

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。

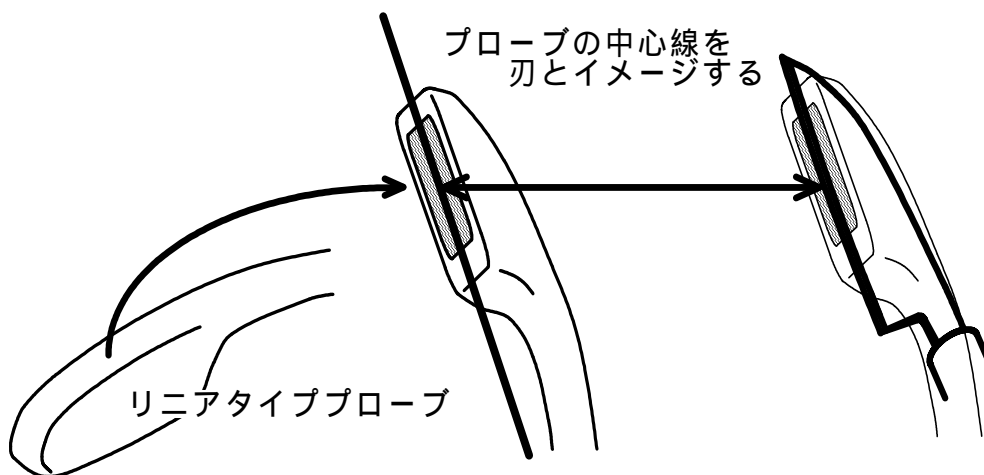
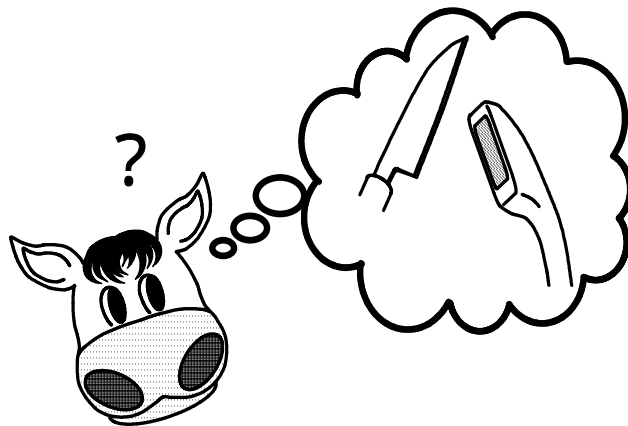


図 29 . リニアタイププローブのイメージ



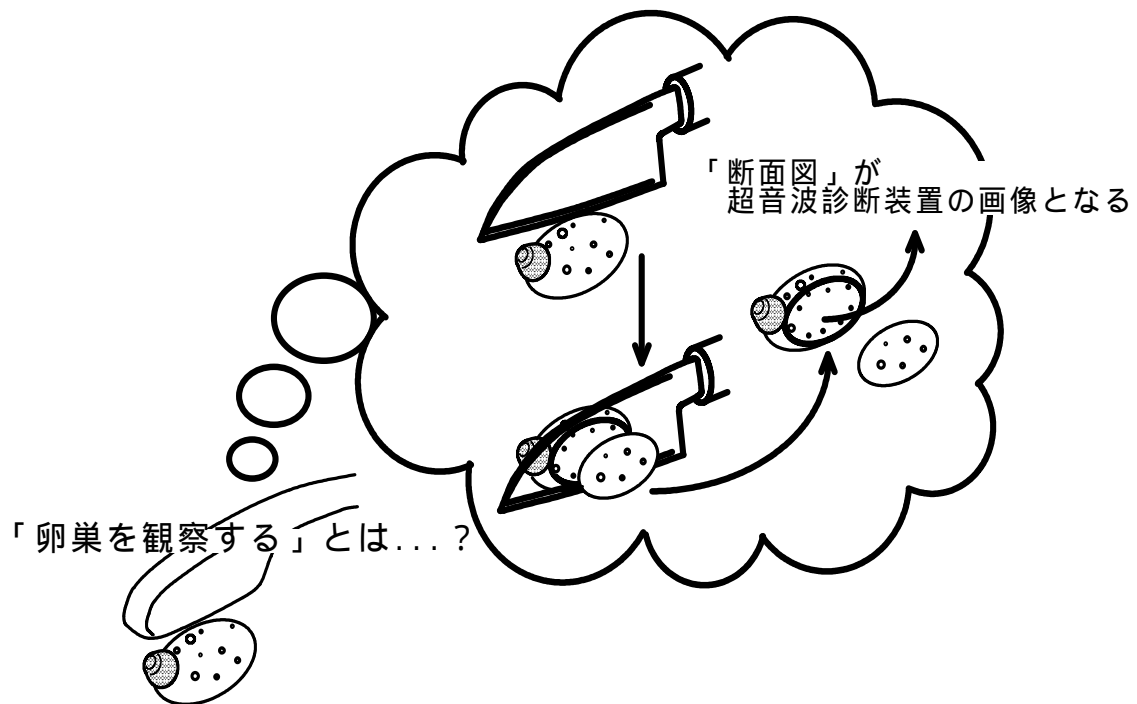


図 30 . 卵巢切断のイメージ

卵巢を切断する場合は、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、卵巢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。

卵巢は、表層にある卵巢皮質と中心（核）にある卵巢髓質に分けられ、卵胞は皮質に存在する。したがって、卵巢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。

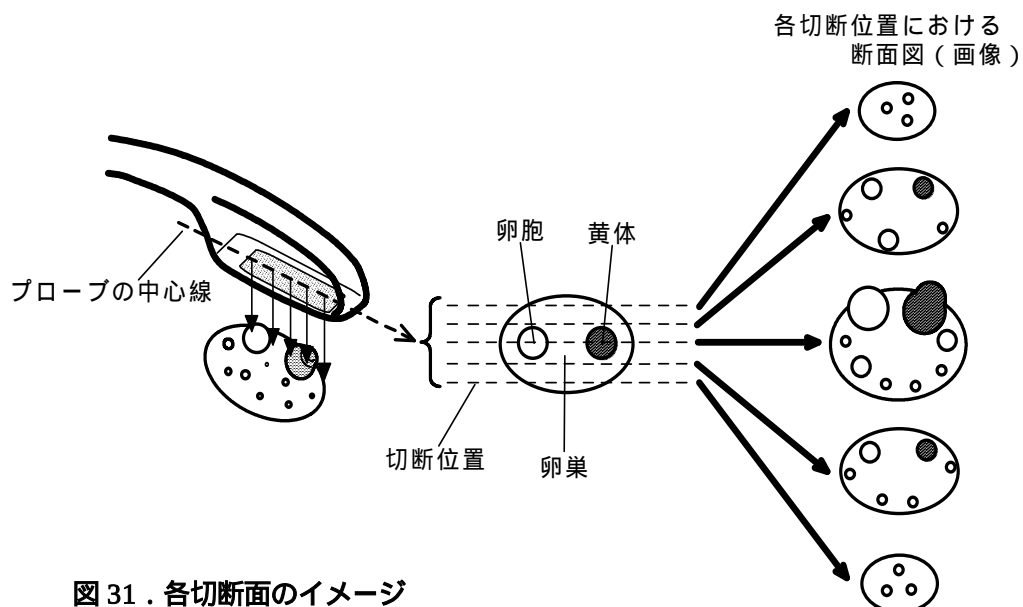


図 31 . 各切断面のイメージ

図 31 の切断方法の卵巢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。

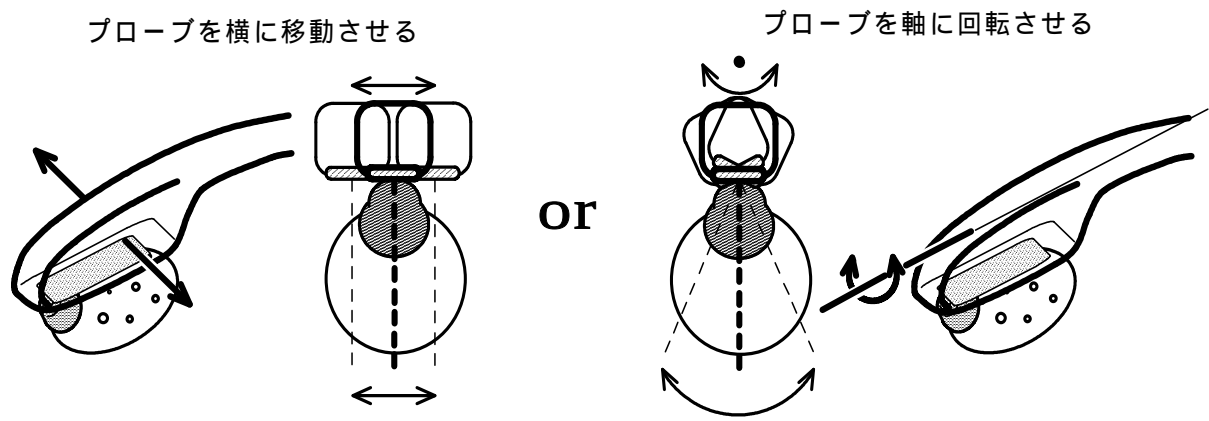


図 32 . プローブによる切断方法

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 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。

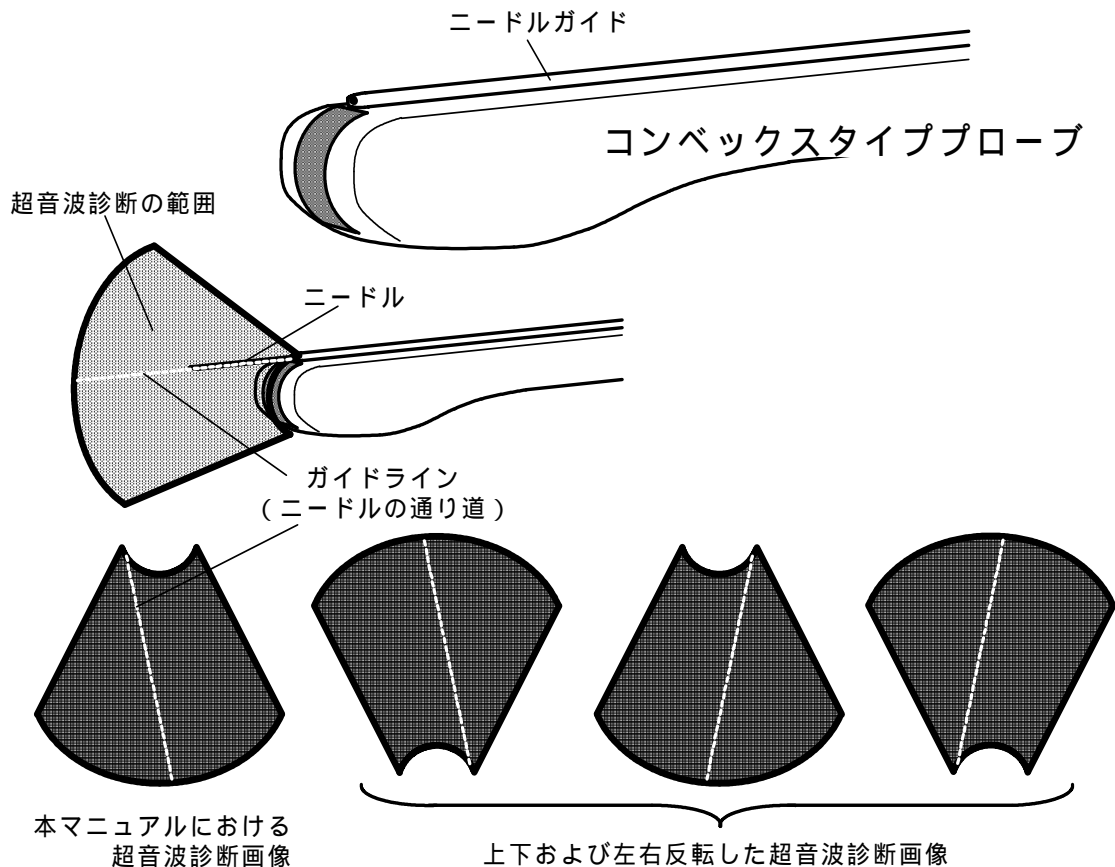


図 33．コンベックスタイププローブとその超音波診断画像

・ 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。

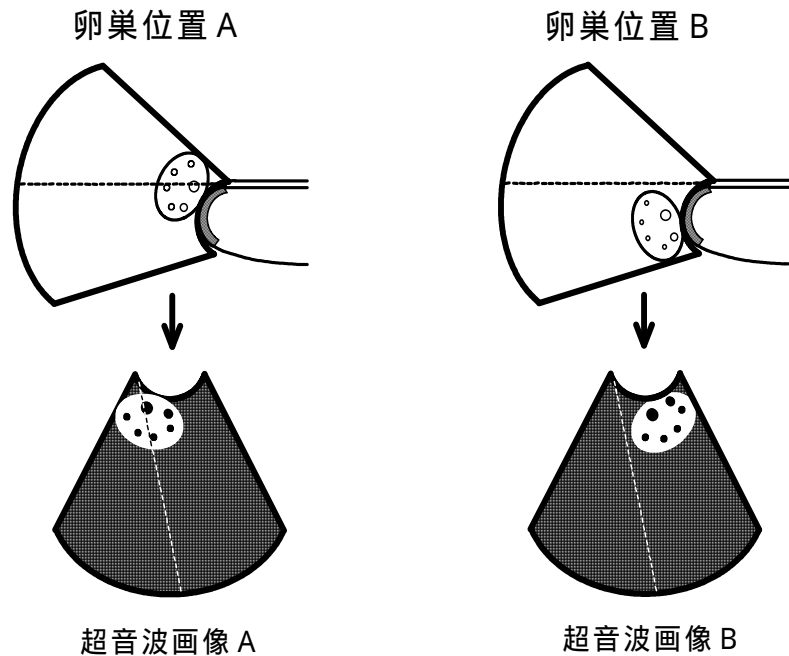


図 34．卵巣位置とその超音波画像

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。

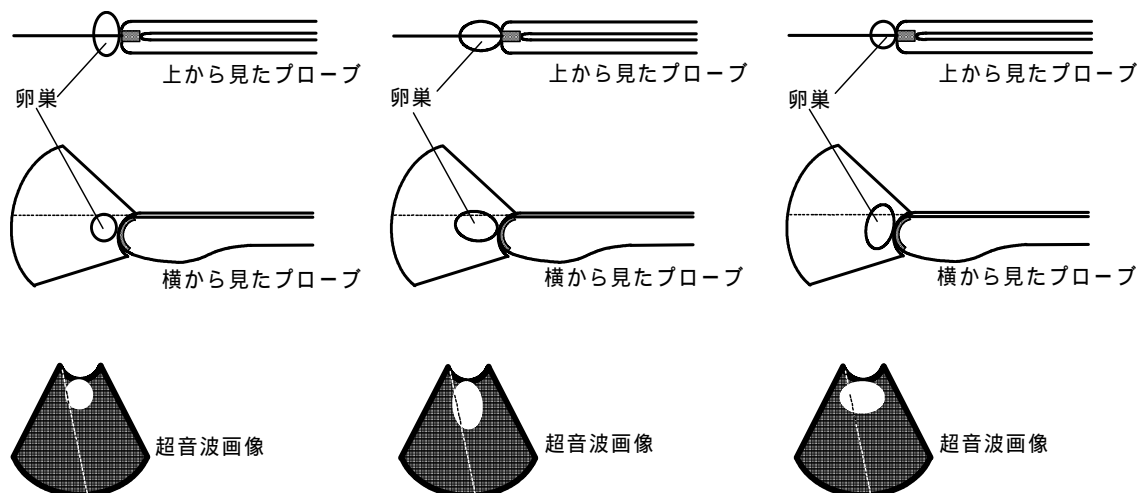


図 35．卵巣の向きとその超音波画像

・ 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。

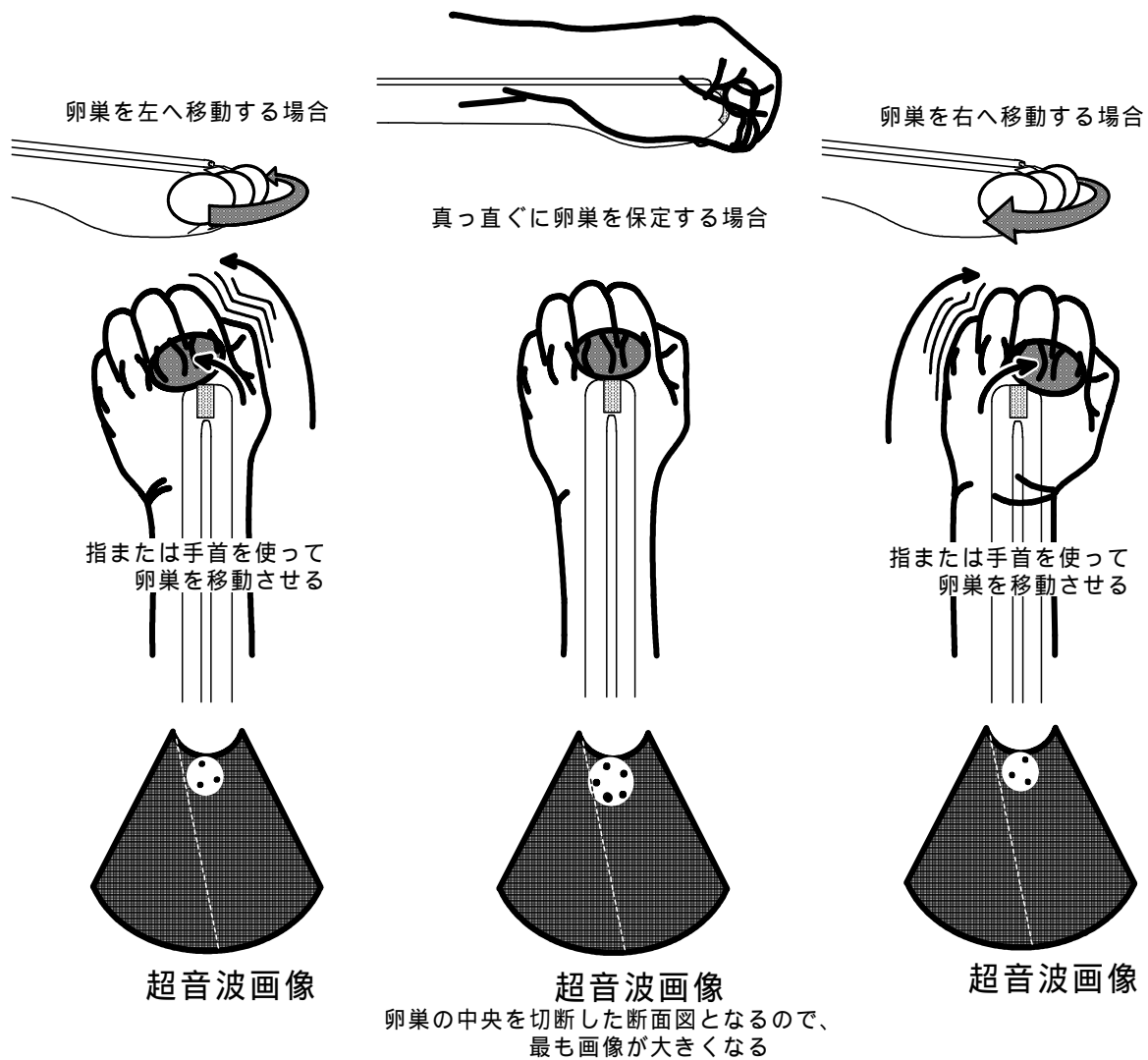


図 36 . 保定方法A

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。

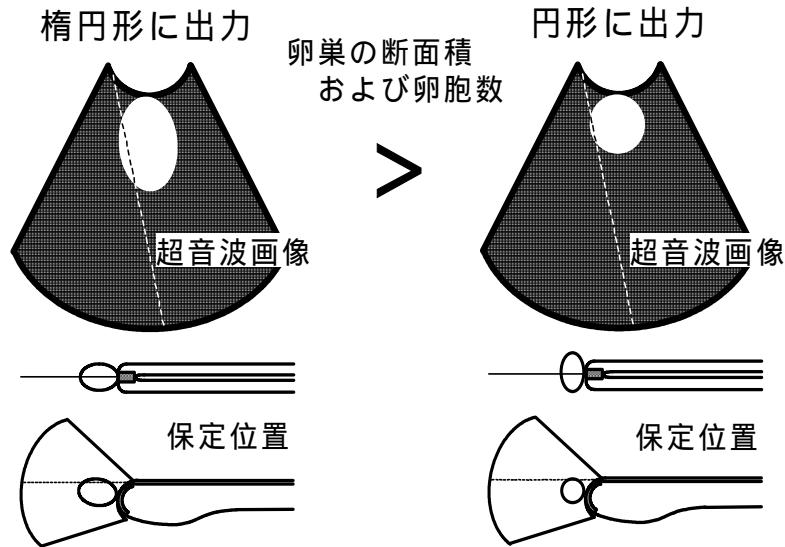


図 37 . 画像から保定方法への検討

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...

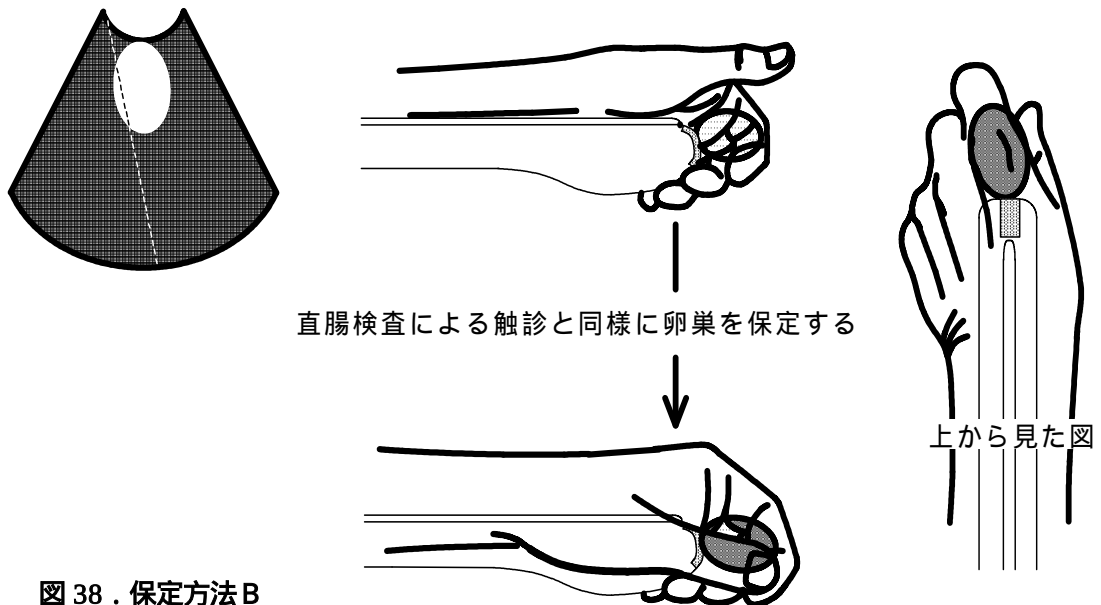


図 38 . 保定方法B

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。

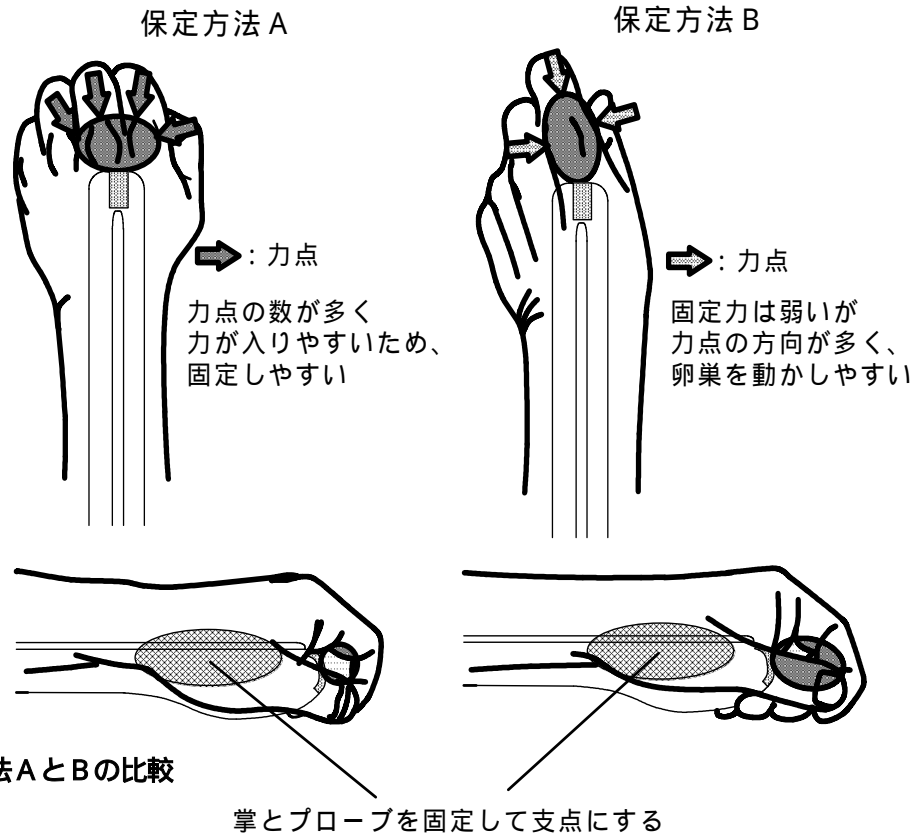


図 39．保定方法AとBの比較

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

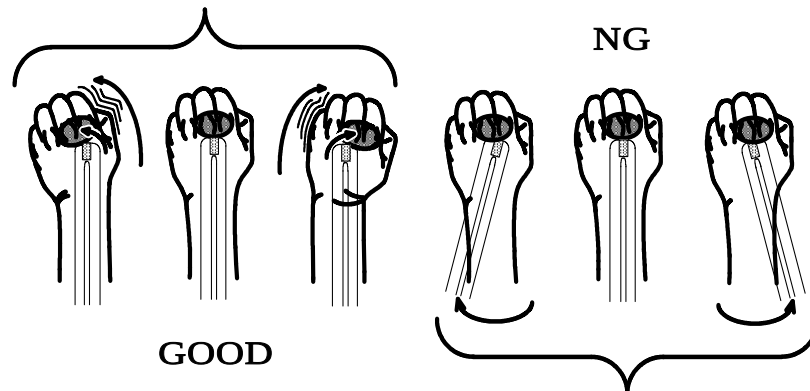


図 40．経膈プローブにおける切断の基本

< 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。

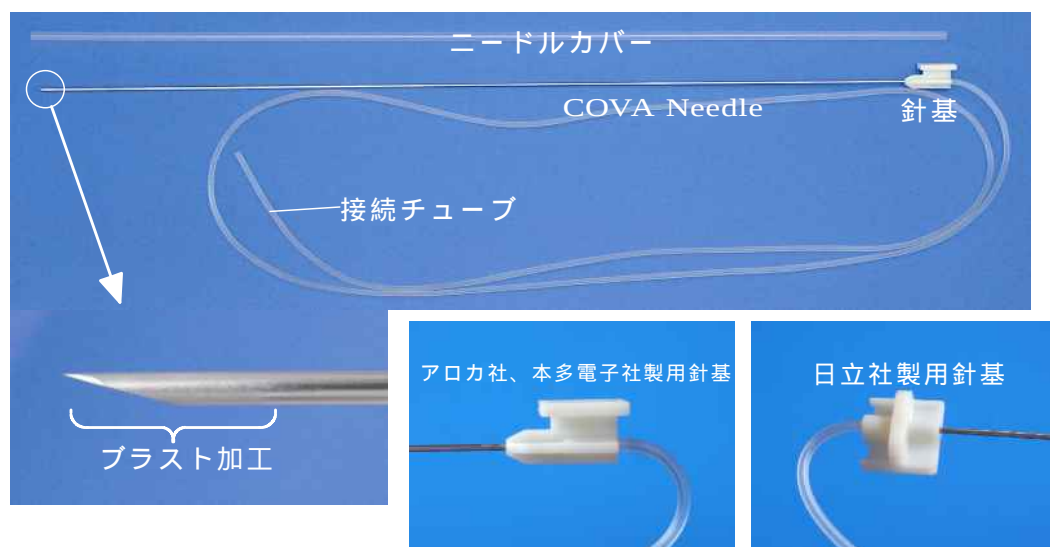


写真 8. COVA Needle の概要

（写真提供 ミサワ医科工業）

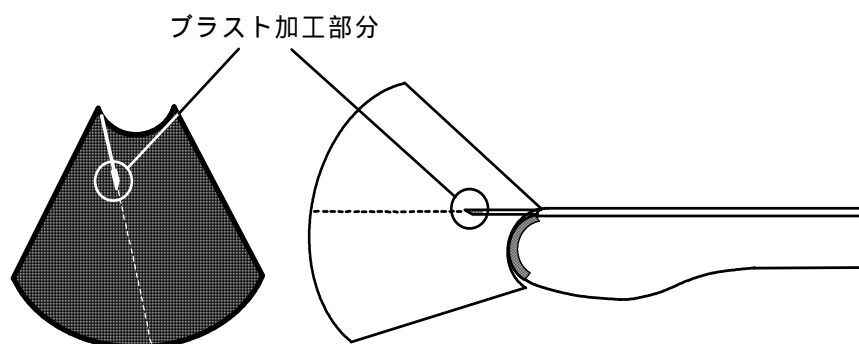


図 41. プラスト加工部分の超音波画像イメージ

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。

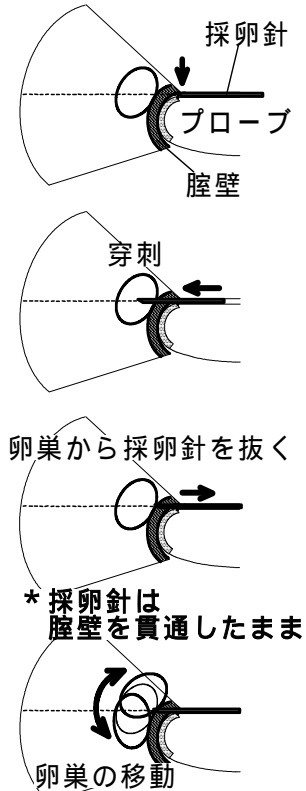


図 42．腔壁への穿刺

卵胞をガイドラインに
合わせるには...

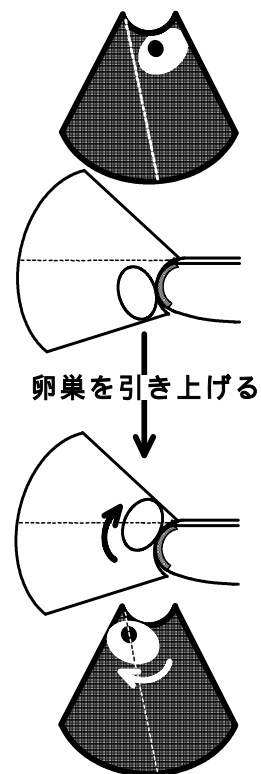


図 43．画像を見ながらの卵巣の移動

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

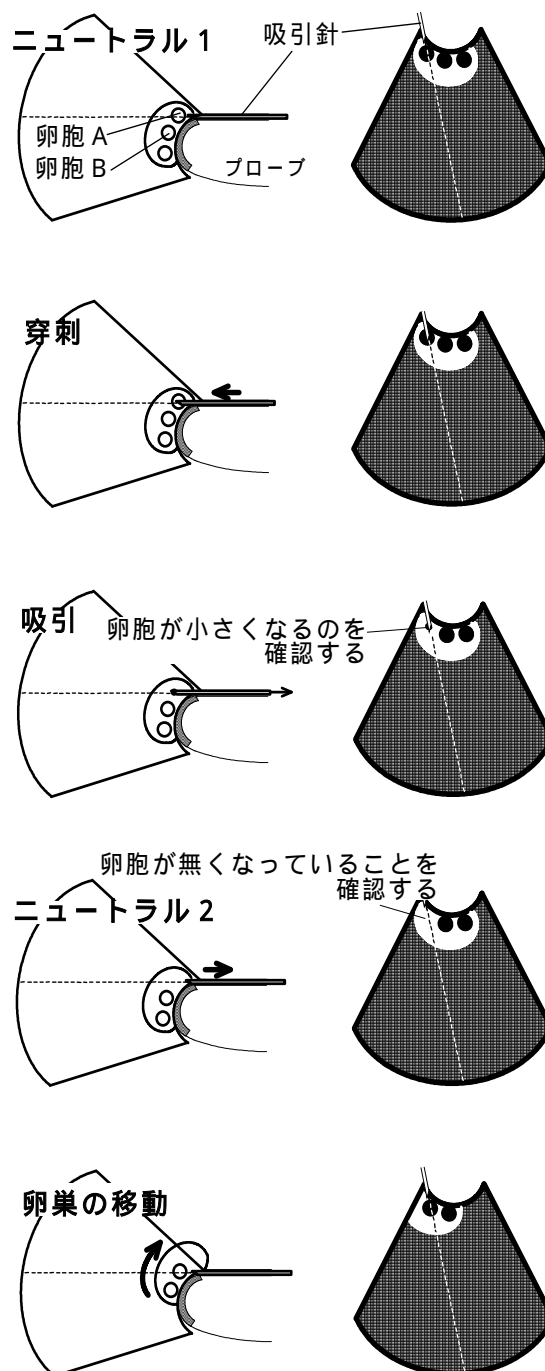


図 44．連続した卵子吸引

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。

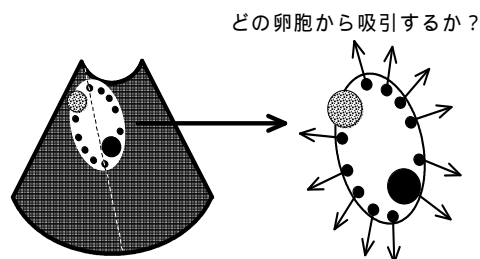


図 45．複数の卵胞吸引

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。

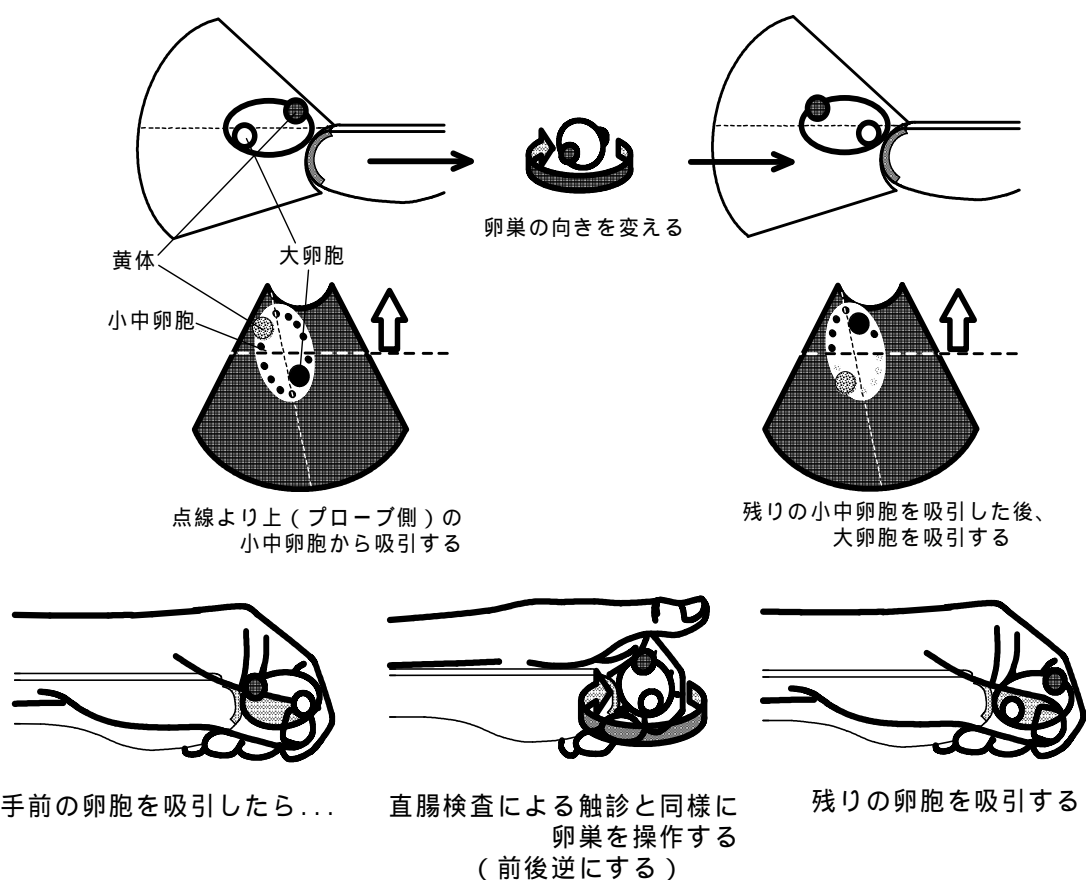


図 46．卵巣の向きを変えながらの卵子吸引

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巢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。

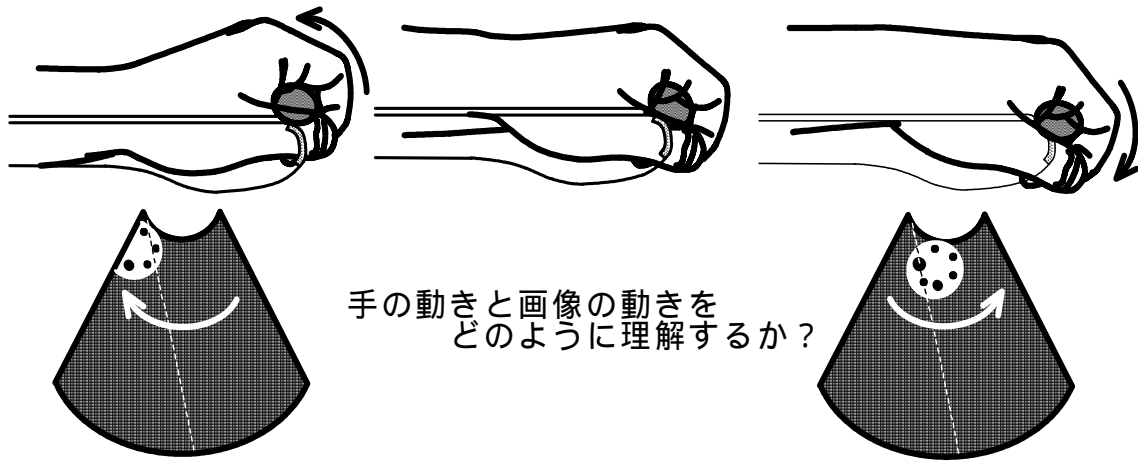
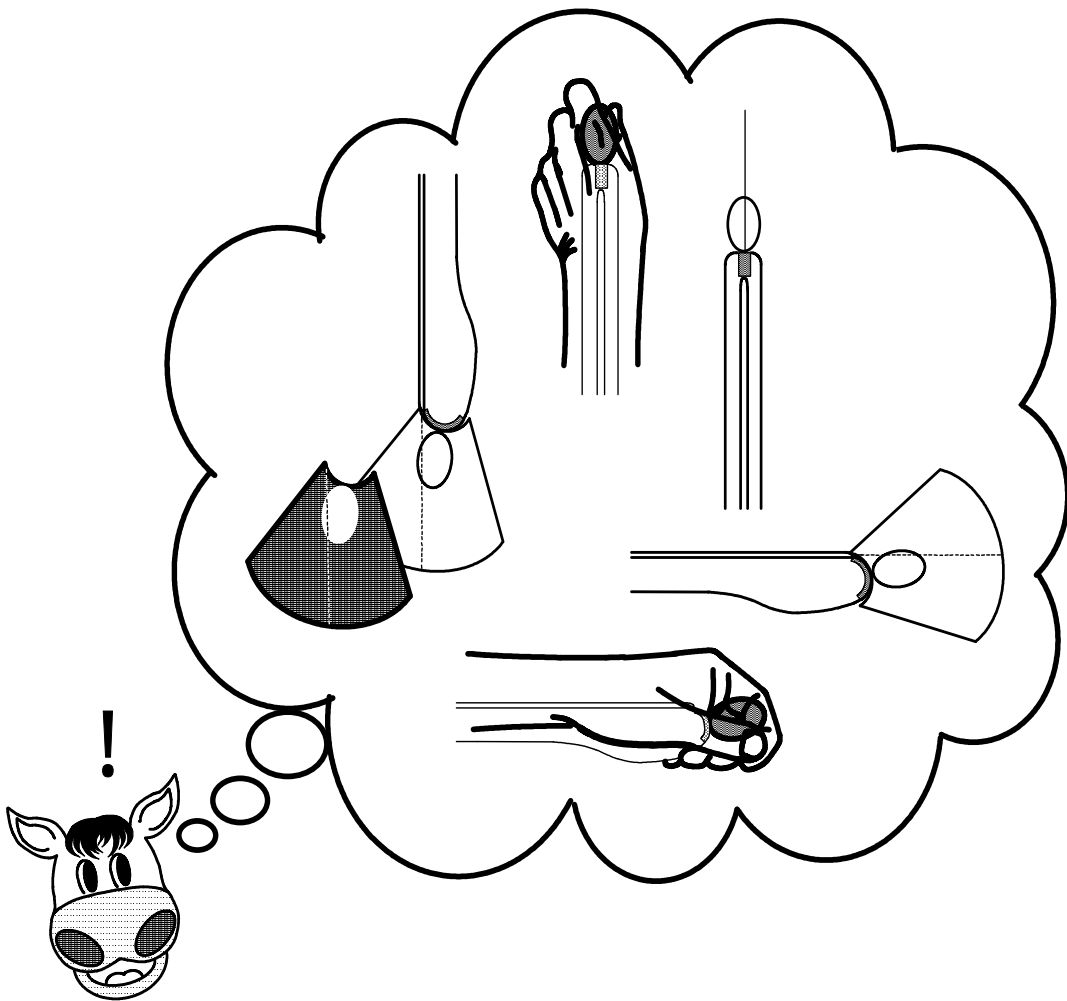


図 47 . 手の動きと画像の動き



< 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（セラクタール等）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. 経膈プローブ



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、卵巢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。卵巢の端(卵巢像が消えた状態)からもう一方の端まで卵巢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。

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。

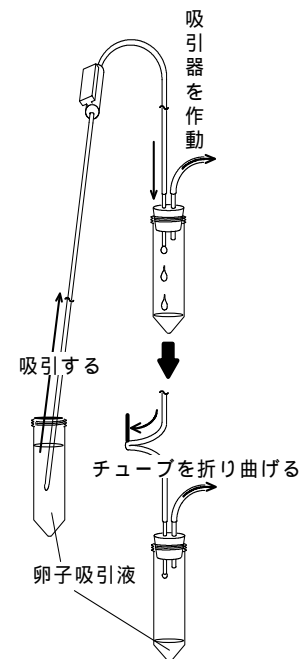


図 48 . 吸引液の吸引と停止

8) 卵巢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)。

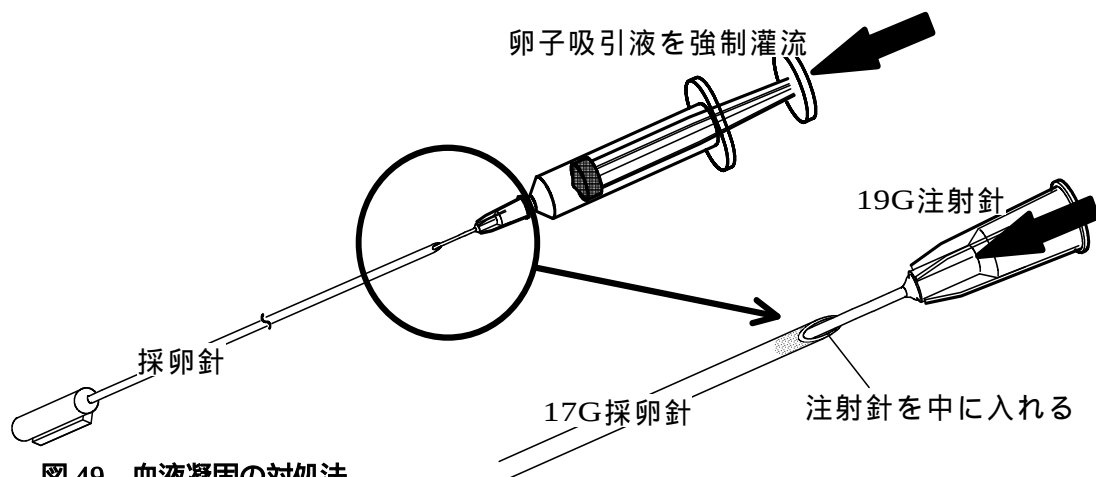


図 49 . 血液凝固の対処法

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）。

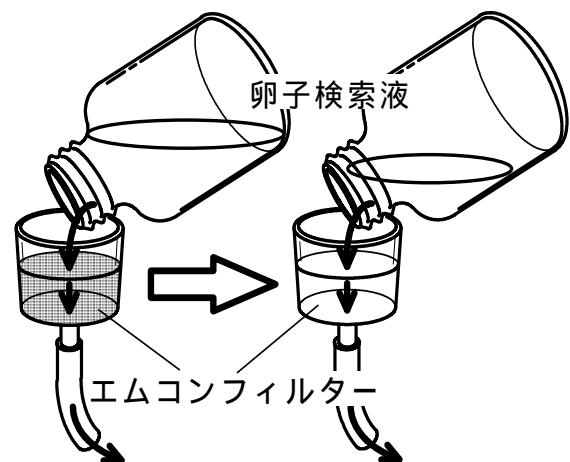


図 50．採取液の濾過



図 51．フィルター内での血餅のピペッティング

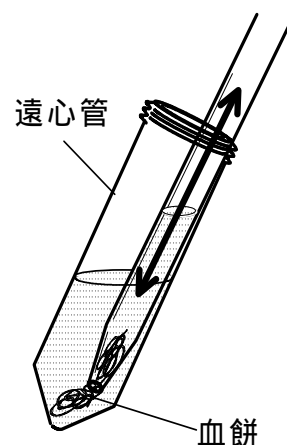


図 52．遠心管内での血餅のピペッティング

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。

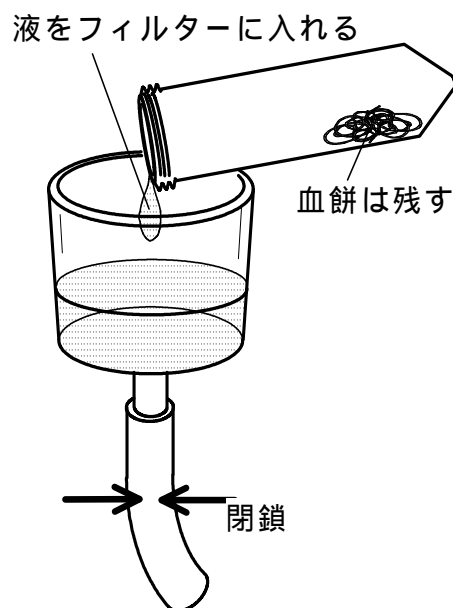


図 53 . フィルターへの液の回収

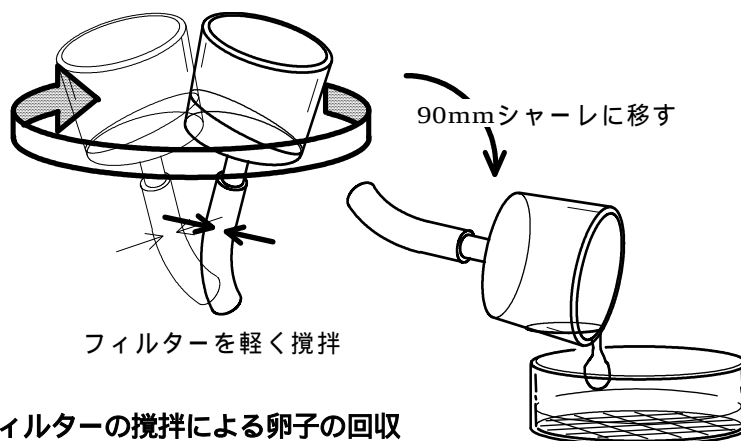


図 54 . フィルターの攪拌による卵子の回収

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。

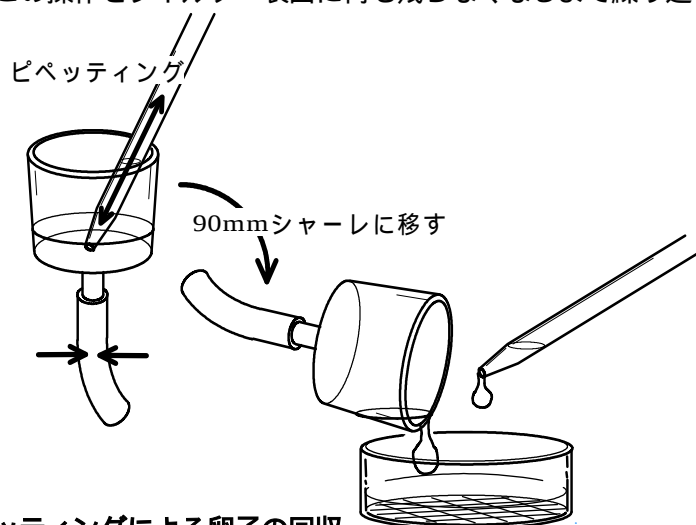


図 55 . フィルター内のピペッティングによる卵子の回収

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。

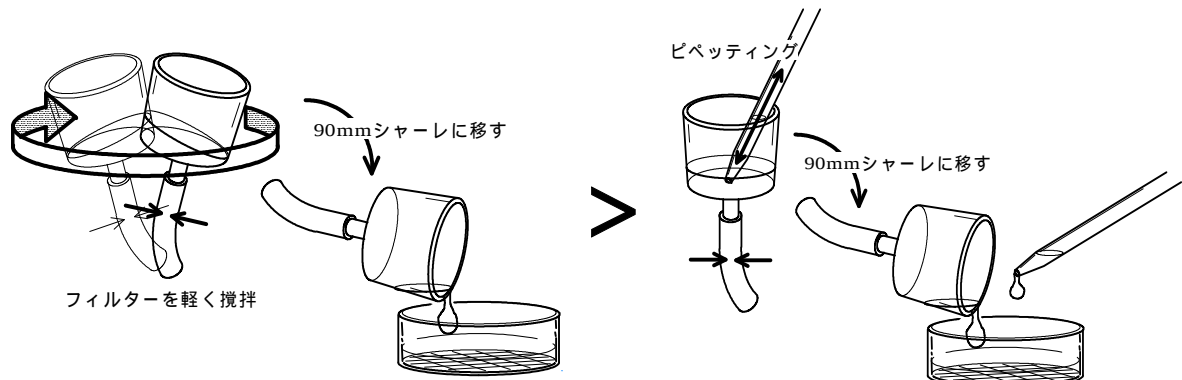


図 56 . 攪拌とピペッティングの比較

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、血餅を撈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、ピペッティングを行う。
- 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。

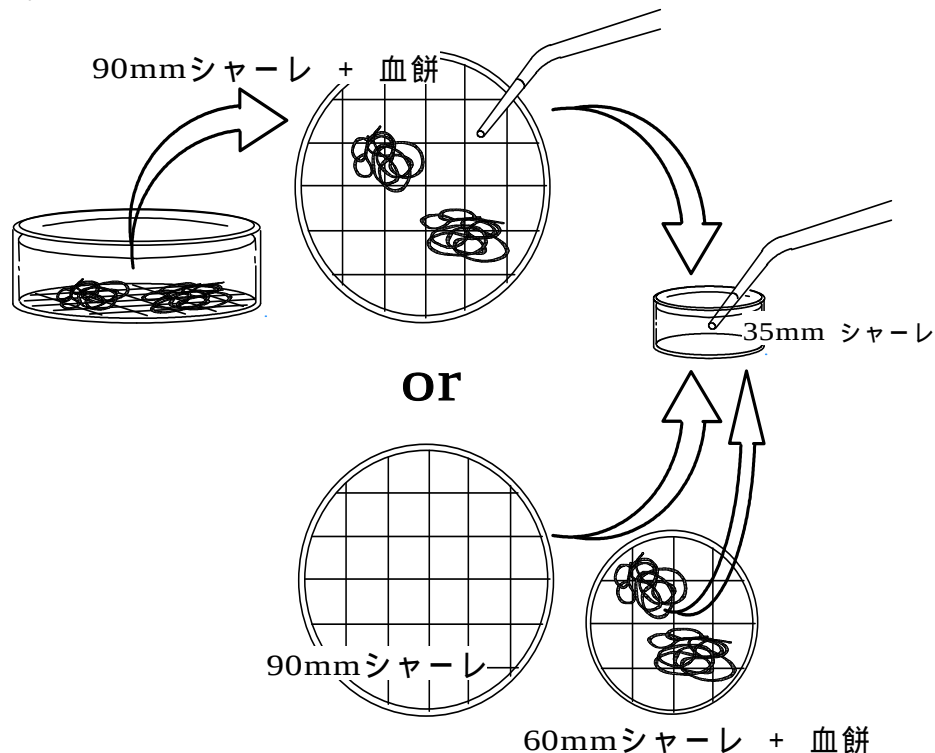


図 57．血餅が存在する場合の卵子検索