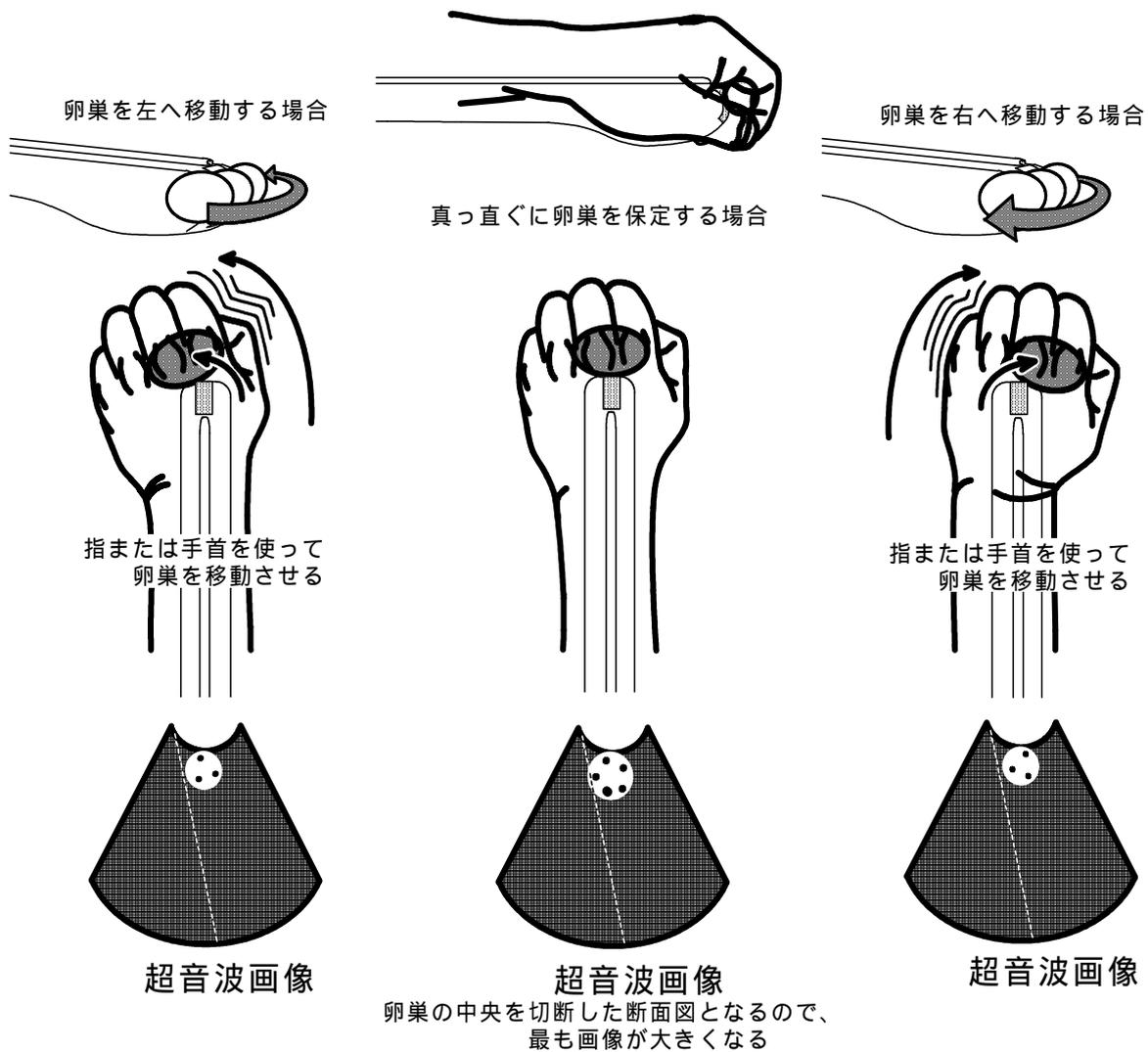


図 36 . 保定方法A

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。

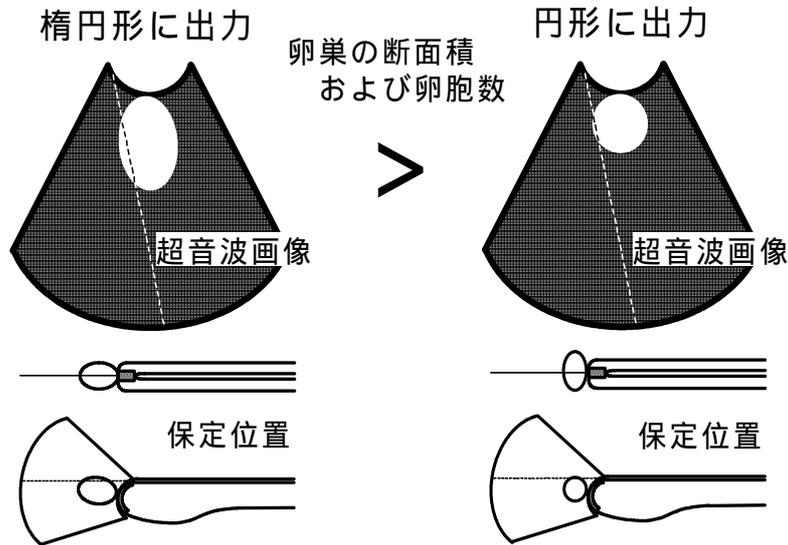


図 37 . 画像から保定方法への検討

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...

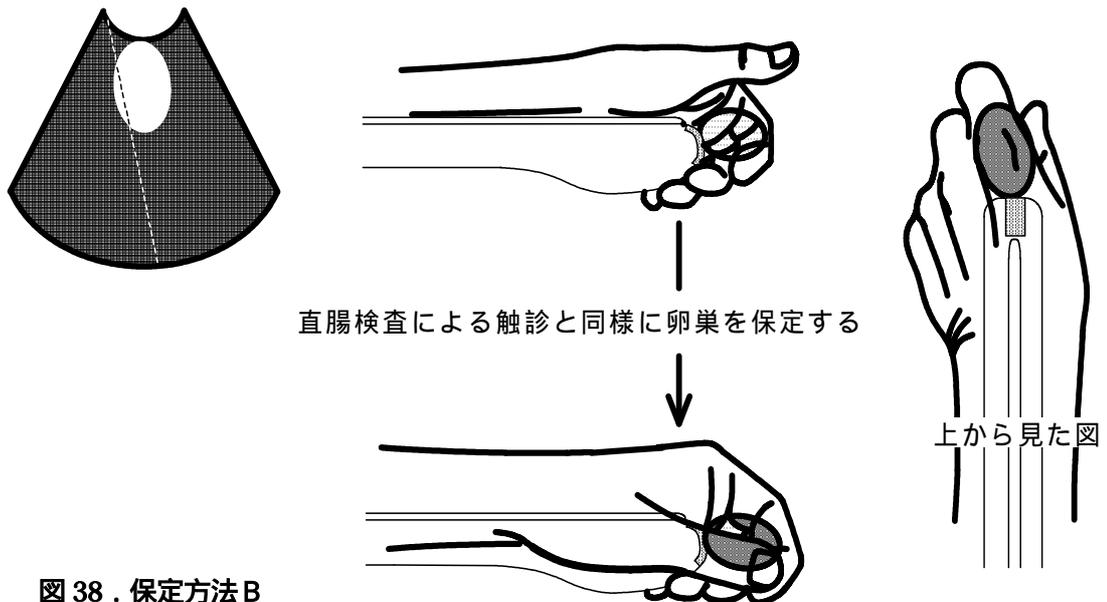


図 38 . 保定方法B

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。

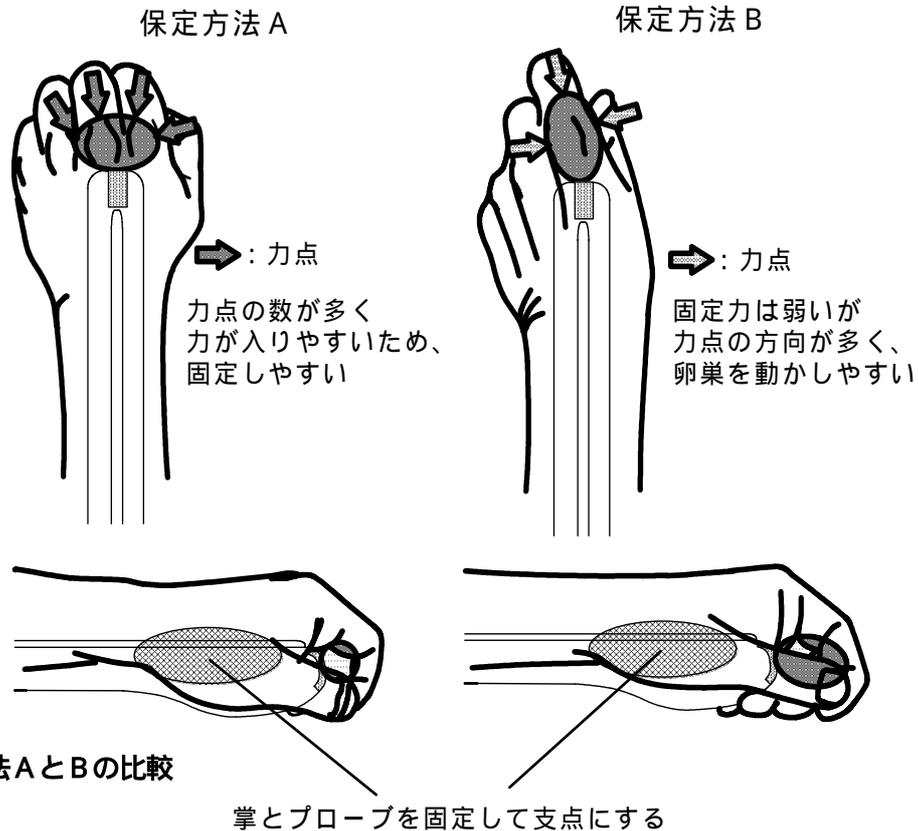


図 39 . 保定方法AとBの比較

掌とプローブを固定して支点にする

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、経膈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、膈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。膈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

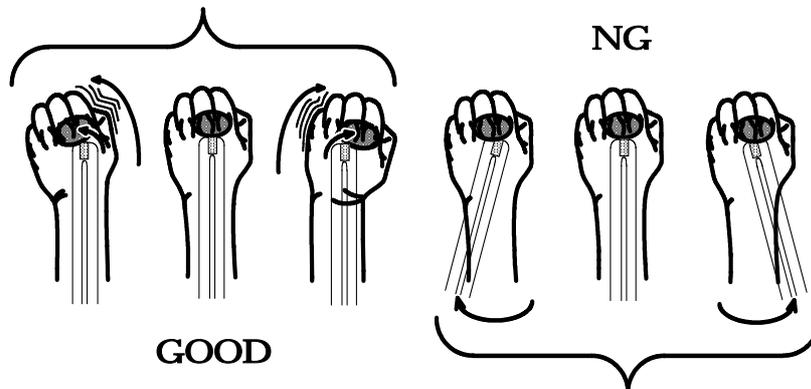


図 40 . 経膈プローブにおける切断の基本

プローブを左右に動かさない

< 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、吸引装置および吸引針が高価である。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、針先までプ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。



写真8. COVA Needleの概要

（写真提供 ミサワ医科工業）

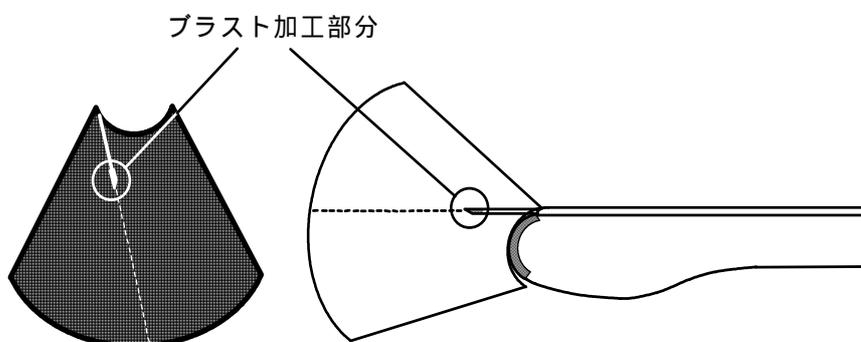


図41. プラスト加工部分の超音波画像イメージ

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42)。

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、吸引針を穿刺し、卵胞液ごと卵子を吸引採取する。図43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、吸引針および接続したチューブの太さによって異なるので、食肉センター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FV4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。

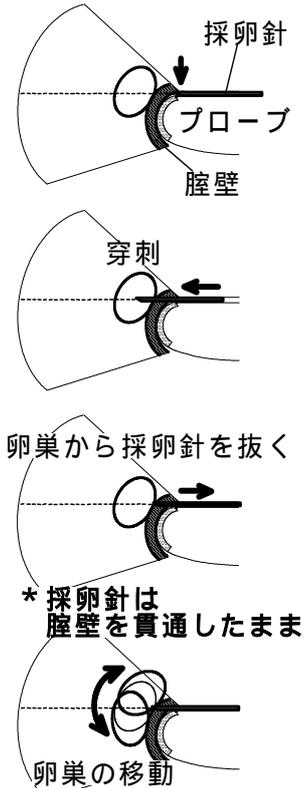


図42. 腔壁への穿刺

卵胞をガイドラインに合わせるには...

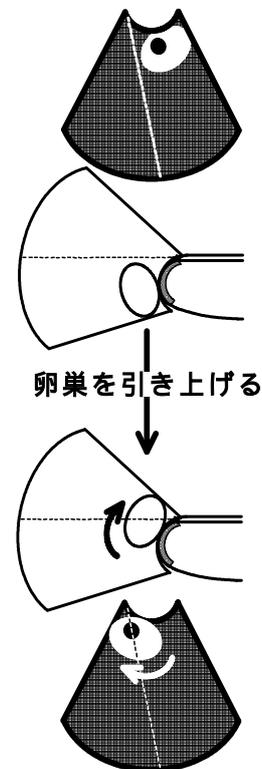


図43. 画像を見ながらの卵巣の移動

5 . 連続した卵子吸引

卵巣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、卵巣の移動と採卵針の穿刺、吸引を繰り返す。

例として、卵巣内の卵胞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内へ吸引針を穿刺する。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

一旦吸引針を引く。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。

卵巣の移動

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。

卵巣の位置および動き 超音波画像

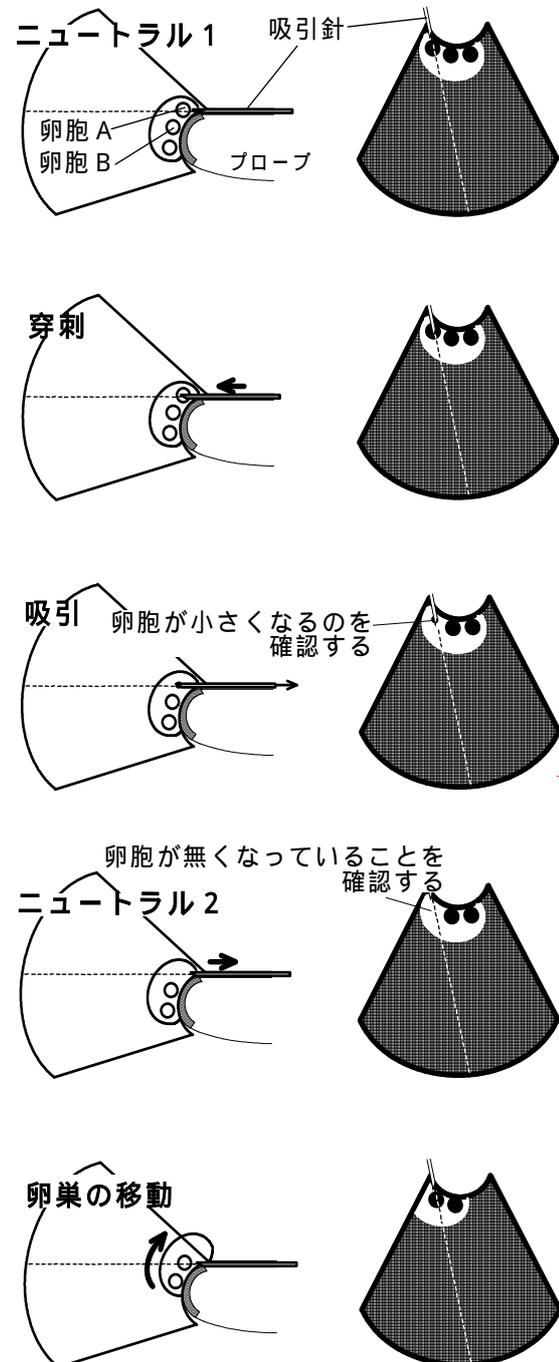


図 44 . 連続した卵子吸引

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。

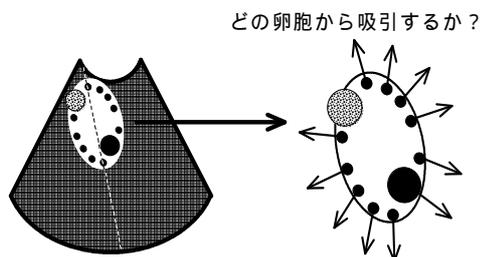


図 45 . 複数の卵胞吸引

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。

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。

卵巣の向きを約 180 度変える。

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採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。

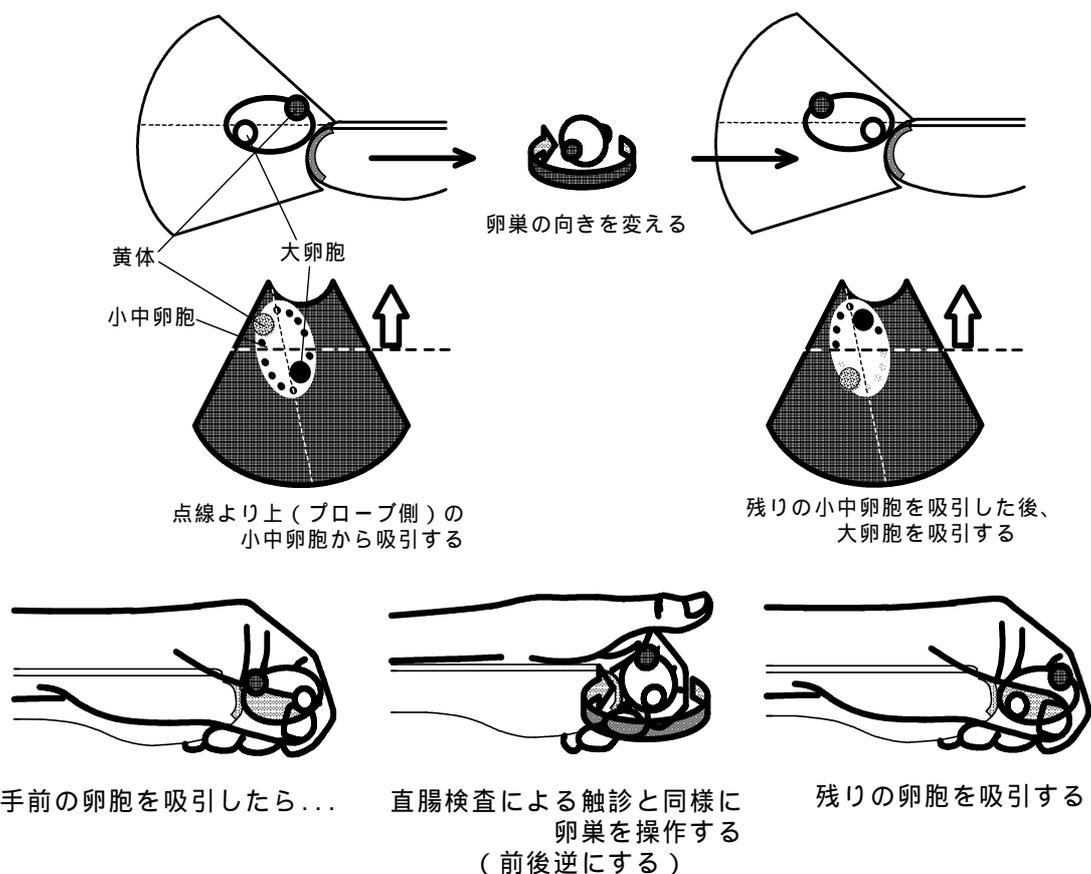


図 46 . 卵巣の向きを変えながらの卵子吸引

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。

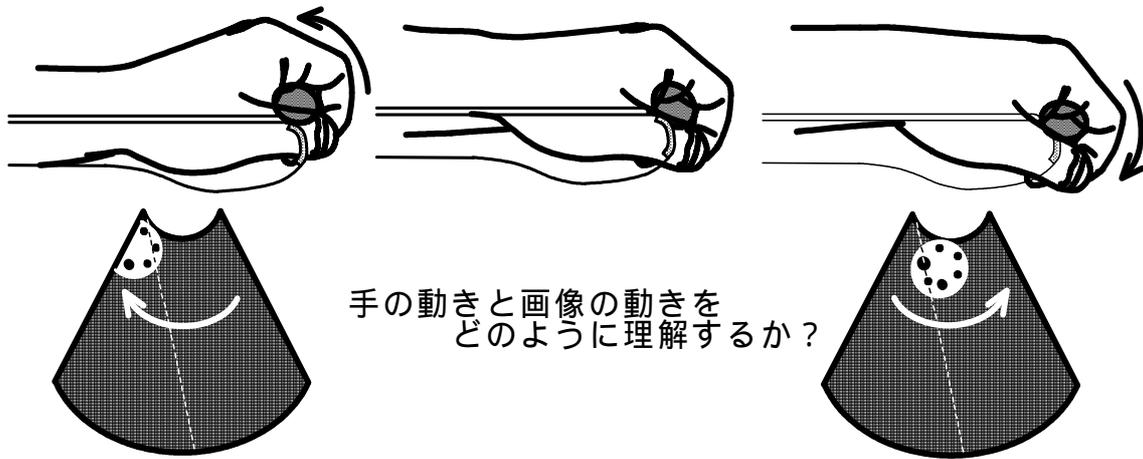
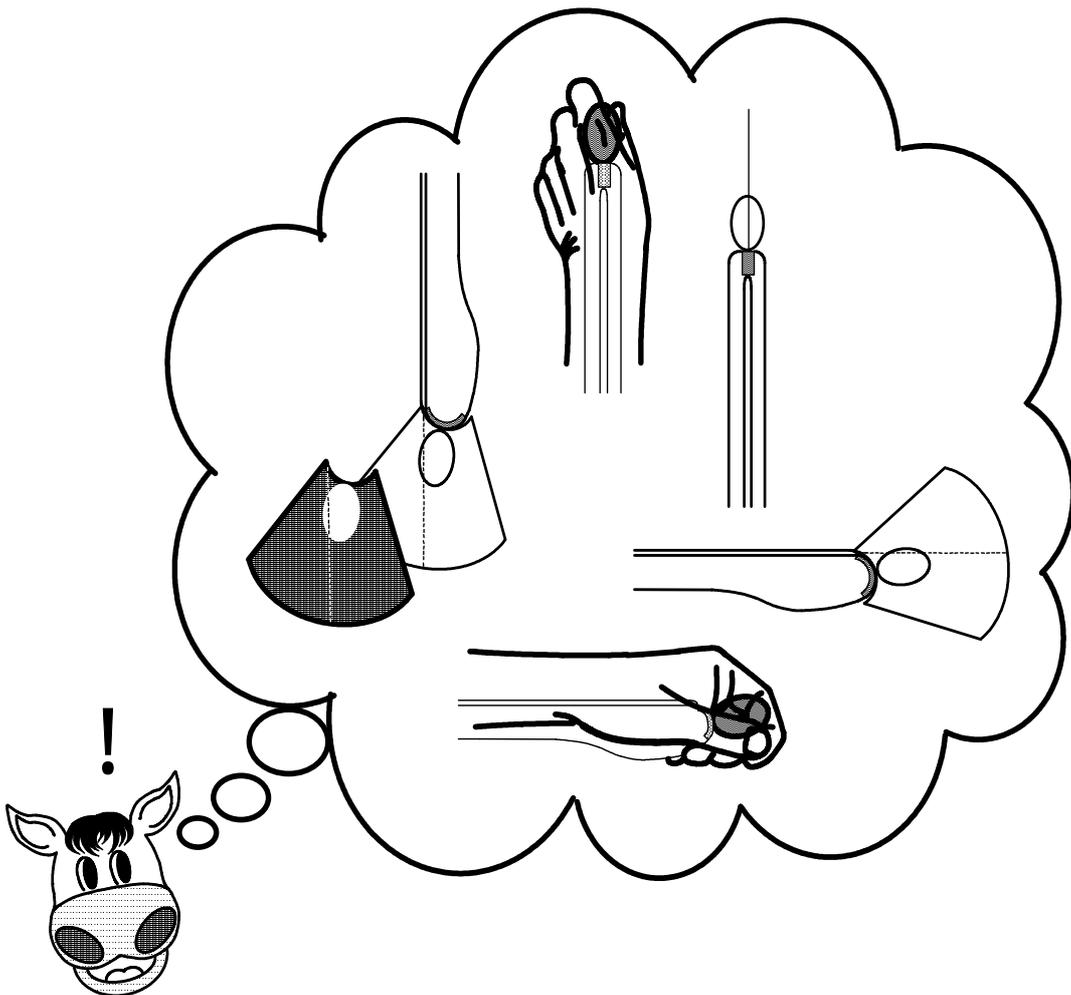


図 47 . 手の動きと画像の動き



< 生体卵子吸引の実際 >

1. 器具機材

超音波診断装置：SSD-1200 (ALOKA)

動物用電子コンベックス探触子 (プローブ)

：UST-9109P-7.5 (ALOKA)

採卵針ガイド：(FHK)

採卵針：COVA Needle (ミサワ医科工業)

吸引器：model FV4 (FHK)

恒温器：model FV5 (FHK)

採卵瓶：50ml 遠心管

その他、一般的に使われている超音波診断装置および探触子には、HITACHI 社製および本田電子社製のものがあり、採卵針および吸引装置には FHK 社製および COOK 社製のものがある。

2. 卵子保存液

1%CS 加乳酸加リンゲル液(食肉センター由来卵巣からの卵子吸引時と同様)を基礎培液として用いるが、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 時にヘパリンを添加した卵子吸引液を用いる(45 頁)。

3. 生体卵子吸引の手順

- 1) 供試牛を保定し、直腸内の糞を除去後、尾椎硬膜外麻酔を施す。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。暴れたり、落ち着きのない牛に対しては鎮静剤(セラクター等)を投与する。
- 2) 腔内に採卵針ガイドを装着したプローブを挿入し、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. 超音波診断装置と周辺機器



写真 10. 経膺プローブ

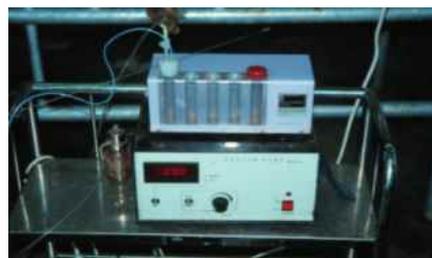


写真 11. 吸引器と恒温器



写真 12. 腔内へのプローブ挿入



写真 13. 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。数え間違えないようにスロービデオのようにゆっくりと動かす。

5) 採卵瓶に 5ml 程度の卵子吸引液を吸引する。その際、採卵針および接続チューブ内に卵子吸引液を満たし、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、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。

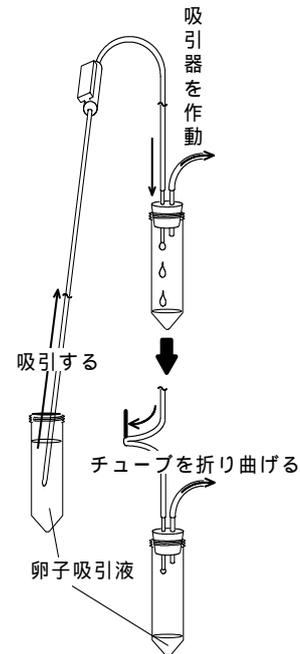


図 48 . 吸引液の吸引と停止

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。

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) OPU 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、吸引圧をさらに上げて吸引回収する。それでも回収出来ない場合は、19G 注射針をつけた注射筒を用いて卵子吸引液を採卵針内に強制的に灌流する (19G 針は 17G の採卵針の内径より細く、その中にすっぽりに入る)。

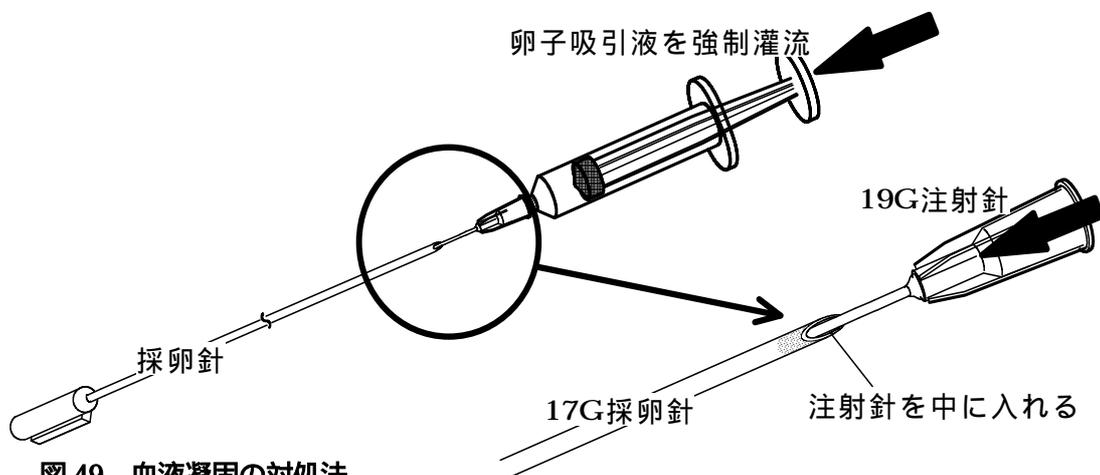


図 49 . 血液凝固の対処法

- 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 50）。
- 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、一旦血餅をピ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 51）。

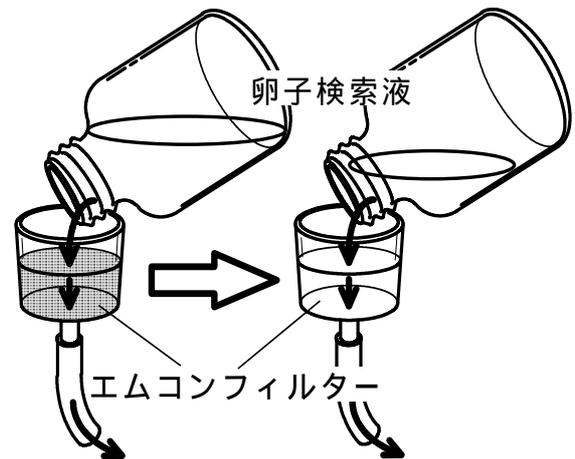


図 50 . 採取液の濾過

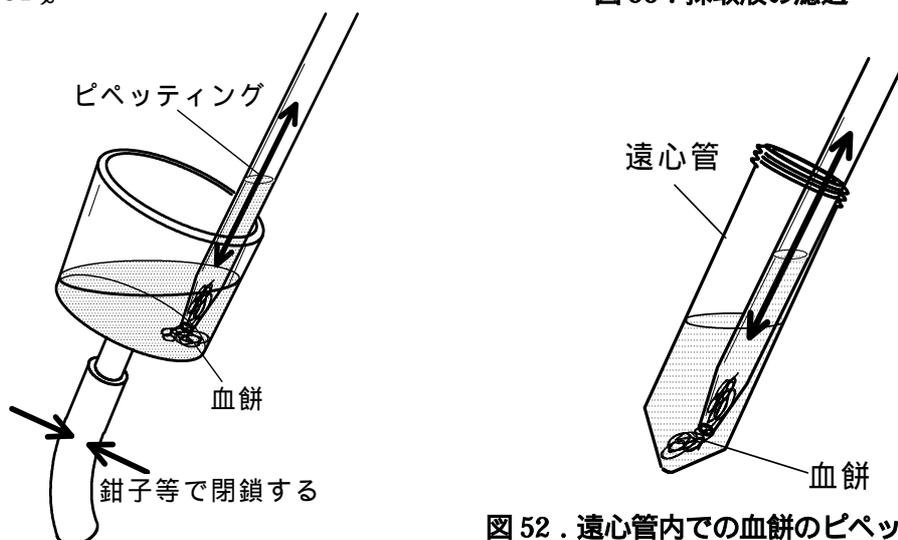


図 52 . 遠心管内での血餅のピペッティング

図 51 . フィルター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ため、数回繰り返す。透明になった後の血餅は、卵子検索用の 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。

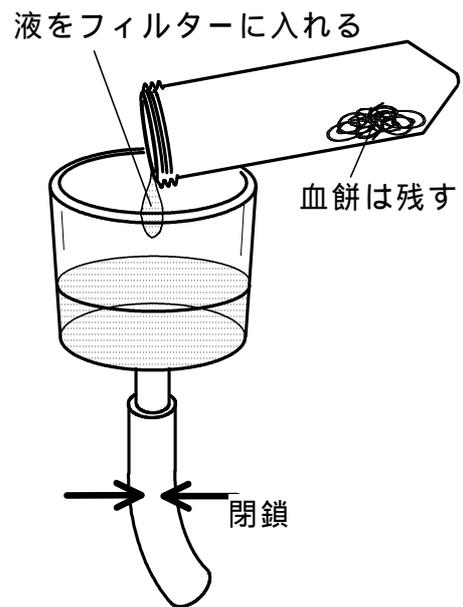


図 53 . フィルターへの液の回収

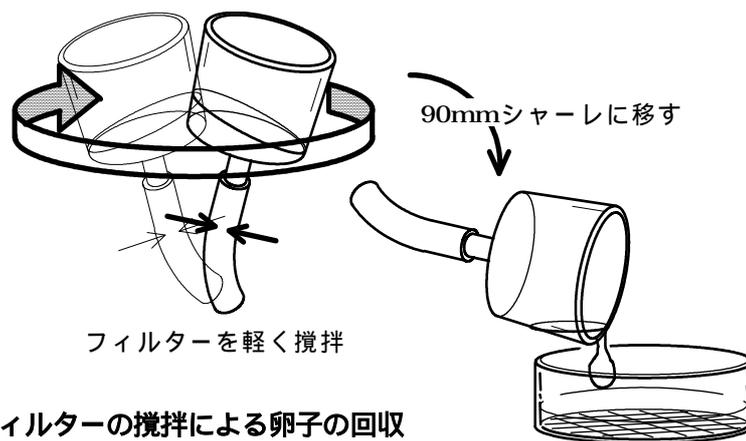


図 54 . フィルターの攪拌による卵子の回収

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。

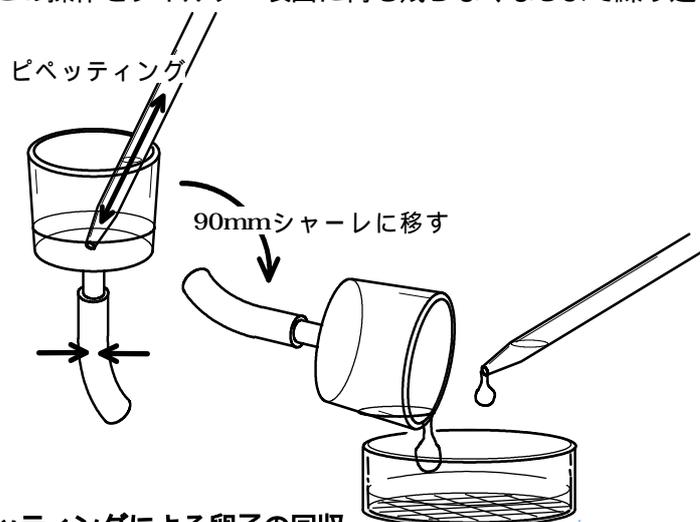


図 55 . フィルター内のピペッティングによる卵子の回収

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。

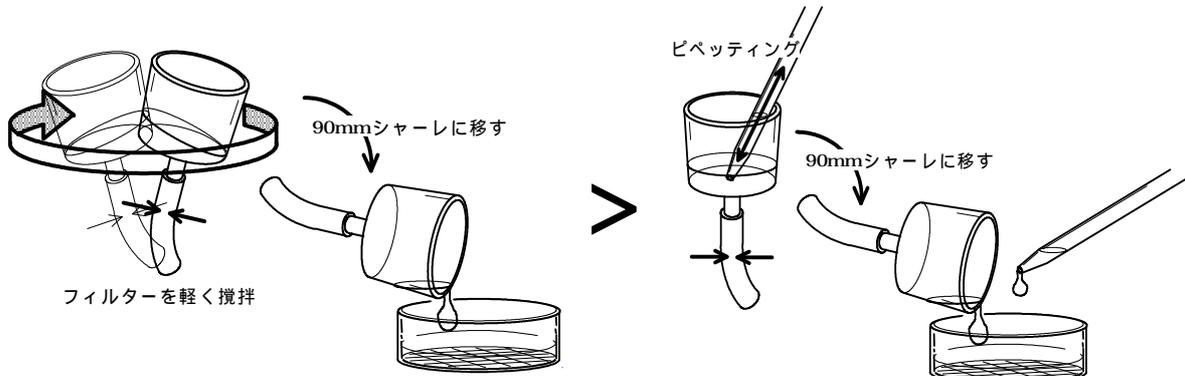


図 56 . 攪拌とピペッティングの比較

5 . 卵子の検索

- 1) 基本的に屠体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。屠体由来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囲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 57）。
- 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。その様な時は、再度エムコンフィルターに血餅を移し、ピペティングを行う。
- 6) 同様にして検索を繰り返す。
- 7) OPU を行うドナー牛は、遺伝的能力が高い牛が多いため、一つの卵子でも検索ミスは避けるようにする。

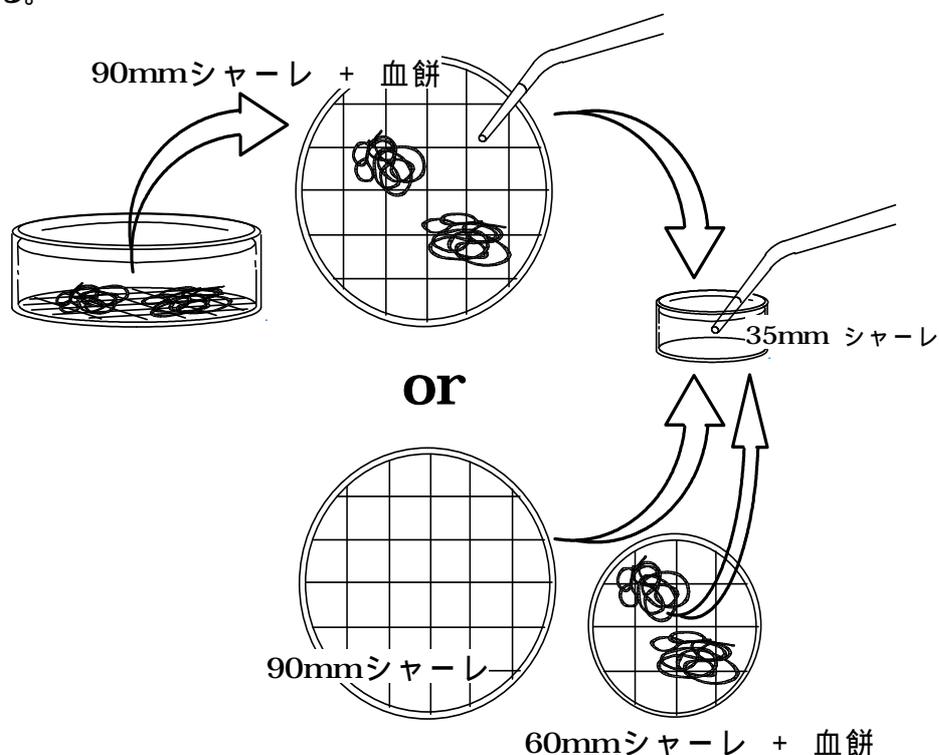


図 57 . 血餅が存在する場合の卵子検索

各種溶液の調製

< 卵子吸引 ~ 成熟培養 >

生理食塩水 (1%) : 卵巣運搬液

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

NaCl (9.0 g) を超純水で攪拌溶解後、1%にメスアップする。

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。

オートクレーブ (121℃、15 分間) で滅菌する。

1%CS 加 乳酸加リンゲル液 (1%) : 採取卵子検索用

乳酸加リンゲル液	1000 ml
----------	---------

CS	10 ~ 10.1 ml
----	--------------

抗生物質 PC-SM (29 頁参照)	1000 μl
---------------------	---------

市販の乳酸加リンゲル液 1000ml に、CS を 10 ~ 10.1ml 入れ、抗生物質を 1000μl 添加して転倒混和する。

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%CS-乳酸加リンゲル液 (100ml) : OPU 卵子吸引液

1%CS 加 乳酸加リンゲル液	100 ml
-----------------	--------

ノボヘパリン	1 ml
--------	------

- ・ 上記 1%CS 加 乳酸加リンゲル液にノボヘパリンを 1ml 加える。調製量は、施術頭数により変更する。

5%CS 加 25mM Heparin 緩衝 TCM-199 (100ml): 成熟培養液

25mM Heparin 緩衝 TCM-199	95.0 ml
CS	5.0 ml
抗生物質 PC-SM	100 μ l

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。
0.22 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 58 . 5%CS 加 25mM Heparin 緩衝 TCM-199 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

ビーカーに 50ml 程度の超純水を入れ、上記薬品を溶解する。

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。

メスシリンダーに溶液を移し、100ml にメスアップする。

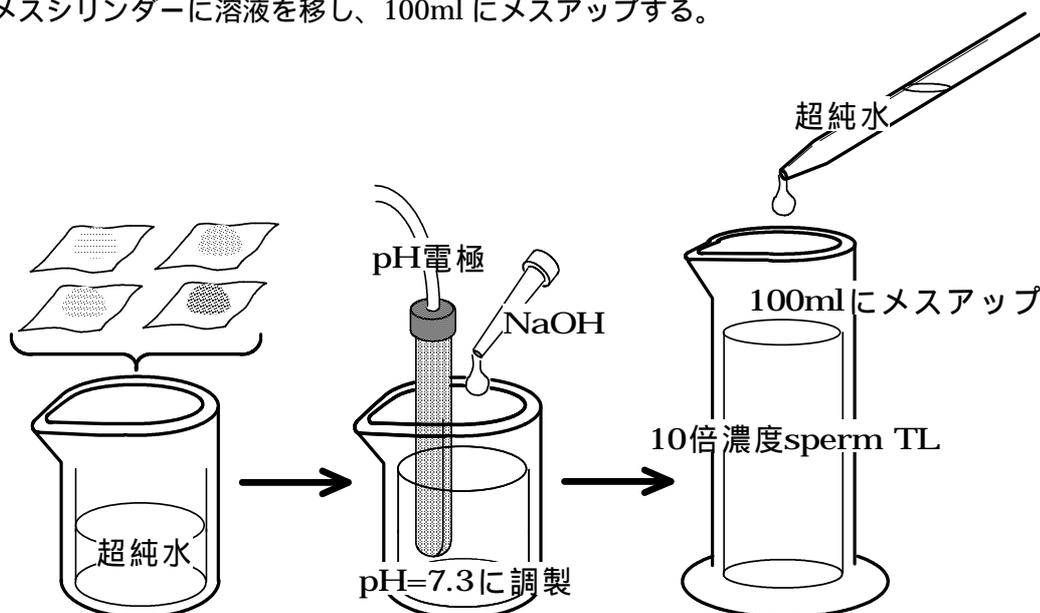


図 59 . 10 倍濃度 sperm TL の調製

90%パーコール液 (50ml): 生存精子選別溶液

a) Percoll		45 ml
b) 10倍 sperm TL		5 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) DL-Lactic acid (syrup)		184 μl
f) 重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	0.1045 g
g) 0.5% フェノールレッド		10 μl
* c) 1M CaCl ₂ : 1.1098g / 10ml		
1M CaCl ₂ · 2H ₂ O : 1.4701g / 10ml		
d) 0.1M MgCl ₂ · 6H ₂ O : 0.2985g / 10ml		

a)とb)を混和し、50ml に調製する

c) ~ g)の試薬を加え、転倒混和する。

0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する。

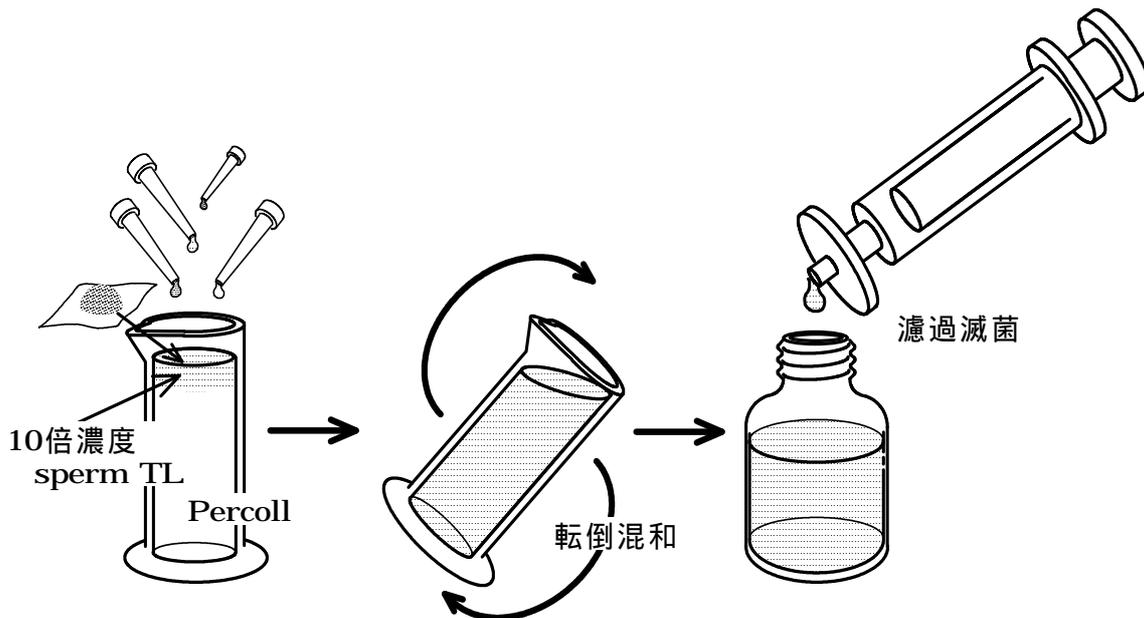


図 60 . 90%パーコール液の調製

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	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2171 g
(塩化カルシウム無水塩の場合: CaCl ₂ 0.1639 g)		
リン酸二水素ナトリウム二水塩	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.0840 g
(リン酸二水素ナトリウム無水塩の場合: NaH ₂ PO ₄ 0.0646 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

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。
0.22 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)。

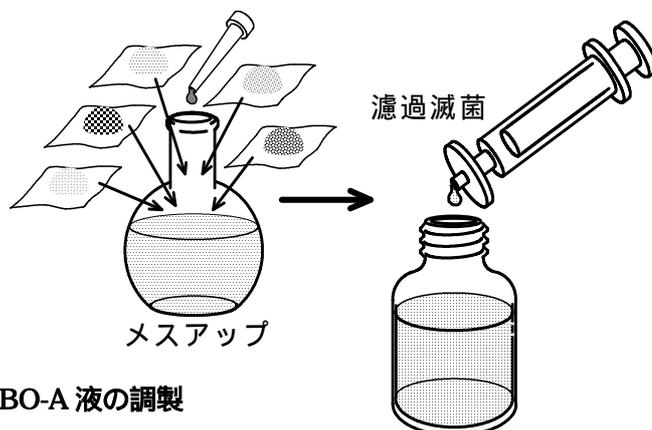


図 61 . BO-A 液の調製

* 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) は水分を吸着し易いため、以下の方法で秤量する。

秤量皿で秤量する。

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。

を数回繰り返す。

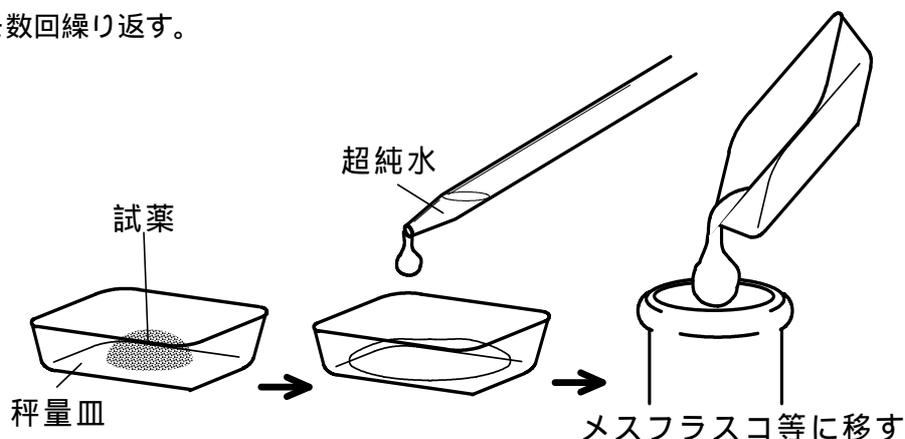


図 62 . 秤量皿での秤量

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。

秤量皿で試薬の 10 倍の量を秤量する。

少量の超純水を加えて試薬を溶解する。

溶解した液をメスピペット等で量る。

溶解液の 1/10 量を調製液（メスフラスコ等）に入れる。

* の量について、場合によっては 2~5 倍でも構わない。 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。

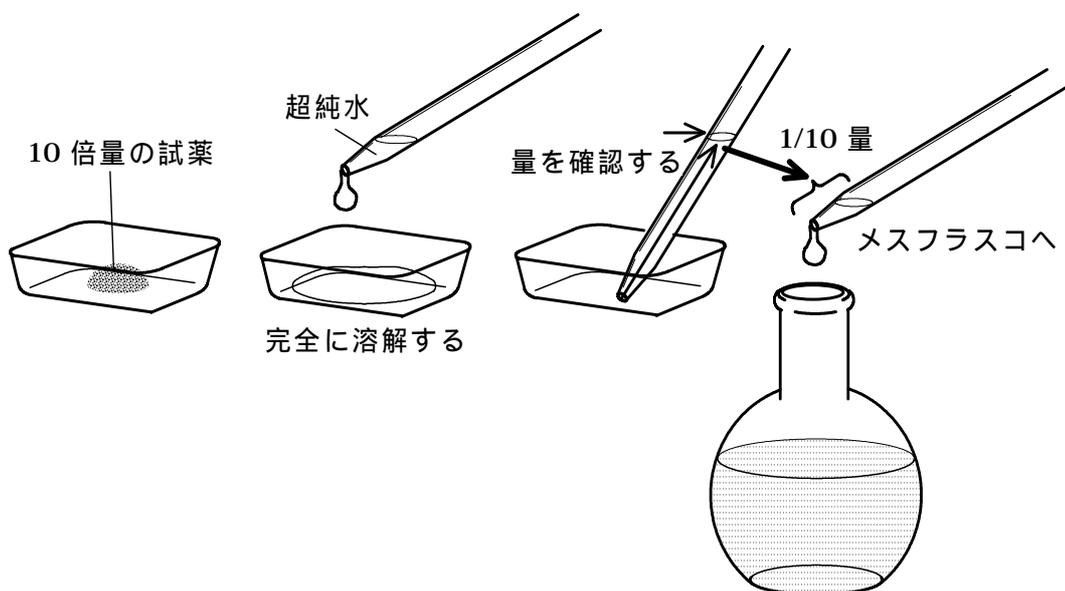


図 63 . 10 倍量秤量法

BO-B 液 (200ml): BO 液調製用ストック液

重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	2.5873 g
0.5% フェノールレッド		40 μl

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。

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 CO₂ ガスを通気する。

0.22 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 CO₂ 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。

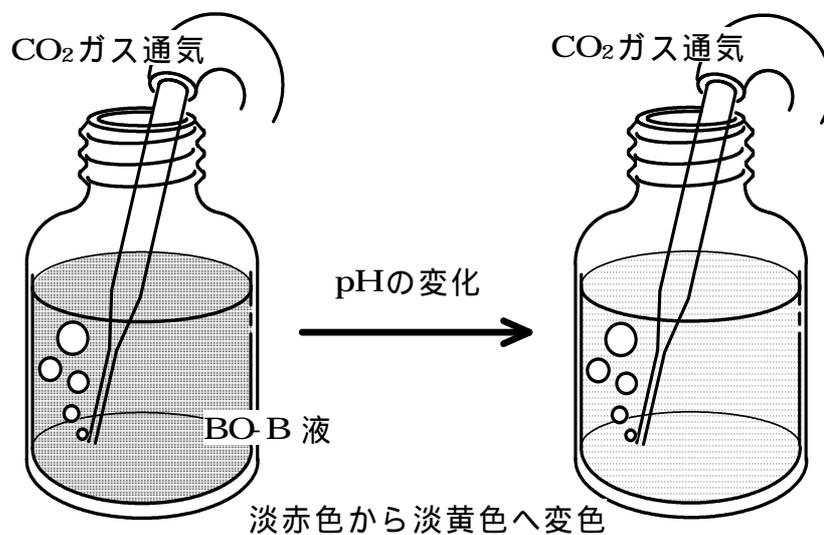


図 64 . BO-B 液への CO₂ ガス通気

- * ストック液調製の際に CO₂ 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 (容器内の空気で変化する)、後述の BO 液調製の際に再び CO₂ 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 ml (メスアップ)
BO-B 液	24 ml (メスアップ)
抗生物質 PC-SM	100 μ l

100ml のメスシリンダーにピルビン酸ナトリウムを入れる。

BO-A 液でピルビン酸ナトリウムを溶解し、76ml までメスアップする。

BO-B 液に CO₂ を淡黄色になるまで通気する。

の液に BO-B 液を 24ml 加える (100ml の目盛りまでメスアップ)。

抗生物質を 100 μ l 加える。

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(54 頁、図 65)。

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 ハイポタウリン + 10u/ml ヘパリン

BO 液	10 ml
ハイポタウリン	0.01091 g
ヘパリンナトリウム注射液（ホヘパリン）	100 μ l

以上を順次溶解し、転倒混和する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、使用時まで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 ml
BSA (crystallized and lyophilized)	0.2 g

BO 液をビーカー等に移し、BSA を静置溶解する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、使用時まで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 ml
BSA (crystallized and lyophilized)	0.5 g

BO 液をビーカー等に移し、BSA を静置溶解する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌する。

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。

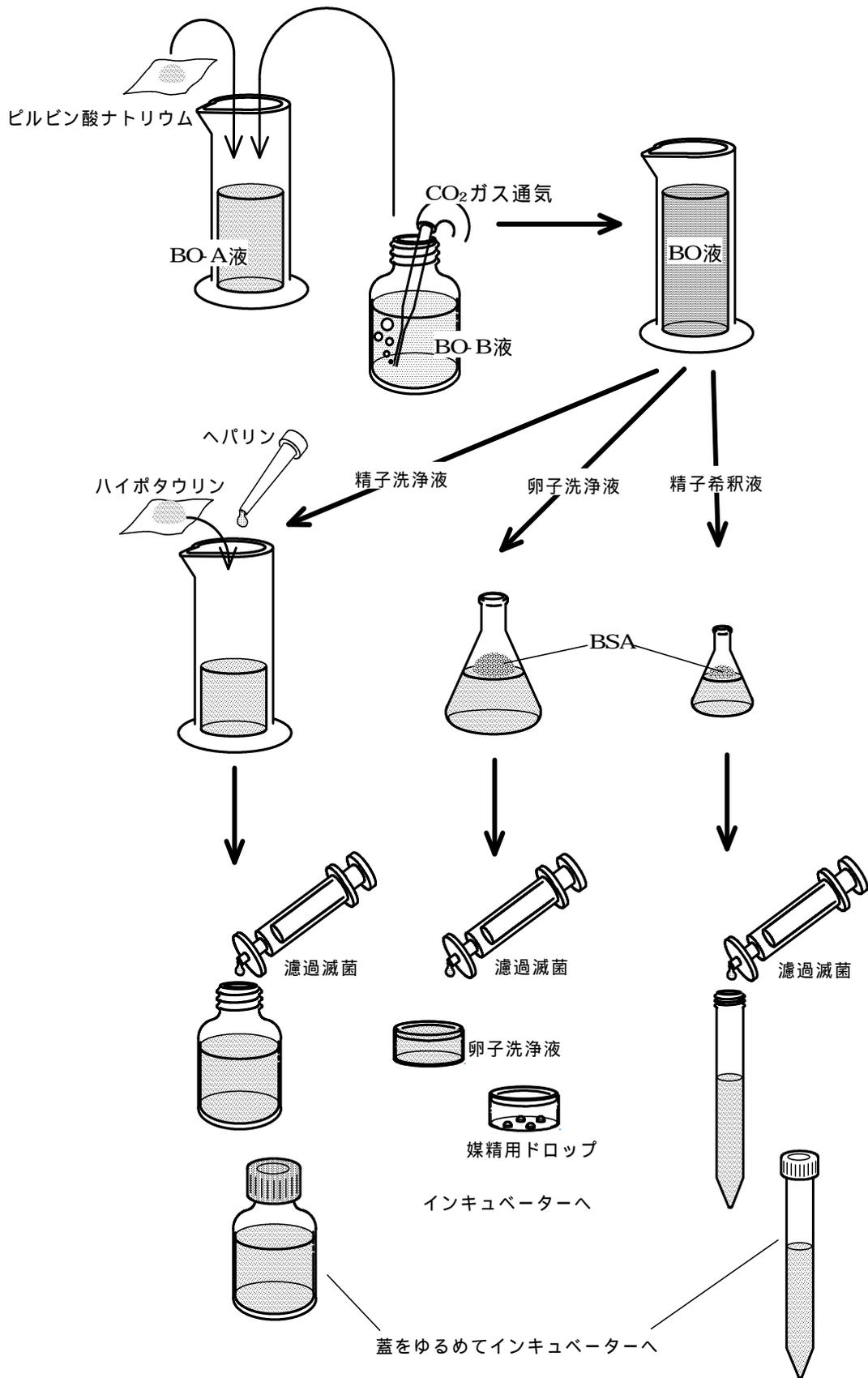


図 65 . 精子処理液調製法

< 発生培養 >

1. CR1aa の調製：発生培養の基礎培地（CS 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
重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	2.2011 g
0.5%フェノールレッド		2.0 ml

1リットルのメスシリンダーに上記試薬を超純水で順次溶解し、760ml までメスアップする。
0.22μm 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）。

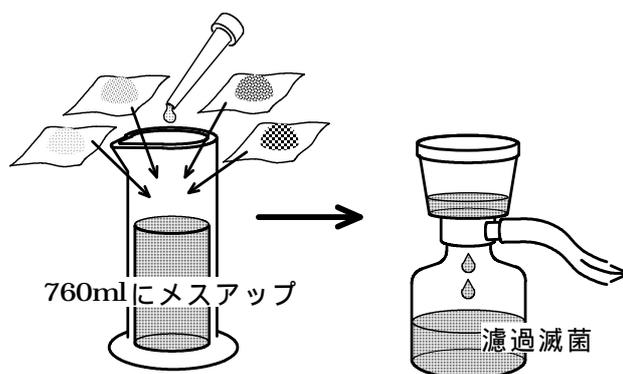


図 66 . CR1-A 液の調製

CR1-B 液（200ml）：CR1aa 調製用ストック液

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

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。
0.22μm 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）。

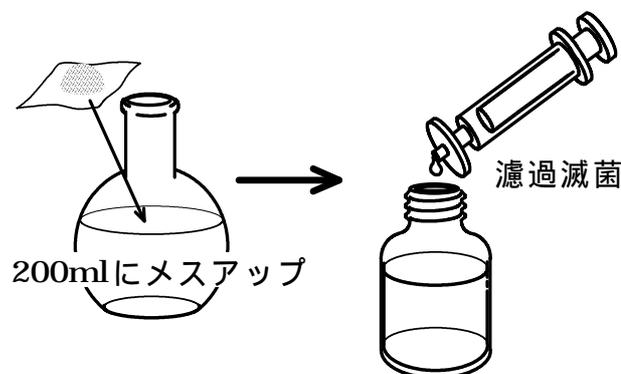


図 67 . CR1-B 液の調製

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

a) CR1-A 液	76 ml
b) CR1-B 液	20 ml
c) BME Essential Amino Acids (× 50)	2 ml
d) MEM Nonessential Amino Acids (× 100)	1 ml
e) L-Glutamic acid (1 アンプル 20mg を超純水 10ml で溶解)	1 ml
f) BSA (Fatty Acid-free)	0.3 g
g) 抗生物質 PC-SM	100 μl

ビーカー等に a) ~ e) をメスピペットで入れ混和する。

BSA (Fatty Acid-free) を静置溶解する。

抗生物質 PC-SM を入れ、混和する。

血清を添加して使用する場合は、5%CS 加 CR1aa の調製に従う。

血清を添加しない場合は、0.22μm 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%CS 加 CR1aa (105.26ml) : 発生培養液

CR1aa	100 ml
CS	5.26 ml

100ml の CR1aa に、CS を 5.26ml 加え転倒混和する。

0.22μm 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) 。

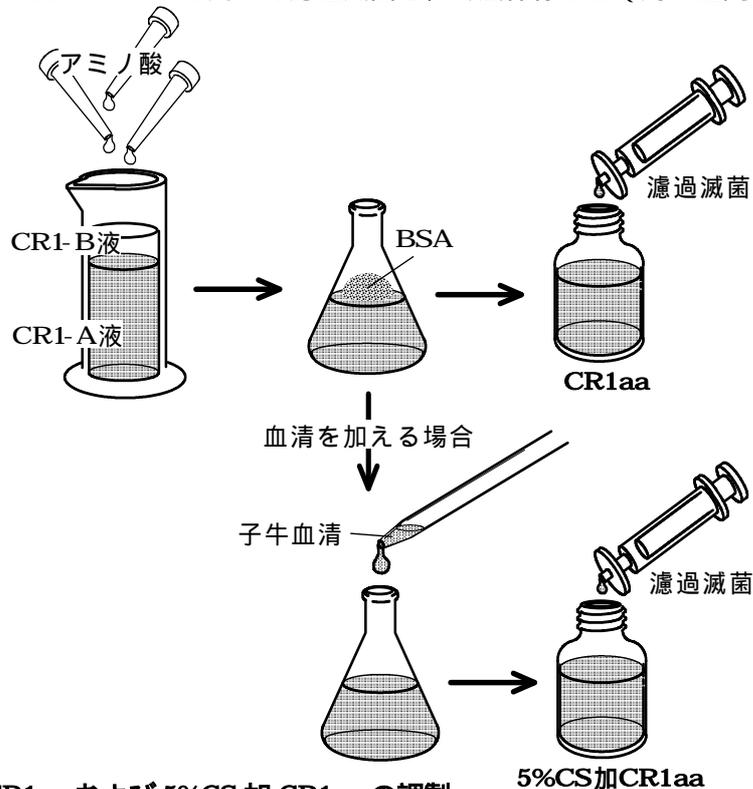


図 68 . CR1aa および 5%CS 加 CR1aa の調製

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%CS 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 (約 1 ヶ月間)。

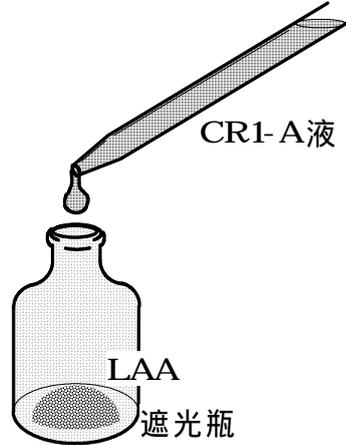


図 69 . LAA ストック液の調製

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

5%CS 加 CR1aa 10ml からマイクロピペットを用いて 50 μ l 取り除く。

LAA ストック液を 50 μ l 加え、転倒混和する。

0.22 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。

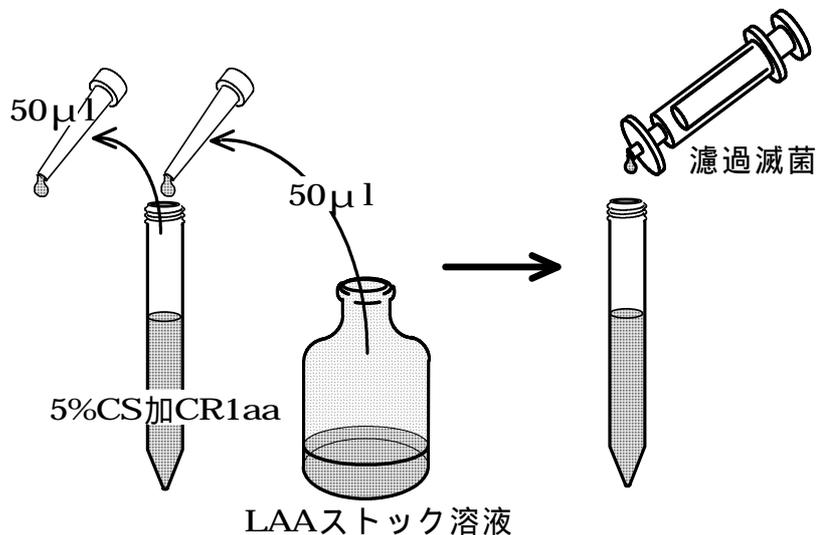


図 70 . 0.25mg/ml LAA + 5%CS 加 CR1aa の調製

< 体外受精卵の凍結・融解 >

1. 修正ダルベッコ 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。

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

- ・ 1 リットルのメスフラスコに約 700ml 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。

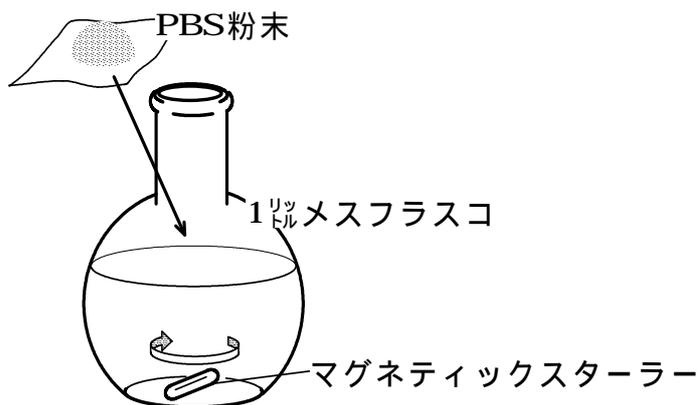


図 71 . PBS-A 液の調製

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、修正ダルベッコ 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)

塩化カルシウム無水塩	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

上記試薬を超純水で溶解し、100ml にメスアップする。

0.22 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 100ml)

10ml の金属塩類ストック液を約 100ml の超純水で希釈し、PBS-B 液とする。

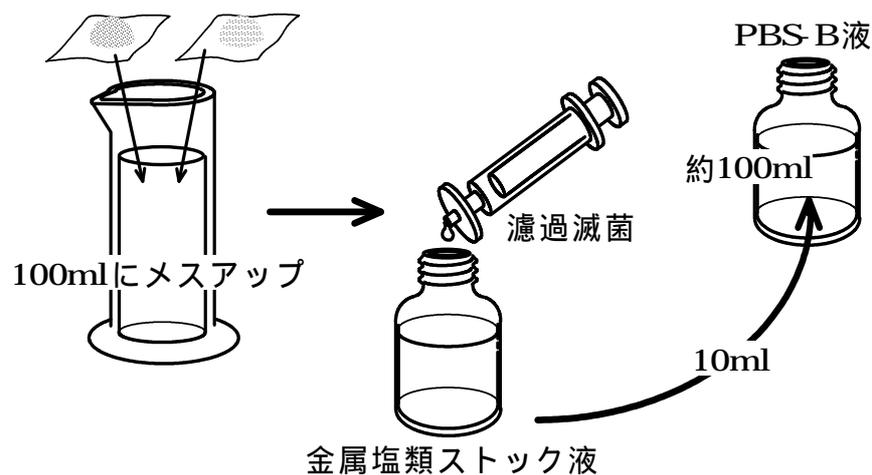


図 72 . PBS-B 液の調製

修正ダルベッコ PBS : D-PBS + ピルビン酸ナトリウム + グルコース (1リットル) : 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
ブドウ糖	1.0 g
ピルビン酸ナトリウム	0.036 g

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。

約 800ml の D-PBS(+)液にブドウ糖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リットルにメスアップする。

0.22 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)。

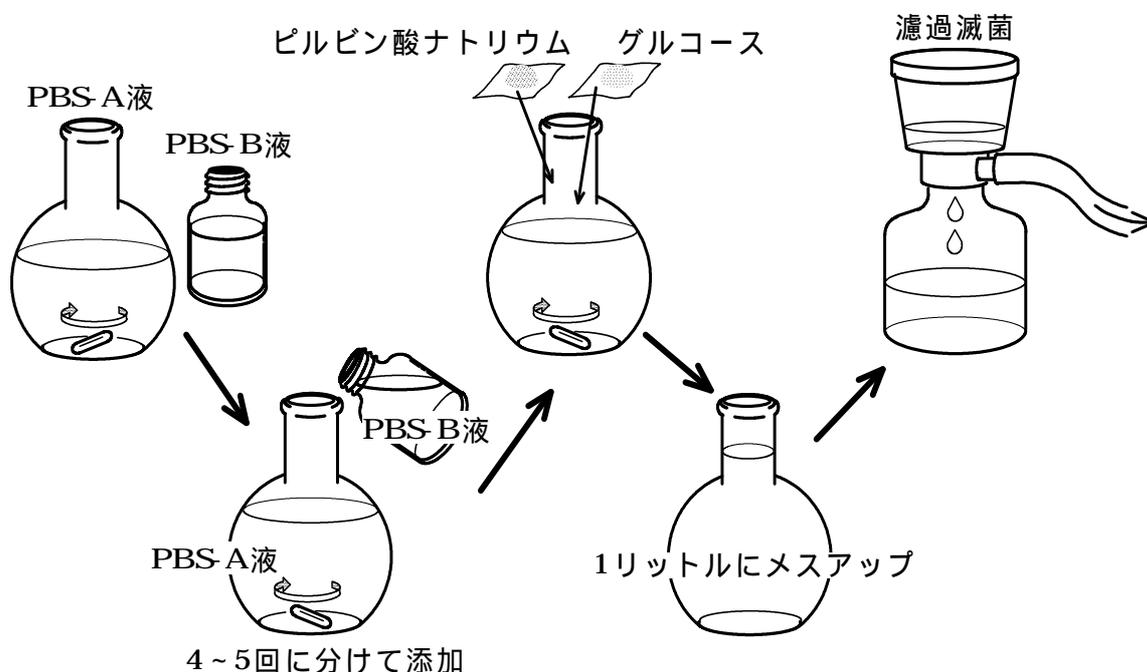


図 73 . 修正ダルベッコ PBS の調製

2. 凍結保存液の調製

20%FCS 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 ml
b) FCS	2 ml
c) BSA (fraction V)	0.04 g
d) 抗生物質 PC-SM	10 μ l

ビーカー等に a)、b)をメスピペットで入れ混和する。

BSA (fraction V)を静置溶解する。

抗生物質 PC-SM を入れ、混和する。

凍結保存液を調製する場合は、1.5M EG + 0.1M Suc + 20% FCS 加 m-PBS の調製に従う。

凍結保存液を調製しない場合は、0.22 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 イソングリコール + 0.1M シュクロース + 20% FCS 加 m-PBS (10ml): 凍結保存液

シュクロース (Suc)	0.3423 g
イソングリコール (EG)	0.83 ml
20%FCS 加 m-PBS	10 ml (メスアップ)

メスシリンダーに Suc を入れる。

20% FCS 加 m-PBS を 5~6ml 加え、Suc を完全に溶解する。

EG を 0.83ml 加える。

20% FCS 加 m-PBS で 10ml までメスアップする

パラフィルムでシールし、転倒混和する。

0.22 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)。

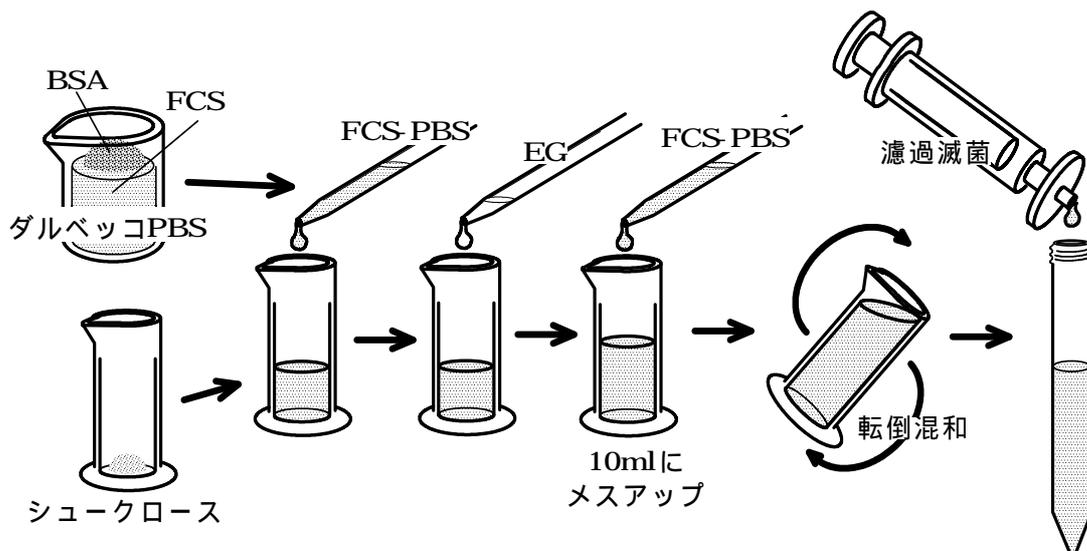


図 74 . 20%FCS 加 修正 D-PBS

および 1.5M イソングリコール + 0.1M シュクロース + 20% FCS 加 m-PBS の調製

3. 融解後の培養液の調製

20%FCS + 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。

-メルカプトエタノールストック液 (10ml)

TCM-199	10 ml
-メルカプトエタノール (ME)	7 μl

10ml の TCM-199 を試験管に入れる。

マイクロピペットを用いて試験管中の TCM-199 を 7μl 取り除く。

ME を 7μl 加える。

パラフィルムでシールし、転倒混和する。

0.22μm 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。

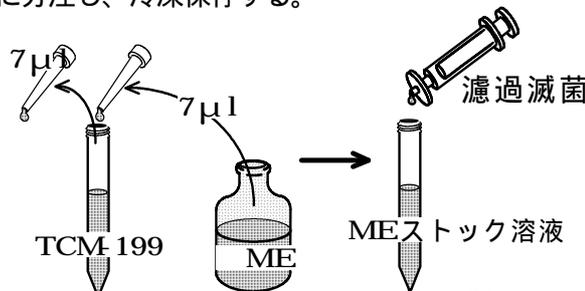


図 75 . β-メルカプトエタノールストック液の調製

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

TCM-199	7.9 ml
ME ストック溶液	100 μl
FCS	2.0 ml
抗生物質 PC-SM	10.0 μl

TCM-199 を 7.9ml 試験管に入れる。

マイクロピペットを用いて βME ストック溶液を 100μl 加える。

FCS を 2.0ml 加える。

抗生物質を 10μl 加え、パラフィルムでシールし転倒混和する。

0.22μm 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)。

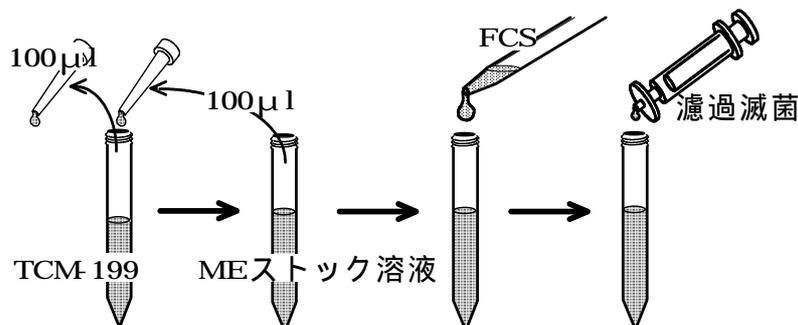


図 76 . 20%FCS + 0.1mM βME + TCM-199 の調製

< 培養液全般 >

1. 子牛血清 (CS) の非働化

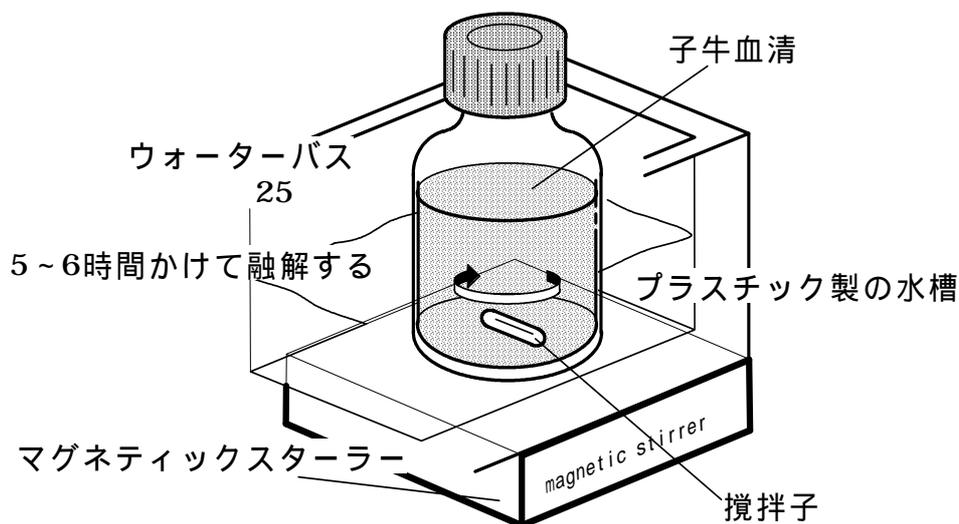
CS の融解

凍結状態の CS 容器を 25 のウォーターバスで完全に融解する。

液体の状態になっても CS 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、CS 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。**

- 数分おきに手で容器を振って攪拌する。
- シェーカーを用いる。
- 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容器内を攪拌する (図 77)。



プラスチック製水槽の下に、
マグネティックスターラーをセットする

図 77 . CS の融解 c)法

CS の非働化

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。CS 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

5-6 時間保温した状態 (25) から非働化を開始する。

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。

56 になった時点で非働化を開始する (30 分間)

終了したら CS 容器を取り出し、室温程度まで CS の温度を下げ、ボトルフィルタユニット等 (0.22 μm) で濾過滅菌を行う。

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。

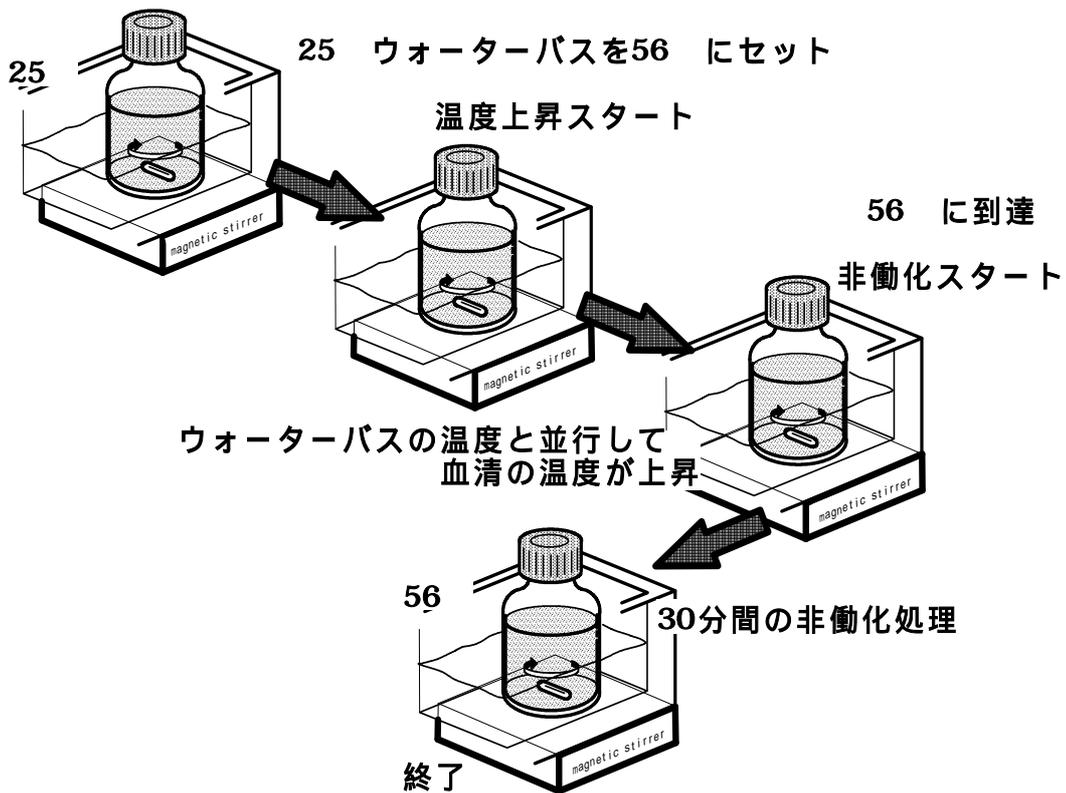


図 78 . CS の非働化 a) 法

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 CS 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。

空の CS 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)、
ダミーを発泡スチロール容器等で 25 に保温しておく。

ウォーターバスの温度を 56 にする。

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。

ダミーの温度計が 56 になった時間を記録する。

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。

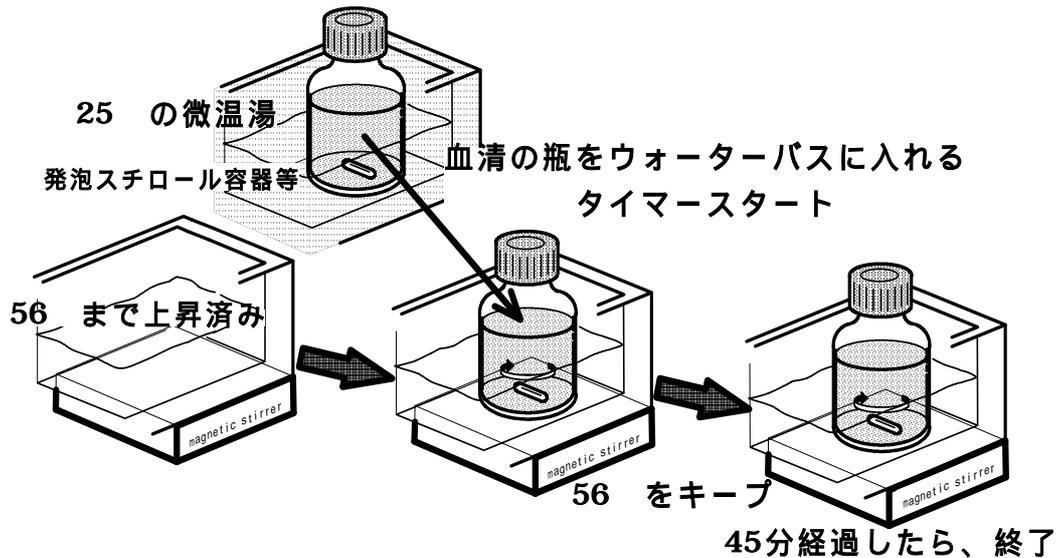


図 79 . CS の非働化 b) 法

温度上昇時間を求めたら、同条件(室温等も)で CS を非働化する。

CS 融解後... (図 79)

CS 容器を発泡スチロール容器等で 25 に保温しておく。

ウォーターバスの温度を 56 にする。

CS 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。

温度上昇時間 + 非働化時間が経過したら非働化を終了し、CS 容器を取り出して室温程度まで CS の温度を下げ、ボトルフィルタユニット等 (0.22 μm) で濾過滅菌を行う。

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。

2. 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 - 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 加尙明治 10万 単位

 ストレプトマイシン (SM)

硫酸ストレプトマイシン明治 1g 力価入 0.1 g

 m-PBS 1 ml

SM 0.1g を秤量し、PC 10万単位が入っている小瓶に入れる。

使用するまでパラフィルムで被い、冷蔵保存しておく。

使用時に m-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 - ストレプトマイシンの調製

家畜改良センターにおける培養液および試薬一覧

	品名	製造元	カタログ No.	容量
培養液	TCM-199	GIBCO	12340-030	500ml
	D-PBS	GIBCO	14287-080	500ml
	CS	GIBCO	16170-0787	500ml
	FCS	Hyclone	SH30088.03	500ml
試薬	BME essential amino acids	SIGMA	B-6766	100ml
	MEM non-essential amino acids	GIBCO	11140-050	100ml
	L-glutamic acid, lyophilized	GIBCO	12419-016	10ml
	D-PBS(-) (錠剤)	TAKARA BIO INC	T900	200錠入
	BSA(fatty acid free)	SIGMA	A7030	10g
	BSA(fraction)	SIGMA	A9647	50g
	Hypotaurin	SIGMA	H1384-1G	1g
	heparin(novo heparin 1000U/ml)	(株)レオ・ファーマシューティカ ル・ポダック		5ml
	2-mercaptoethanol	SIGMA	M7522	100ml
	linoleic acid-albumin	SIGMA	L8384	500mg
	lactic acid(hemicalcium salt)	SIGMA	L2000	50g
	phenol red solution(0.5%)	SIGMA	P0290	100ml
	Sucrose, Ultra Pure	RESERCH ORGANICS(フナコ ン株式会社(代))	0928S	500g
	ピルビン酸ナトリウム	和光純薬	199-03062	25g
	エチレングリコール	和光純薬	058-00986	500g
	塩化ナトリウム (NaCl)	和光純薬	191-01665	500g
	塩化カリウム (KCl)	和光純薬	163-03545	500g
	塩化カルシウム・二水塩 (CaCl ₂ ・2H ₂ O)	和光純薬	031-00435	500g
	リン酸二水素ナトリウム・二水塩 (NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O)	和光純薬	192-02815	500g
	塩化マグネシウム・六水塩 (MgCl ₂ ・6H ₂ O)	和光純薬	135-00162	500g
	重炭酸ナトリウム (NaHCO ₃)	和光純薬	191-01305	500g
	流動パラフィン	ナカ行ス	261-14	500ml

品名	製造元	カタログ No.	容量
Percoll™	アマムバ イオインス	17-0891-01	1L
DL-LACTIC ACID Sodium Salt	SIGMA	L7900	100ml
HEPES > 99.5%	SIGMA	H4034-25G	25g
水酸化ナトリウム溶液 (1mol/L)	シグマアルドリッチジャパン	28-3010-5	500ml
水酸化ナトリウム溶液 (0.1mol/L)	シグマアルドリッチジャパン	28-3040-5	500ml
注射用ペニシリン G カリウム 20 万 単位	明治製菓株式会社		10 パイアル
硫酸ストレプトマイシン明治 1g (力価)	明治製菓株式会社		10 パイアル

家畜改良センターにおける器具機材一覧

	器 具	規 格	製造元	カタログ No.
シャーレ	培養用シャーレ	35mm	Falcon	3001 1008
	洗浄・媒精用シャーレ	35mm	Nunc	153066
	卵子検索用シャーレ	90 × 15mm		指定なし
	4 well multidish		Nunc	176740
シリンジ	卵子吸引採取用シリンジ	5ml		
	培養液調整用シリンジ	10ml	Aldrich	Z11687-4
		20ml	Aldrich	Z11688-2
		50ml	Aldrich	Z11840-0
フィルター	ろ過滅菌用フィルター	0.22 μm	Sartorius	Minisart, 16534
	フィルターユニット	0.2 μm	カゲン	153-0020(培養液用)
		0.2 μm	カゲン	162-0020(血清用)
パスツールピペット		150mm	ヒルゲンベルグ	3150101
遠心管		15ml		
		50ml		
	培養フラスコ 培養液保存用	25cm ²		
250cm ²				
メスピペット		2ml		
		5ml		
		10ml		
		25ml		

OPU 採卵針 COVA Needle

ミサワ医科工業

* 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その成績に影響するので記載のブランドを使用する。

参考文献

- 1) Callesen H, Greve T and Christensen F. *Theriogenology* 27:217 (1987).
- 2) Pieterse MC, Kappen KA, Kruij 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会講演要旨集 p30 (1997).

あとがき

OPU-IVF による胚生産はそのスケジュールを十分考慮することにより、連続過剰排卵処理によるものよりも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。しかし、その OPU 技術でも手技についてのマニュアルは今までほとんど公表されてきていませんでした。

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。これらは全て基礎の段階の技術ですが、本マニュアル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、今後、ますます技術開発が進むであろうこの技術の発展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 家畜改良センター技術部技術第一課 小林修司

日本の畜産 改良と技術で育てます



執筆者 小林 修司 (技術部技術第一課)

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4版/平成26年10月
