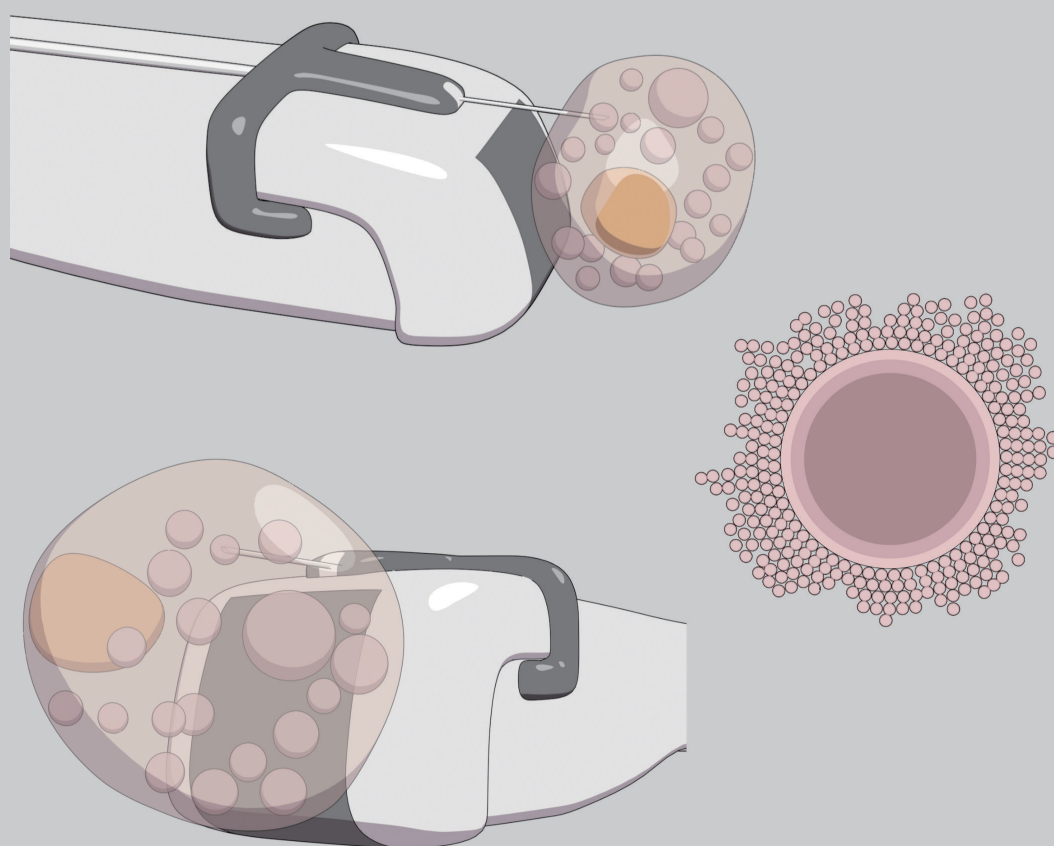


# 牛のOPU実践マニュアル



2023年3月

公益社団法人 畜産技術協会

## はじめに

昨今の不安定な世界情勢における飼料価格の高騰など、畜産・酪農を取り巻く状況が厳しさを増す中で、持続的な畜産農家の生産力強化や収益性向上を図るためには、和牛増頭に向けた胚移植用の牛胚供給不足への対応や、生産性の高い優良な後継牛の効率的な確保、胚の販売による農家の収益増など、最新の高度な技術を活用することが重要であり、その技術を有する畜産技術者を養成することが課題となっています。

とりわけ、牛の繁殖性向上に寄与する新技術の中でも、OPU-IVP（Ovum Pick-Up：経膈採卵－In Vitro embryo Production：体外胚生産）は、能力の高い母牛由来の胚を短期間に大量生産することが可能であり、従来の、生体内の胚を得る多排卵処理－体内胚回収法（MOET）とは異なり、必ずしもホルモン処置で卵巣を刺激する必要がなく、短い間隔で反復実施できるため、効率的な胚生産が可能な技術として確立しています。OPU-IVPは、最近生産現場からの関心も高まっていますが、卵子の吸引や体外胚生産には高い技術力が必要となります。これまでも多くの研修会等を通じ高い技術を持つ講師から技術を学ぶ機会はありましたが、日数に制限があり、OPUを効率的に実践するために必要な情報が掲載されたマニュアルの作成が望まれていました。

このような状況に対応するために、当協会では、公益財団法人全国競馬・畜産振興会の助成を受けて、これまでOPU-IVPの技術開発や普及に携わってこられた経験豊富な諸先生方のご協力により、OPUの実践的な技術マニュアルを作成しました。本マニュアルでは最新知見を盛り込むとともに、理解しやすい動画を視聴できる工夫を施し、即戦力を目指す技術者の技術習得の有効な補助的手段となるものと思います。

終わりに、本マニュアル作成にあたり、多大なご尽力をいただきました各委員会委員及び執筆者の皆さまに対しここに深謝いたします。

本マニュアルが牛の繁殖に携わる技術者に広く利用され、OPU-IVP技術の普及及びわが国の和牛増頭の一助になれば幸いです。

公益社団法人 畜産技術協会  
会長 石原 哲雄



## 執筆者一覧

(敬称略・五十音順)

執筆者	執筆箇所	所属
今井 敬	Ⅲ, Ⅴ, Ⅵ	酪農学園大学農食環境学群循環農学類
大澤 健司	Ⅳ	宮崎大学農学部獣医学科
國行 将敏	Ⅺ	一般社団法人日本ホルスタイン登録協会
佐藤 太郎	Ⅱ	株式会社 TARO ファームケアクリニック
濱野 晴三	Ⅶ, Ⅷ, Ⅸ, コラム 2・3・4	一般社団法人日本家畜人工授精師協会
平田 統一	Ⅰ	岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター
松宮 崇行	Ⅹ	公益社団法人全国和牛登録協会
渡邊 貴之	コラム 1	静岡県立農林環境専門職大学短期大学部

表紙デザイン： Kenpoo



## 目 次

I. OPU の意義 ー利点と課題ー	1
1. はじめに	1
2. OPU-IVP 技術の普及	1
3. OPU-IVP 技術の魅力	1
4. OPU-IVP 技術の課題	3
5. 本マニュアルの目的	5
II. OPU 実施のための準備	6
1. 超音波画像検査装置 (US)	6
2. プローブの特性	6
3. 吸引器および恒温槽関連	9
4. OPU を実施する環境	10
5. 検卵の環境	12
III. 供卵牛の準備	14
1. 月 齢	14
2. 産 歴	16
3. 品種の特徴	18
コラム 1 「OPU と飼養管理」	21
IV. 前処置 (一般的な多排卵処置とその必要性)	22
1. OPU 前の多排卵処置実施の必要性	22
2. 採取卵子数を増やし、発生能を高めるための処置	23
3. まとめ	25
V. 卵子の吸引	29
1. 卵子吸引前の準備	29
2. OPU による卵子の吸引	32
VI. 卵子の検索・選別方法	36
1. 採取液のフィルターろ過	36
2. OPU で採取した卵子の検索	39
3. 採取した卵子の鑑別	40

コラム 2 「ピペット」、「ガラスを切る」、「ガラス器具について」	42
コラム 3 「卵丘細胞の除去」、「極体って何？」	43
VII. 体外受精技術（採取卵子の輸送）	44
1. 卵子の成熟培養時間を知る	44
2. 器材に求める条件	44
3. 航空機への搭載について	44
4. 卵子の輸送機器	44
コラム 4 「体外受精に必要な環境」、「手は汚い?」、「抗生物質」	47
VIII. 凍結保存技術・移植技術	48
1. 凍結保存技術について	48
2. 移植技術について	49
IX. 法令事項への対応（家畜改良増殖法における受精卵に係る規定について）	50
1. 診断書交付	50
2. 実施者の限定	51
3. 実施場所の限定	52
4. ストロー表示の義務化	53
5. 受精卵証明書の発行等	55
6. 運営状況の報告等	55
X. 和牛の登記・登録を行うために遵守すべき事項について （家畜人工授精および受精卵生産・移植に係る留意事項）	57
XI. ホルスタイン種の血統登録を行うために遵守すべき事項について	61
OPU 関連動画一覧	64

## I. OPU の意義 — 利点と課題 —

### 1. はじめに

畜産はわが国の地域社会を支える重要な産業であり、そこで生産された畜産物は国民の健康と長寿を支えてきました。畜産物の生産額や畜産関連製品の輸出額は年々拡大しています。しかし、本マニュアルを執筆している 2022 年時点では、コロナ禍に伴う貿易流通網の混乱やウクライナ戦禍、円安の急激な進行、原油高騰により飼料や肥料コストが急激に高騰し、畜産事業の継続に深刻な影響を及ぼしています。このような逆境にある畜産業を支え、発展させるためには、行政や各種畜産関連団体、研究開発機関、民間会社による畜産生産現場との連携が欠かせません。また、IoT、ICT 技術等を活用して省力的で情報集約的な畜産技術を開発することが望まれています。

### 2. OPU-IVP 技術の普及

このような環境の中、畜産農家の経営を支える技術として、特に牛の分野において最近 OPU (Ovum Pick-Up、経膈採卵) -IVP (In Vitro embryo Production、体外胚生産) 技術の活用が盛んになってきました。OPU-IVP とは、超音波装置を用いて牛生体の卵巣内の未成熟卵子を卵胞液と共に吸引・回収し、体外受精・培養技術を用いて移植可能な牛胚を効率的に作出する方法であり、オランダ・ユトレヒト大学の Pieterse らによって 1980 年代後半から開発され<sup>1)</sup>、わが国においても 1990 年代後半から活用されてきた技術です。OPU 技術の魅力は、①牛胚の短期大量生産が可能、②適用対象が広範囲、③必ずしも発情周期に縛られず、卵巣刺激を行わなくても実施可能、④種雄牛造成や母牛集団更新に活用できる、⑤交配の自由度が高い、⑥定時授精など他の繁殖技術と組み合わせると本牛の妊娠を確保しつ

つ胚生産を実施できる、⑦多排卵処理-体内受精胚回収-胚移植 (MOET) 法よりも手軽に実施できる、などが挙げられます。世界的には、2020 年に生産された移植可能な牛胚約 150 万個の内 75%以上の約 110 万個が OPU-IVP 由来とされています<sup>2)</sup>。

### 3. OPU-IVP 技術の魅力

OPU 技術の最大の魅力は、なんといっても望まれる母牛由来の胚を短期間に大量に作出できることです。これまで主流であった薬剤で卵胞発育を刺激し生体内受精胚を得る多排卵誘起法では概ね 3 カ月間に 1 回処置でできるのに対し、OPU-IVP 法では場合によっては週 1 回、3 カ月間で 13 回実施することができ、10 倍以上の移植可能胚を得ることも可能です。このように大量胚生産が可能なのは、卵巣を刺激することなく短期間に集中して OPU を反復実施できるからです。一方、OPU 前に各種薬剤を用いて卵胞発育を刺激することは、卵子回収数を増やし、品質を向上させることで体外発生率や受胎率を改善する傾向があります。特に、生産現場における診療等の場面では週 1 回 OPU を実施することは困難な場合が多く、少ない OPU 回数で優良血統牛から確実に卵子採取したいときには、卵胞発育刺激が必要となる場合があります。その際は OPU 処置間に相応の期間を設けます。

OPU の適用対象牛は、空胎牛のみならず、妊娠初期、未経産牛、高齢牛、1 産取り肥育雌牛、一部の繁殖障害牛など MOET 法に比べて広範であることも魅力です。直腸壁越しに卵巣を保持できるかぎり妊娠初期の牛でも OPU を実施できるので、遺伝資源の有効活用につながります。OPU することで受胎率を悪化させることは通常はありません。登録を取得した 1 産取り肥育雌牛から OPU-IVP で産子を得ることは、優良遺伝子の活用のみならず、胚販売収益を加味する



ことで当該牛の損益分岐点を下げる効果が期待できます。高齢牛の遺伝資源を後世に残すことは年々改良が進む中であまり推奨されませんが、農家によっては思い入れが強い牛もあるので、その後継牛を得たいという要望はよくあることであり、OPU-IVP 技術を活用して複数の後継牛を作出できる場合があります。卵巣機能に問題ないが、卵管閉塞や頑固な子宮内膜炎で受胎が得られない等の原因が明瞭な繁殖障害牛では OPU-IVP を適用して産子を得ることができます。しかし、原因不明の繁殖障害牛から産子を得る試みは、ゲノムレベルの繁殖障害要因を後世に伝えてしまう恐れがあるため推奨されません。未経産牛、高齢牛、1産取り肥育雌牛、一部の繁殖障害牛などを OPU ドナーとした場合、一般的に回収卵子数や発生率が劣る傾向があり、ドナー選抜にあたって留意する必要があります。

先に述べたように、OPU 前に卵巣刺激処置を行うことは OPU-IVP の成績改善につながりますが必須ではありません(ただし、海外では正常な発育能を有する牛胚を生産するために卵巣刺激が推奨されています)。また、反復して OPU を実施する場合、卵胞発育周期を同期する効果もあることから特段発情周期に配慮しなくとも採卵、IVP 成績の極端な悪化はありません。このことは、柔軟なスケジュールによる OPU 実施を可能とします。

短期間に特定の血統の牛胚を大量生産できることは種雄牛造成や母牛群の更新において強力なツールを提供します。種雄牛にあっては、OPU-IVP 法を活用し目標とする両親の雄産子を短期間に多頭数生産し、直接検定で数頭に絞り込むことで1段階目の選抜圧を高めることができます。

また、最近わが国でも研究が進んでいるゲノム育種技術と相まって、胚の段階でゲノム育種価を評価し、高能力が期待できる

胚のみ移植、挙子することで選抜圧を著しく高め、育種速度を早めることができます。母牛群の更新にあっても同様に、目的とする雌雄の組み合わせで胚を大量生産し複数の産子を得る、あるいは特定の種雄牛や母牛に対して複数の交配相手を設定し多様な組み合わせの産子を得る、など比較的自由に設計することができます。

体外受精に用いる凍結精液は貴重なものが多いので効率的に活用したいと誰しも考えます。OPU の場合回収した卵子の数に合わせて、例えば多くの卵子を回収できたらより貴重な精液を、少ない回収数の場合は次の候補精液を使用するというように卵子採取後に使用する精液を調整できる点も MOET にない特徴です。乳牛で思いの外たくさん回収卵子数があった場合、複数の種雄牛精液で媒精することも可能です。もちろん挙子後に親子関係に矛盾がないか検査する必要があります。性選別精液について、乳牛では MOET で複数本の凍結精液を用いるよりも OPU-IVP 法で1本使用した方が効率的に牛胚を得られる場合があります。ただし、国内産の性選別精液は特許の関係から IVP に使用することはできません。輸入精液についても使用可能か事前確認が必要です。

OPU は他の繁殖技術と組み合わせて実施する場合があります。例えば、多排卵誘起処理や定時授精・胚移植処理開始時に卵胞発育を同期する目的で大型卵胞を吸引する際、小卵胞まで吸引し IVP に供することができます。定時授精・胚移植後にさらに OPU-IVP を2度3度繰り返すことで、本牛は受胎させつつ付加的に胚生産を行うこともできます。受胎率に悪影響はなく、むしろ受胎率向上傾向となります。本牛の遺伝的、経済的価値が高い場合は、このような手法を採用するメリットは大きくなります。

MOET 法は、薬剤、凍結精液等の経済的

負担、頻回薬剤投与や胚回収の労力負担等気苦労が多いものです。1回の採卵に対する農家の期待も大きくプレッシャーがかかり、受精した胚が得られなかった場合や、移植可能胚数が少なかった場合の落胆が大きくなります。また、採卵数の成績が安定しない場合もしばしばあります。これに比べて、OPUは比較的手軽に実施できます。牛の保定にかかる時間は実施場所によってまちまちですが、OPUの操作そのものは1頭当たり5～10分程度です。卵子回収成績が悪かった場合、次の機会に向けて気持ちの切り替えが容易である点も有利です。

OPUは生きた牛から卵子を回収するので何回でも再チャレンジできることは、食肉処理場卵巣由来卵子や割去卵巣由来卵子を用いる方法よりも有利です。食肉処理場あるいは割去卵巣由来卵子を用いたIVPでは認定機関に限られた条件下で作出した胚由来産子のみ血統登録を受けることができ、通常登録は得られません。一方、OPU産子は登録が可能であることも大きなメリットです。

例えば牛伝染性リンパ腫の伝播防御にもOPU-IVP技術は活用できます。牛伝染性リンパ腫ウイルスに感染した優良血統の母牛からOPU-IVP技術で複数の非感染後継牛を作出することで、畜主は感染優良血統牛の淘汰を決断しやすくなります。しかし、OPUドナーは感染症や伝染病に罹患していない健康な雌畜であることが求められることから、実施にあたっては十分な調整が必要です。

#### 4. OPU-IVP 技術の課題

このようにたいへん有望な技術であるOPU-IVPがわが国においてどの程度普及しているか推測できるデータが残念ながら存在しません。OPU-IVP-ET技術のさらなる改善と普及が図られるためには現状を把握す

ることが必要不可欠であることから、OPU-IVP-ETの実施状況に関するデータベースが整備されることが待望されます。わが国は体外受精技術の開発では世界に先駆けてきましたが、この間の生産現場への技術活用という点では後れを取ってきました。研究機関と生産現場の連携が結果として希薄であったことは反省しなければなりません。

OPU-IVP-ET技術の活用のためにはまだ解決すべきさまざまな課題があります。その一つは専門技術を有する人材の養成と確保です。OPU-IVP-ET技術は、ドナー牛の選抜と適切な飼養管理、OPU、卵子の体外受精・培養等取り扱い、胚凍結、レシピエントの選抜・管理、胚移植、妊娠牛管理、分娩管理、子牛管理と多段階で複雑な長期にわたる過程を経て健全な産子を得ることで完結する技術です。特に従来畜産管理にはなかったOPUとIVPの技術者は、そのニーズに対してまだ圧倒的に数が少ないと思われます。継続的に研修会や講習会を実施して技術者を養成する必要があり、本マニュアルも技術者養成の一助となることを目的としています。OPU技術については臨床獣医師であれば初期研修を受けた後自己研鑽で経験を積むことである程度の技術レベルに達することが可能です。IVP技術についてはIVP実施機関で十分な期間研修を積む必要があると思われます。また、多段階で専門的な各技術者集団をコーディネートし、事業化する人材も必要であり、通常獣医医院を開業する獣医師や企業経営者がこの任に当たっています。IVP部門を整備することが難しければ外部の機関に委託する方法もありますが、わが国ではまだIVPを委託する先の選択肢が限られていることも課題です。

OPU-IVPを実施するために必要な器具、機材、施設について情報が乏しいとする意見があります。OPUには最低限超音波装置、

経膈プローブ、吸引ポンプ、恒温装置等が必要であり、採卵針、卵子回収液などの消耗品が要ります。IVP には実体顕微鏡や二酸化炭素インキュベーター、マルチガスインキュベーター、遠心分離機、場合によってタイムラプス装置や滅菌装置、純水採取装置、温度や光が管理できる実験室等が必要です。これらは高額であり簡単に購入し試せるものではないので、実際に使用している技術者からの情報収集が重要です。本マニュアルおよび別冊資料では代表的な、あるいは入手しやすい機種等の概要を示しているので参考にしてください。ただ、新たな機種が販売されたり、バージョンアップされたりするので、各自がその都度具体的な機種等の情報収集をしてください。

OPU を実施しても十分な卵子数を回収できないという悩みを持つ技術者は多くいます。吸引卵胞数に対して卵子回収数が少なく技術が未熟と考えられる例（高齢牛では吸引卵胞数に対して回収卵子数が極端に少ないという現象が起こる場合があります）では、研修会等の機会を利用して OPU の技術レベルを上げる必要があります。そうではなく、そもそも卵巣中に卵胞がみられない、あるいは極めて卵胞が少ないドナーについてどのように処置すべきかはまだ検討の途上ですが、本マニュアルの前処置の項も参考にしてほしいと思います。当初 OPU 技術は、薬剤処置による多排卵誘起法と異なり、ホルモン剤に対する感受性の個体差を回避できることから成績が安定すると期待されましたが、採卵成績およびその後の IVP 発生成績に個体毎、系統毎のばらつきがみられ、MOET の弱点を回避するに至っていません。

IVP において体外受精率、胚発生率を確保、安定化させることも本技術の実用化のために必要なことです。この点に関して膨大な研究成果が公表され、その具体的な手

法や培養液組成は IVP を実施している各場所で独自の工夫があり、一概に標準法を解説することは困難です。本マニュアルは OPU に係わる事項を対象としていますので、IVP の詳細は他の解説書等を参考にしてください。

OPU は膈壁を穿刺して採卵針を腹腔内に進入させ、さらに卵巣を複数回穿刺して卵胞液と共に卵子を吸引・回収します。卵巣、特に黄体は血流が多い器官ですから、開腹して OPU 実施後の卵巣を観察すると表面から出血しています。OPU 実施者はこのような状況を想像して穏やかな処置を心掛ける必要があります。卵巣の癒着、膿瘍形成など、OPU によって人為的な繁殖障害を惹起しないよう衛生に留意することも当然です。事故や機材の破損が発生しないよう、特に黒毛和種では鎮静や確実な保定を行う必要があります。

先に述べた通り、OPU-IVP-ET 技術はドナー牛の選抜と適切な飼養管理、OPU、卵子の体外受精・培養等取り扱い、胚凍結、レシピエントの選抜・管理、胚移植、妊娠牛管理、分娩管理、子牛の哺育・育成と多段階で複雑な長期にわたる過程を経て健全な産子を得ることで完結する技術です。どのように IVP 胚を安定的に確保するかはもとより、経営内でどのように移植頭数を確保するか、妊娠率を向上させるかは本技術の最終的な効果をみる上でたいへん重要な指標になります。また、草創期の過大子症候群の発生こそ少なくなりましたが、人工授精に比べて IVP 胚由来の産子は大きくなる傾向がみられます。OPU-IVP-ET 技術の普及には、分娩事故を減らすための分娩誘起法や酪農家におけるやや虚弱な OPU-IVP-ET 黒毛和種産子の哺育・育成法など、一連の技術のレベルアップが欠かせません。

## 5. 本マニュアルの目的

最近民間の開業獣医師や農業共済組合、社団法人、大規模畜産企業、農業協同組合などで OPU-IVP-ET 技術に取り組むところが増えてきました。厳しい経営環境の中、畜産事業の継続のために農家の選択肢が増えることは喜ばしく希望が持てる状況です。ただ、OPU-IVP-ET 技術は生産現場で活用されてまだ日が浅い技術です。今後さらなる普及を図るためには、行政や関係者との間に軋轢を生じないように、現行法規に則って実施することに留意する必要があります。本マニュアルでは基本的な法令事項への対応について記述していますので OPU 実施前に必ず目を通して下さい。このマニュアルの最終的な目的は、農家が望めば、どこでも誰でも OPU-IVP-ET 技術のサービスを選択できるようになることであり、そのための技術者養成の一助となることです。本技術は、産業動物分野において獣医師のみならず OPU 補助者や胚培養技術者、家畜受精卵移植師等の技術者が協力して事業にあたるという開業獣医師のあり方に変革をもたらす意義があり、経営面での獣医師のレベルアップも求められます。家畜受精卵移植師や畜産事業者と共にわが国の畜産業の維持・発展に寄与する技術となるよう切望します。

### 〔参考文献〕

1. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA. 1998. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-62.
2. Joao Viana, 小島敏之, 牛島仁, 橋谷田豊. 2022. 家畜における胚生産と胚移植の統計 (2020 年) : 世界の胚産業(embryo industry) はパンデミック禍でも成長する : By Joao Viana, Chair - IETS Data Retrieval Committee : In: Embryo Technology Newsletter, v. 39, 2021. 家畜人工授精 315: 44-59.

## II. OPU 実施のための準備

OPU (経膈採卵) を始めるにあたり、最初に着手するのは超音波画像検査装置 (US) をはじめとする機材の選定となります。各機材が高価で、長い期間にわたり使用することになるため、機械選定に慎重になりがちです。また、初回購入時にデモ機を試用したとしても、牛の保定や機材の配置など、周りの環境が OPU に最適化されていないこと、術者も OPU に慣れていないため、機材の評価を的確にできる状態ではないことなどが、機材の選定をより難しくしているかもしれません。

そこで、本項では、機材の特性と超音波プローブの形状などによる、特徴や注意点、最低限必要な機材や施設について解説します。

また、1 日で多頭数の OPU を実施する場合や、冬季に OPU を実施する場合など、OPU を成功させるためには、その環境も重要な要因となりますので、実際の OPU 環境についても紹介します。

### 1. 超音波画像検査装置 (US)

現在、国内で販売されている OPU 用の経膈プローブを装着できる US は 3~4 種類、国内代理店を経由せず、直接輸入できる US を加えると 5~6 種類以上になります (図 II-1)。



図 II-1 OPU で使用されている超音波画像検査装置 (例)

国内各メーカーのスペックに関しては別紙資料を参照ください。

周波数については、8~10 MHz 以上で使用可能な機種であれば、2~3 mm ほどの卵胞でもきれいに描出することが可能です。卵胞の描出に関してはデモ機を使用して確認することをお勧めします。

カラードップラーの機能を有する機種もあり、OPU だけではなく心臓や、血管系の疾患の診断に使用することも考えて購入を検討するという考え方もありますが、一般的な OPU で使用する数百万円の US のスペックでは、卵巣などの毛細血管の血流の描出には問題なく使用できますが、心臓や大きな血管の血流の診断には画像処理の速度が不足となりの的確な診断には使用できない可能性があります。カラードップラー機能も選定理由に考えている場合はこの点に注意する必要があります。

通常、OPU で使用される吸引針は 17G、外径で約 1.5 mm のため、直径 3 mm くらいの卵胞が鮮明に描出できる機種を選定することが重要です。

### 2. プローブの特性

現在、国内で使用されている OPU プローブは、マイクロコンベックスで太さが 2~4 cm (センサ部は直径 2~3 cm) くらいのもので使われています (図 II-2)。

センサ部が 3cm くらいから、4 cm ほどにやや太くなりその後、細くなるタイプ (図 II-3-A)、センサ部約 2cm で細身のタイプ (図 II-3-B) の 2 種類の形状のプローブがよく使われています。

これら 2 種の OPU 用プローブについて、知っておくべき特徴を説明します。図 II-3-B のタイプはセンサ部が長くプローブ正面上部までセンサ部が続き、OPU 針ガイドの開口部の近くまでセンサ部があり、エコービームの放射範囲が広く取れています。

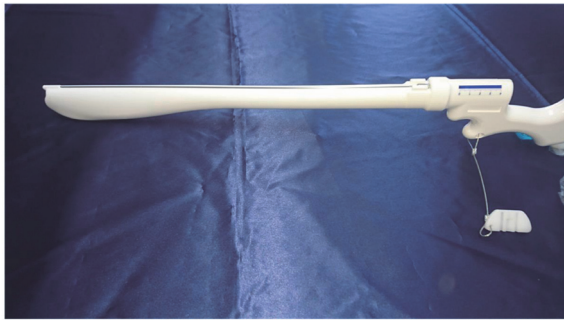


図 II-2 OPU 用プローブ

一方、**図 II-3-A** はプローブ先端の前面部だけにセンサ部があるため、エコービームの放射範囲が狭くなります。そのため、OPU 針ガイドの開口部までの間に隙間ができ、**図 II-3-A** タイプは死角が大きくなってしまいます。OPU 針ガイドの開口部がセンサ部から離れれば離れるほど死角は大きくなります。

**図 II-4** に卵胞吸引時にこの死角がどのような影響するかを示しました。**図 II-4-B** のように卵巣を**図 II-3-A** タイプのプローブに当てて描出される画像が**図 II-4-A** で、丸で囲んだ部分に卵胞が描出されています。**図 II-4-A** のエコー画像の右側が**図 II-4-B** のエコープローブの上側になります。センサ部に近い**図 II-4-A** の丸で囲んだ部分の卵胞を吸引できる位置に移動させるためには、プローブの上部に卵巣を移動させなければいけません。プローブに沿って上部に移動すると卵胞は描出できる範囲から消えてしまいます。US 画像上で実際に吸引できる位置(**図 II-4-C**)に卵胞を移動させると吸引針と卵巣の間に空間があるのがわかると思います。

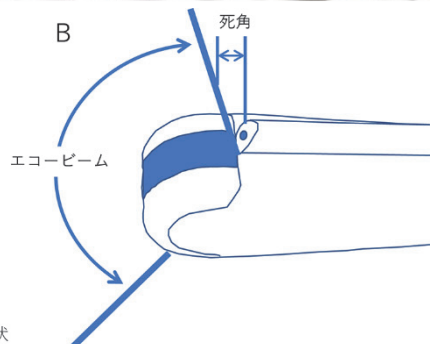
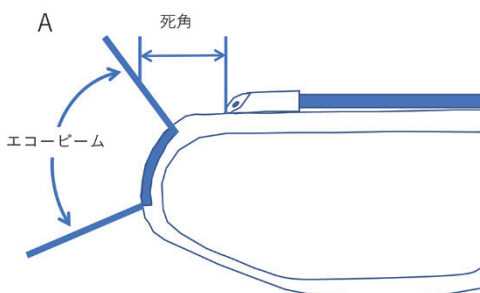
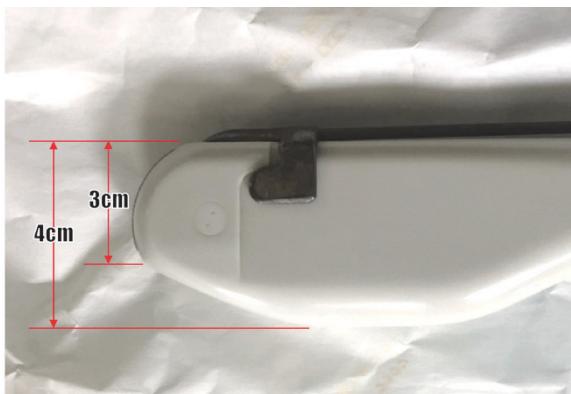


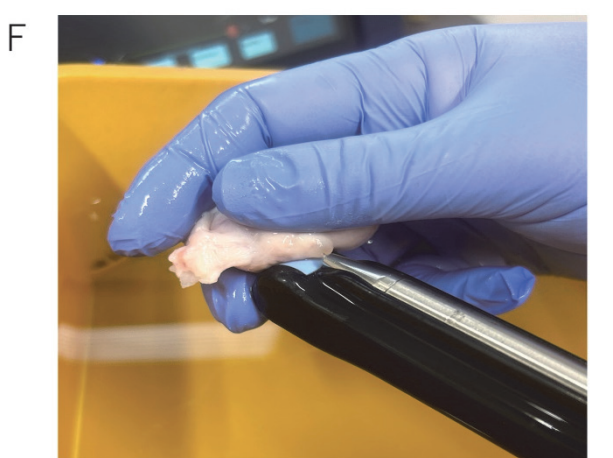
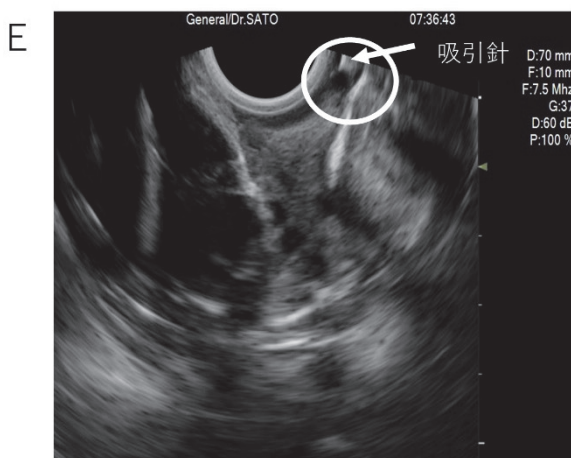
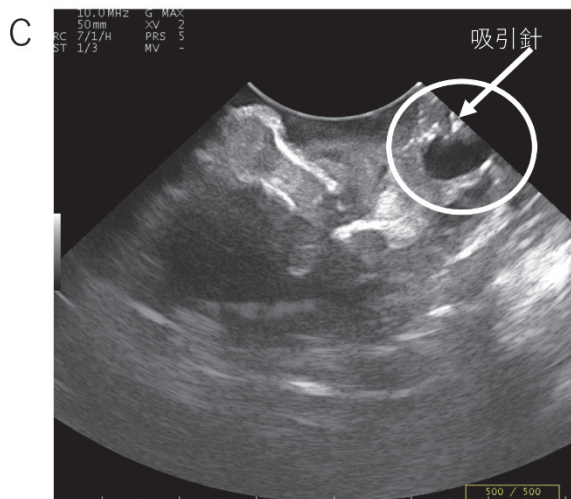
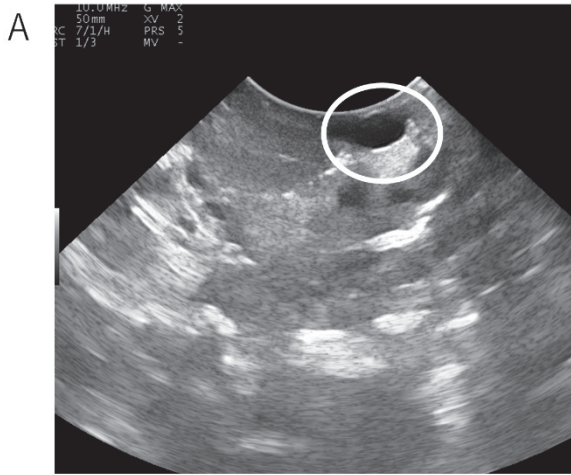
図3 OPUプローブ先端の形状

図 II-3-A OPU プローブ先端の形状

図 II-3-B OPU プローブ先端の形状

ます（図Ⅱ-4-D）。図Ⅱ-3-Aタイプのプロープを使用する場合は、死角を避けるために直腸から卵巣を操作して、吸引針と卵巣の間に適切な距離を確保し、吸引針による穿

刺に耐えられるよう安定した卵巣の保持が必要となります。目視下ではないため、どのくらい離すか（実際は角度を変える）を感覚的につかむ必要があります。



図Ⅱ-4 OPU用プロープの死角

一方、図Ⅱ-3-B タイプのプローブはセンサ部が広く OPU 針ガイドの開口部がセンサの近くまできているため、死角が少なくなります。そのため、プローブの近くで描出される卵胞を穿刺できる位置（図Ⅱ-4-E）に移動させても US が描出できる範囲から卵胞が外れることはなくなり、図Ⅱ-4-F のように距離を作る必要がなくなります。そのため、OPU 針ガイドの開口部付近での卵胞吸引が楽になり、より卵巣表面に存在する卵胞を吸引しやすくなります。

しかし、図Ⅱ-3-B タイプのプローブの多くが周波数は 7.5 MHz であり、図Ⅱ-3-A タイプの 10MHz のプローブに比べ、解像度が劣るため、図Ⅱ-3-A タイプのプローブの方が鮮明な画像が得られます。また、センサ部が 2 cm と小さいため、卵巣とプローブとの接地面積が少なく、安定して固定することが、図Ⅱ-3-A タイプのプローブと比較すると難しくなるようです。図Ⅱ-3-A タイプは、センサ部が縦に長くなっているため、プローブへの卵巣の誘導と保持が容易となります。

写真で紹介したプローブのうち、ステンレスの OPU 針ガイドを後付けするタイプの物がありますが、このガイドが、どのくらい動くか（遊びがあるか）も確認する必要があります。吸引する卵胞が直径数 mm のため、ガイドが動くことにより生じる誤差が、特に、離れた卵胞の吸引を難しくします。

以上のように US と OPU プローブの特徴を述べてきましたが、実際に選定する時には、小さい卵胞が綺麗に描出され、プローブの死角が少なく、OPU 針ガイドの遊びが少ない機種を選定することが重要です。また、今後の改良が望まれるところです。

### 3. 吸引器および恒温槽関連

OPU 用の卵胞吸引ポンプ（図Ⅱ-5-A）と恒温槽（図Ⅱ-5-B）は国内では 1 種類ずつしかない状況です。海外製品では吸引ポンプと恒温槽が一体となったもの（図Ⅱ-5-C）が販売されていて、フットスイッチが純正で付属している物もあり、一人で OPU を行う場合は便利な機能です。また、価格も卵胞吸引ポンプと恒温槽を 1 台ずつ購入するよりは安価となります。ただ、故障の際は、吸引機能と恒温機能のどちらか一つの故障でも、全てを交換することになります。



図Ⅱ-5-A 卵胞吸引ポンプ



図Ⅱ-5-B 恒温槽





図 II-5-C 恒温機能付き卵胞吸引ポンプ

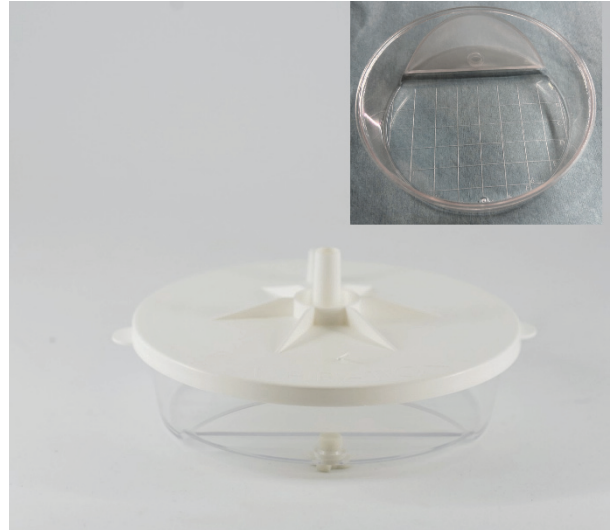


図 II-6-B 卵検索用フィルター

また、関連するものとして、卵子を回収するチューブキャップ（図 II-6-A）と卵子検索用のフィルター付きディッシュ（図 II-6-B）があります。このキャップは OPU 針付属のラインをそのまま入れることができるため、ライントラブルの軽減につながります。

図 II-6-B の検卵用フィルターはディッシュの一部に斜めのフィルターがついているため、洗浄も簡単で、目詰まりも少なく、そのままディッシュとして検卵可能で、検卵の時間短縮にもつながります。



図 II-6-A 吸引チューブキャップ

#### 4. OPU を実施する環境

実際の OPU の現場では卵巣から卵子を吸引している時間は 10～15 分程度とさほど長くはありません。牛の出し入れや保定の時間が OPU の効率に影響します。

3～4 頭の OPU であれば、長木や単管、ロープなどを使い、牛を柱などに寄せた簡易な保定でも対応が可能です（図 II-7）。この方法では牛を出し入れする度に、ロープなどを外して、牛を後退させて牛床から出した後、次の牛を入れ、再び保定し直す作業が必要となり、牛の出し入れに時間を要します。

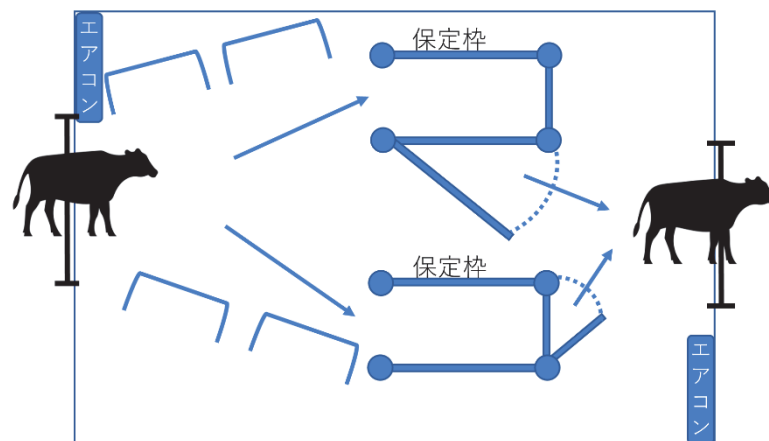


図 II-7 簡易な保定

1日で10頭を超えるような頭数を実施する場合は、**図Ⅱ-8**のようなOPU施設があるとスピーディーにOPUを実施することができます。OPU時の牛の動きを**図Ⅱ-8-A**の模式図に示しました。牛を柵場に入れ、OPUを実施し、その後、牛が後退することなく、前方から、一方通行で牛が出ていきます。**図Ⅱ-8-C**のように前方を解放できるように保定枠を工夫することが重要です。このように、OPUドナー牛が一方通行になるスムーズな動線を確認することが、短時間で多くの牛にOPU実施するためには重要です。

また、卵子は受精卵に比べて環境温度の低下に弱く、低温時の胚盤胞発生率の低下

が問題となります。**図Ⅱ-8**のOPU施設ではエアコンを設置して室温を常に20～25℃に保つようにしています。あるいは**図Ⅱ-8**のような、しっかりとした施設ではなくても、OPUを実施する環境を簡易的にシートで囲い(**図Ⅱ-9**)、中に暖房を入れることで、ある程度、環境温度を保つことが可能になります。OPU針のチューブを保温材(Aeroflex #1006 size:10 mm well:6 mm)で覆ったり(**図Ⅱ-10**)、チューブを袖の中(直腸に挿入する方)に通して、吸引した卵胞液が入るチューブを胸のポケットに入れるなど、温度の低下を避けることで、環境温度の影響をある程度、防ぐことができます。



図Ⅱ-8-A OPU室模式図



図Ⅱ-8-B OPU室



図Ⅱ-8-C 前方が解放する保定枠



図 II-9 OPU 環境の簡易的な保温



図 II-10 OPU 採卵針チューブの保温

## 5. 検卵の環境

OPU 後の検卵は、OPU 実施場所とラボが近ければラボに持ち帰り実施することが可能ですが、多頭数で実施する場合や、ラボから遠距離の農場で OPU を実施する場合には現地で検卵する必要があります。

農場の事務所などに顕微鏡や保温プレートなどを持ち込み検卵することは、十分可能です。農場内の生乳処理室などで実施することもあります。衛生状態が悪いようであれば、**図 II-11** のような簡易的なクリーンブースを持ち込み、その中に顕微鏡を設置して検卵することで、最低限の衛生度を保つことができます。

多頭数分の検卵を効率的に行うことを目的とする場合は、**図 II-12** のような検卵・凍結などが実施できるように改造した専用車 (ET 車) を導入することも効果的です。いずれにしても、現地での検卵では、衛生環境に加えて、室内やディッシュなどの器材の保温に注意する必要があります。



図 II-11 簡易クリーンブース



図 II-12 ET 車内部

## 6. おわりに

OPU が注目され、広がることにより、さまざまな形で OPU が実施されることになると考えられます。そのため、OPU 施設、器具の衛生に関することに触れておきたいと思います。1 日で多頭数の OPU を実施したり、数件の農場から牛を一定期間預かって OPU を実施したり、あるいは近隣数軒の農家の牛を一箇所に集めて、1 日で多頭数の OPU を実施したりと、そのバリエーションはいくつも考えられます。異なった農場の牛を同時に一定期間預かる場合には感染症伝播のリスクが増えることが懸念されます。特に牛伝染性リンパ腫などが広がらないように吸血昆虫のコントロールなど、新たに気をつけなければならないことがでてきます。

特に、OPU では出血を伴う上に、プローブなどは共用することになります。OPU で各種病原体の感染リスクを上げないためにも、牛ごとの、針が通るガイドの洗浄あるいは交換、プローブカバーの使用など OPU 処置時に適切な衛生管理を実施する必要があります。獣医師のみが実施できる OPU です。感染症などの面からも安全な OPU の実施を心がける必要があります。

最後に、本稿で述べたことは、著者が OPU を実施してきた中で、経験的に習得した技術や秘訣を記した部分もあります。

本書を参考にしつつ、読者の皆さんが各自の現場において試行し、学術的根拠も得ながら技術習得の研鑽に励んでいただければ幸いです。

### Ⅲ. 供卵牛の準備

経膈採卵-体外胚生産 (OPU-IVP) は多排卵処置による体内胚の採取と異なり、短期間に多回数の実施が可能で<sup>1)</sup>、胚生産効率も年々高くなり、短期間により多数の胚を生産できる技術として日本での利用も増加しています<sup>2)</sup>。卵子を採取する供卵牛は遺伝的能力が高いこと、および健康で強健性の高いことが求められます。現在は多くの機関や農場でゲノミック評価が採用され、遺伝的能力は生まれた子牛が繁殖供用される前に判明します。OPUは膈にプローブを挿入し、直腸に入れた手で卵巢をプローブへ誘導し、超音波画像を見ながらプローブに取り付けたガイドから吸引針を卵胞へ穿刺して卵子を卵胞液ごと吸引採取する技術です<sup>3)</sup>。そのためプローブと手がそれぞれ膈と直腸に入り、操作することができれば実施可能です。本章では供卵牛の準備、特に年齢、産歴および品種について解説します。

#### 1. 月 齢

##### (1) 若齢牛 (未経産牛 6~10 カ月齢)

OPUでは基本的に直腸検査が可能で、超音波画像検査装置のプローブが膈に挿入可能な牛であれば卵子を採取することができます。また、IVPでは2カ月齢の子牛の卵巢から採取した卵子を用いて胚盤胞が作製

でき、それらの胚盤胞を移植することで子牛の生産が可能で<sup>4)</sup>。すなわち、子牛でもOPUが可能で卵子が採取できれば移植胚を作製することが可能と考えられ、著者が1997年に訪問したドイツのFAL研究所では7カ月齢の子牛からOPU-IVPによる胚の作製の研究を実施していました(図Ⅲ-1)。

そこで、著者らも6カ月齢のF1子牛(ホルスタイン種×黒毛和種)からの胚生産を試みました。この子牛に前処置なしでOPUを7日間隔で2回実施して、合計65個の卵子を採取でき、10個の胚盤胞を作出しました。このうち7日目に発生した胚盤胞を4頭の受胎牛へ移植した結果、2頭が受胎し、2頭の子牛を生産しました(表Ⅲ-1)。このことから、子牛の卵巢は小さいものの、卵胞数は成牛とさほど変わらず、卵子の採取が可能で、作出した胚盤胞は受胎性および子牛生産性があることが確認できました<sup>5)</sup>。

また、9~10カ月齢の性成熟前の黒毛和種子牛から7日間隔で7回のOPU-IVPを実施し、1回あたり22.4個の卵子を採取し、5.0個の胚盤胞を作製することができました。この生産胚数は対照区の黒毛和種成牛(2~3歳)の19.0個および5.9個と差のない採取卵子数および生産胚数でしたが、胚盤胞の発生率は成牛よりも有意( $p<0.05$ )に低いことを確認しました(図Ⅲ-2)。また、発生した胚盤胞を新鮮胚として移植することで、高い受胎率(78.9%)が得られることが判明し、



図Ⅲ-1. FAL 研究所 (ドイツ) での様子

さらにガラス化保存した胚盤胞においても受胎を確認することができました（表Ⅲ-2<sup>6)</sup>）。このように、黒毛和種においても性成熟前の子牛から OPU-IVP を用いて胚を生産することは可能ですが、14カ月齢未満のドナーの胚を移植して生産された子牛を登記するためにはドナーの基本登録が終わっていないなど、いくつかの問題があることから、事前に関係機関へ確認することが必要です。

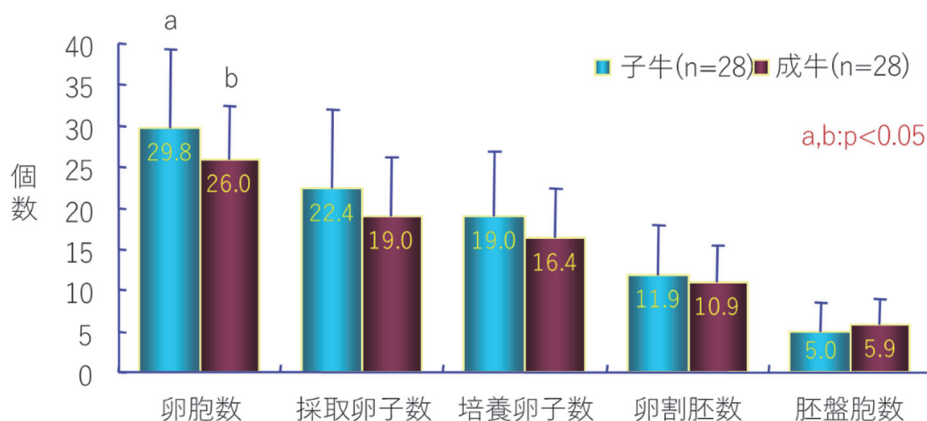
ホルスタイン種ではこれらの月齢での OPU-IVP について検討はしていませんが、OPU-IVP により性成熟前の若齢牛から胚を作出でき、その胚を移植することで世代間

隔の短縮が図られることが考えられます。現在はゲノミック検査により、子牛のゲノミック評価が判定できるようになり、このゲノミック評価と若齢牛の OPU-IVP を組み合わせることで、さらなる改良の加速化が可能と考えられ、米国およびカナダではホルスタイン種の改良のために、7~8カ月齢の供卵牛から胚を生産して移植することが繰り返され、世代間隔の短縮、ゲノミック評価および性選別精液の使用により改良の加速化が起きています<sup>7)</sup>。

このように、若齢牛に対する OPU を実施するには、牛の体型が小さいことから細いプローブを選択する必要があります。著者

表Ⅲ-1. 6カ月齢のF1における OPU-IVP 胚の生産と移植成績（田川と今井, 2006）

OPU回数	日齢	卵胞数	採取卵子数	培養卵子数	卵割胚数 (%)	胚盤胞数 (%)	移植頭数	受胎頭数 (%)
1回目	179	49	36	30	14 (47)	6 (20)	2	2 (100)
2回目	186	41	29	21	17 (81)	4 (19)	2	0 (0)
合計		90	65	51	31 (61)	10 (20)	4	2 (50)



図Ⅲ-2. OPU-IVP による性成熟前の牛からの胚生産成績

表Ⅲ-2. 性成熟前の牛から OPU-IVP で生産した胚の移植成績（Tagawa et al, 2007）

移植方法	移植頭数	受胎頭数 (%)	流産頭数 (%)
新鮮胚	19	15 (78.9)	3 (20.0)
ガラス化胚	2	1 (50.0)	0 (0.0)

らが研究用として6カ月齢のF1および9～10カ月齢の黒毛和種からOPUで卵子を採取したときは、ヒト用のプローブにアタッチメントを付けて用いました。現在はさまざまなOPUの機器が開発されているので、若齢牛にも使用可能な形状のOPUプローブの購入が必要と考えられます。

## (2) 老齢牛

一方、老齢牛に関しては卵巣に卵胞がある限りOPUにより卵子を採取することは可能ですが、その効率は徐々に悪化していくと考えられます。ヒトでは卵巣予備能として卵胞数の測定および抗ミュラー管ホルモン（AMH）の測定が臨床現場で行われています。ヒトでは年齢と共にAMH濃度が低下し、卵巣における小卵胞の発育数が減少していることが明らかとなっています<sup>8)</sup>。牛では人ほどの急激な減少は考えられませんが、老齢牛になると卵胞数が減少し、質が悪化すると予想されます<sup>9)</sup>。表Ⅲ-3にホルスタイン種高能力老齢牛のOPU-IVP成績を示しました。B牛は11日間に4回のOPUを実施し、卵子を採取したデータです。複数回実施しているその他の牛は、十分な間隔を空けてOPUを繰り返し実施しまし

た。いずれの牛も体内胚の採取が困難となり、OPU-IVPを実施したものです。合計11回のOPU-IVPで9回は胚盤胞が作出できており、胚生産効率は一般牛より劣るものの、安定した胚生産が可能でした。

ただし、黒毛和種において11～12歳のドナーより採取した卵子を用いたIVPでは、卵子の質に問題があり、多精子侵入した卵子の割合が高いことも著者らはデータとして持っています。また、10歳以上の牛の卵巣を使った体外受精において同様の報告があります。これは卵子の細胞質の成熟が不十分なため、表層顆粒の分布異常など卵子の多精子拒否機構が十分に働かず、複数の精子の侵入を許すことに起因していると考えられています<sup>10)</sup>。これら多精子侵入を起こした卵子の全てが子牛への発生能を欠く訳ではありませんが、子牛への発生能が低下する原因の一つと考えられています<sup>11)</sup>。そのため、老齢牛から生産したOPU-IVP胚の受胎率は一般牛のそれと比較して低くなる可能性があります。

## 2. 産 歴

### (1) 未経産牛

未経産牛のOPU-IVPについては3つのス

表Ⅲ-3. ホルスタイン種高能力老齢牛に対するOPU-IVP

ドナー牛	OPU回数	培養卵子数 (平均個数)	卵割卵数 (%)	胚盤胞数 (%)	備考
A	4	38 (9.5)	19 (50.0)	11 (28.9)	15歳
B	4	63 (15.8)	46 (73.0)	29 (46.0)	10歳 (11日間)
C	2	17 (8.5)	3 (17.6)	1 (5.9)	12歳
D	1	6 (6.0)	2 (33.3)	2 (33.3)	14歳
合計	11	124 (11.3)	70 (56.5)	43 (34.6)	

a, b : 異符号間に有意差あり (p<0.05)

テージが考えられます。1 つは性成熟前の未経産牛、2 つ目は性成熟後から妊娠前の未経産牛、最後は妊娠した未経産牛に対する OPU-IVP の実施です。これらの 3 つのステージの未経産牛を比較すると卵巣自体は成長と共に大きくなることは確かですが、卵胞数はそれほど変化がないと考えられます。また、卵巣に存在する卵胞数は個体によりバラツキがあること、卵胞数には卵胞波ごとに高い再現性があることが報告されており、性成熟前後においてあまり変化がありません。そのため、性成熟前、性成熟後および妊娠した未経産牛の卵巣に存在する卵胞数は、内分泌の変化にあまり影響されないと考えられます<sup>12)</sup>。ただし、体の成長に伴い個々の卵子および卵胞の直径が少しずつ大きくなることで、IVP による胚生産率は向上すると考えられ、性成熟前より性成熟後の方が IVP による胚盤胞の発生率は向上します<sup>13)</sup>。

## (2) 経産牛

経産牛においても初産牛より産次を重ねることで、体軀および卵巣重量は大きくなり、一般的に牛の成熟年齢は 48 カ月齢と考えられています。ホルスタイン種では採卵成績が徐々に向上し、36~48 カ月齢にかけて多排卵処置の卵巣反応がピークを迎えると報告されています。これは多排卵処置に用いる FSH に反応する卵胞がこの時期に多いことを示していますが、OPU は多排卵処

置よりも幅広く、月齢による差はないと報告されています<sup>14)</sup>。

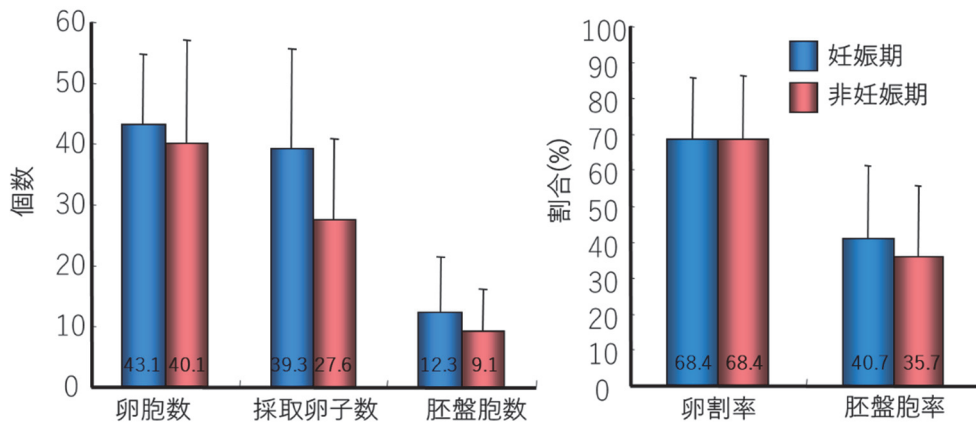
経産牛は OPU を実施する時期として生理的空胎期間、生理的空胎期間後から妊娠まで（非妊娠期）、妊娠後（妊娠期）の 3 つが考えられます。生理的空胎期間は分娩後から約 40 日間であり、この間に子宮回復、分娩後初回排卵および初回発情など生殖器官の大きな変換期にあたります。著者らは分娩後 10~20 日の生理的空胎期間に OPU-IVP を試み、分娩後 40 日以降に実施した OPU-IVP と比較しました。その結果、生理的空胎期間中の OPU-IVP では培養卵子数は 16.1 個、胚盤胞数 5.6 個、40 日以降はそれぞれ 24.5 個および 8.7 個であり、培養卵子数で有意差があることを確認しています（表 III-4）。このように生理的空胎期間は卵胞数が少なく、採取卵子数および培養卵子数も少なくなります。結果としては OPU-IVP による胚生産効率は低いものの、本来であれば胚生産ができない期間のため、この期間に胚生産ができることでより効率的になります。

妊娠期の OPU は早期胚死滅および流産の原因とはならないことが報告されています<sup>15)</sup>。また、胚生産効率も妊娠期と非妊娠期で差がないという報告<sup>16)</sup>があり、著者らも妊娠期のホルスタイン種 4 頭を用いた検討で、妊娠期と非妊娠期で OPU-IVP による胚生産効率に差がないことを確認しています（図 III-3）。この研究では妊娠 60~90 日

表 III-4. 生理的空胎期間における OPU-IVP による胚生産

供試牛 分娩後日数 (供試数)	培養 卵子数	卵割率 %		胚盤胞数 (%)	移植可能胚数 (%)
		31h	55h		
10-20 日 (n=8)	16.1±4.9 <sup>a</sup>	44.6±14.8	53.6±15.6	5.6±4.7 (31.9)	5.2±4.5 (29.6)
40 日 (n=43)	24.5±14.0 <sup>b</sup>	53.8±21.0	64.6±21.5	8.7±6.4 (36.0)	7.6±6.2 (31.5)





図Ⅲ-3. 妊娠期および非妊娠期における OPU-IVP による胚生産および胚発生率

の間に7日間隔で4回の OPU-IVP を実施したところ、卵胞数および採取卵子の質にほとんど差がなく、卵割率および胚盤胞発生率に差はありませんでした。また、OPU 前後に採血をして血液中のプロジェステロン濃度の変化を観察しましたが、OPU 前後の低下は認められず、流産も発生せず4頭共に健康な子牛を分娩しました<sup>17)</sup>。

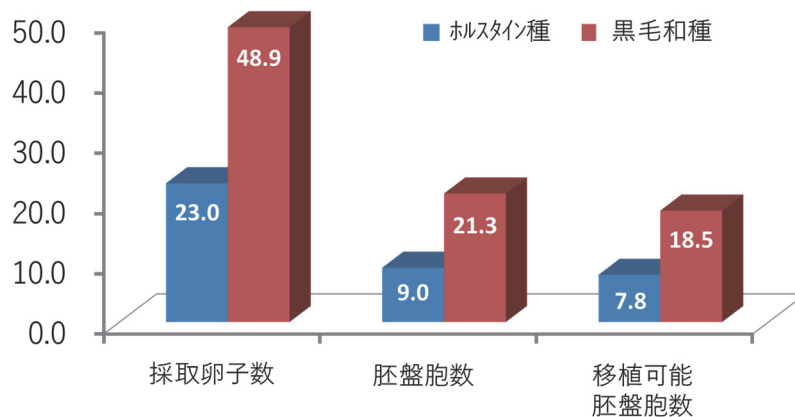
このように妊娠期においても OPU-IVP を用いれば変わらない効率で胚生産が可能となりますが、卵巣や黄体に入る血管系を傷つけることはそれらの機能を減退させると考えられます。そのため、妊娠期の OPU を実施する上では黄体を傷つけないことおよび黄体の近くの血管を卵胞と間違えて穿刺しないことが大切です。なお、妊娠期では胎子の成長と共に子宮が大きくなり、プ

ローブまで卵巣を引き寄せることが難しくなるため、OPU は妊娠 100 日くらいまで実施可能といわれています。

### 3. 品種の特徴

#### (1) 黒毛和種とホルスタイン種の比較

体内胚を採取する多排卵処置では黒毛和種がホルスタイン種よりも採卵成績が良いことが知られています。ホルスタイン種は高泌乳による負のエネルギーバランス、飼料摂取量の増加による肝臓への血流量の増加に起因する末梢中ステロイドホルモン濃度の低下、高タンパク飼料の摂取による子宮・卵管内の pH の低下、品種として暑熱ストレスに弱いなど多くのマイナス要因が関係しています。実際に著者らの OPU-IVP の成績 (図Ⅲ-4) でもホルスタイン種の方が



図Ⅲ-4. 2016-2018 年におけるホルスタイン種および黒毛和種の OPU-IVP による胚生産 (ホルスタイン種 n=40、黒毛和種 n=22)

黒毛和種よりも OPU による卵子の採取数は少なくなっています。また、採取した卵子の IVP の成績は単純に計算すると胚盤胞発生率はホルスタイン種 39.1%、黒毛和種 43.6%となり、大きな差はないことが分かります。特にホルスタイン種ではほとんどの牛でメス性選別精液を使っていることを考えると、卵子の質という点では全く変わらないと考えられます。

一方、と畜場の卵巣から卵子を採取する場合は卵巣の卵胞数に比例します。と畜場に搬入されるホルスタイン種および黒毛和種はどちらも肥育されており、泌乳および負のエネルギーバランスなどのストレスは受けていません。シリンジと針を用いて卵子を 2~6 mm の卵胞より吸引採取したときの卵胞数を調査したところ、卵巣 1 個当たりホルスタイン種も黒毛和種も 24.3 個の卵胞が存在しました（図 III-5）。黒毛和種およびホルスタイン種の月齢および産歴を考えると、黒毛和種は未経産牛で約 30 カ月齢であり、ホルスタイン種は経産牛で黒毛和種よりも月齢を重ねていると考えられるため、

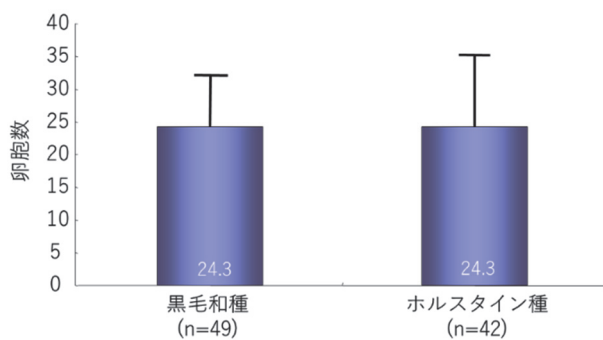


図 III-5. ホルスタイン種および黒毛和種肥育牛のと畜後の 1 つの卵巣に存在する卵胞数率

比較することは難しいですがどちらの品種も 1 頭当たり 48.6 個の卵胞があったこととなります。すなわち、黒毛和種およびホルスタイン種において泌乳、低栄養および分娩などのストレスを抱えない状態では潜在的に 50 個くらいの卵胞が発育する能力があると考えられます。OPU で多くの卵子を採取するには卵巣のその能力を十分に発揮させ、超音波画像検査装置ですべて映して穿刺することが重要となります。

## (2) ホルスタイン種における泌乳牛と乾乳牛

ホルスタイン種の泌乳時と乾乳時の OPU-IVP による胚生産成績を表 III-5 に示しました。泌乳時は乾乳時と比較して卵胞数および採取卵子数が少なくなりました。そのため胚盤胞へ発生した胚数が減少しましたが、胚盤胞への発生率はどちらも 40% 前後で差はありませんでした。特に泌乳最盛期の牛は負のエネルギーバランスになる可能性が高く、そのような場合、卵巣にある卵胞数が減少します。また、負のエネルギーバランスが長期間持続すると牛は卵巣静止などの症状を示し、主席卵胞は排卵せず新たな卵胞波も発生しない状態になり、OPU で吸引の対象となる小卵胞数が極端に少なくなります。このような時期に OPU を実施しても採取卵子数は少なく、採取された卵子の質も低く、直径が小さく細胞質の薄い未熟な卵子が多くなる傾向があります。

表 III-5. ホルスタイン種乾乳牛および泌乳牛における OPU-IVP による胚生産

供卵牛	OPU 頭数	卵胞数	採取卵子数	胚盤胞数	胚盤胞 (%)
乾乳牛	60	43.4	36.7	11.8	41.6
泌乳牛	28	34.0	22.8	8.6	38.0

〔参考文献〕

1. Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59: 651-74.
2. 平田統一. 2022. OPU-IVP 技術活用の現状と課題 —JETS アンケート結果を受けて—. 第 6 回日本胚移植技術研究会大会・第 39 回北海道牛受精卵移植研究会合同研究発表北海道大会講演要旨集 p9-10.
3. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-62.
4. Taneja M, Bols PEJ, de Velde AV, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X. 2000. Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes In Vitro and In Vivo: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation. *Biol Reprod* 62: 206-13.
5. 田川真人, 今井敬. 2006. OPU-IVF によるウシ胚の作出、その効率と汎用性. *日本胚移植学雑誌* 28: 29-35.
6. Tagawa M, Matoba S, Okada M, Metoki K, Imai K. 2007. Developmental competence of oocytes selected by the brilliant cresyl blue staining in prepubertal and adult cattle. *Reprod Fertil Dev* 19: 273-74 (Abstr).
7. Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. 2020. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 14: 991-1004.
8. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A. 2010. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 16: 113-30.
9. Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, Wiltbank MC. 2015. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci* 98: 169-78.
10. Magata F, Tsuchiya K, Okubo H, Ideta A. 2019. Application of intracytoplasmic sperm injection to the embryo production in aged cows. *J Vet Med Sci* 81: 84-90.
11. Han YM, Wang WH, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim JH, Murphy C, Day BN, Prather RS. 1999. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol Reprod* 61: 1340-6.
12. Burns, DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod* 73: 54-62.
13. Kawamoto TS, Viana JHM, Pontelo TP, Franco MM, de Faria OAC, Fidelis AAG, Vargas LN, Figueiredo RA. 2022. Dynamics of the reproductive changes and acquisition of oocyte competence in Nelore (*Bos taurus indicus*) calves during the early and intermediate prepubertal periods. *Animals* 12: 2137.
14. Jatou C, Koeck A, Sargolzaei M, Malchiodi F, Price CA, Schenkel FS, Miglior F. 2016. Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. *J Dairy Sci* 99: 3612-23.
15. Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341-57.
16. 平田統一, 佐々木修一, 佐々木修, 大澤健司. 2006. 人工授精後の黒毛和種牛に対する連続経膈採卵—牛胚体外生産法の適用—. *日本胚移植学雑誌* 27: 78-86.
17. Imai K, Tagawa M, Yoshioka H, Matoba S, Narita M, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S. 2006. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle. *J Reprod Dev* 52 (Suppl): S19-S29.

## 「OPU と飼養管理」

OPUにより効率的に胚を生産するためには、回収卵子数は多い方が良く、そのためには卵巣中の卵胞数が多いドナーが理想です。そして、飼養管理の改善により卵胞数を増やすことができれば、OPUはさらに効率的になると考えられます。しかし、卵胞数については飼養管理より遺伝的要因が大きいのではないかという、以下のような報告がみられます。

大谷ら(2007)は、黒毛和種未経産牛の一卵性双子4組を用い、双子の一方は通常の飼養管理、もう一方は肥育管理しながらどちらもOPUを実施しました<sup>1)</sup>。その結果、肥育管理、すなわち栄養状態を高めても卵胞数や回収卵子数は増加せず、双子同士の卵胞数および回収卵子数が似通っていました。このことから、少なくとも栄養レベルを単純に高めても卵胞数は増加しないと考えられます。また、乳牛では卵巣中の3mm以上の卵胞数は個体内での再現性が高いことが報告されており<sup>2)</sup>、黒毛和種でも乳牛でも卵胞数は遺伝的要因が大きいと考えられます。

一方、黒毛和種は1品種ながら体格や発育、性質など諸種の点で系統の影響を大きく受けているため、系統と卵胞数に一定の関係があれば、事前に回収卵子数が多い個体を推定できる可能性があります。小西ら(2016)は、黒毛和種の系統を指数化して過剰排卵処理成績を比較したところ、同様の飼養管理条件下では気高系や藤良系といった増体系で黄体数や回収卵数が良い事を報告しています<sup>3)</sup>。過剰排卵処理成績は卵胞数の影響を一定程度受けることから、OPUにおいても同様の傾向がある可能性があります。これらのことから、卵胞数については、飼養管理の影響よりも個体の遺伝的要因が大きいと考えられます。

ただ、肝臓に疾患を有する牛では、卵子の質が低下し、体外受精胚の胚盤胞発生率が低下するといった報告もみられています<sup>4)</sup>。牛ではエネルギーの過不足や粗タンパク質の過剰は肝障害を引き起こす可能性があることから、体外受精胚の発生率を考慮すると、ドナーについても一定レベルの飼養管理は必要と考えられます。また、生殖器や直腸に脂肪が多く付着することになればOPU操作がしづらくなるのは自明の理であることから、当然そのような状態にしない飼養管理は必要と考えられます。

## 〔引用文献〕

1. 大谷直人, 渡邊貴之, 小西一之, 小島敏之. 2007. 黒毛和種一卵性双子の経膈生体卵子吸引成績に及ぼす飼養方法および遺伝的要因の影響. *日本畜産学会報* 78: 147-53.
2. Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals. Very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod* 73: 54-62.
3. 小西一之, 渡邊貴之, 大福浩輝, 野口浩正. 2016. 代謝プロファイルテストを利用した飼養管理を行っている黒毛和種繁殖牛群の過剰排卵処理成績の推移と血統の影響(事例報告). *日本胚移植学雑誌* 38: 101-12.
4. Iwata H, Tanaka H, Kanke T, Sakaguchi Y, Shibano K, Kuwayama T, Monji Y. 2010. Follicle growth and oocyte developmental competence in cows with liver damage. *Reprod Dom Anim* 45: 888-95.

#### IV. 前処置 <一般的な多排卵処置とその必要性>

牛の胚生産に影響を与える要因として、多排卵処置プロトコール、ドナー牛、環境があげられます<sup>1)</sup>。ドナー牛に固有の要因として品種、胞状卵胞数、年齢などがありますが、栄養、ストレス、OPU（経膈採卵）の実施頻度などの外的要因も卵胞発育と卵子卵丘細胞複合体（COC）の質に影響を与えます<sup>2)</sup>。

牛の OPU は発情周期のステージに関係なく実施されてきました。それが OPU の利点ともなっています。一方で、卵胞波を制御するためのホルモン処置により成績が改善される可能性があります。卵胞波を同期化することで、ドナー牛の卵巣状態をより均一化できることや、新たな卵胞波出現の初期であればより多くの卵胞が吸引できる可能性が高まること、などの利点があります<sup>3), 4), 5)</sup>。OPU では、採取した未成熟卵子が体外にて成熟、IVP（体外胚生産：*in vitro production*）を経て移植可能な胚として発育できるか、という点（発生能）も重要です。発生能とは、卵母細胞が減数分裂を再開し、受精後に卵割を開始し、移植可能な胚に発育した後に母体で発育を続け、健康な子牛として出生する能力であると定義されています<sup>6)</sup>。

OPU と IVP の組み合わせにより、卵巣に多数の胞状卵胞を有する *Bos indicus*（ゼブー牛：インド原産種）において年間 100 万個以上のウシ胚が生産されています<sup>7)</sup>。その後、*Bos taurus*（ヨーロッパ原産種）にも OPU を大規模に適用するようになり、北米や南米では COC の発生能を向上させるためにホルモン処置を実施することが一般的となっています。IVP の成功の可否は、ドナー牛から採取した COC の数と質の両方に左右されます。多排卵反応を最大限にするために有用と考えられる FSH 分泌動態を誘起するためのプロトコールが模索されています。

IVP が現場で実用可能な形、すなわち商業的に応用され得る形で普及が進むかどうかは、OPU に

よりドナー牛から得られる卵子の数と質にかかっています<sup>1)</sup>。卵胞波出現の同期化および OPU に先立つ前処置としての多排卵刺激は、牛における OPU による成績を改善するために採用されてきた方法であり、OPU 1 回あたりの総採胚数の増加をもたらすと報告されています<sup>8), 9), 10), 11), 12)</sup>。

本項では、OPU のための多排卵処置とその必要性に関する情報を提供します。

##### 1. OPU 前の多排卵処置実施の必要性

ゼブー牛のドナーは通常、FSH 刺激を行わずに OPU を実施します。その理由は卵胞数が多いことと、直径 2 mm 以上のほとんどの卵胞から卵子が発育すること<sup>13), 14)</sup> からです。一般的にゼブー牛はホルモン処置を行うことなく 1 回の OPU あたり平均 6~7 個の胚を生産します。一方、ヨーロッパ原産種では、ヨーロッパ、北米ともに乳牛の約 40%が OPU 前にホルモン処置を受けているのに対し、肉牛ではヨーロッパで 1%、北米では 85%（*Bos taurus* と *Bos indicus* の交雑種と推定）が処置を受けています。北米では OPU 前の FSH 投与により、乳牛（投与有：15.1、投与無：15.4）、肉牛（投与有：22.3、投与無：20.6）ともに平均 COC 採取数は増加しなかったものの、胚生産数は乳牛で 2 倍以上（5.3 対 2.2）、肉牛では 31%増加（7.2 対 5.5）したという成績が報告されています。このことは、FSH 刺激は OPU で吸引可能な卵胞数を増加させるのではなく、卵子の発生能を向上させることを示唆しています。しかしながら、ヨーロッパでは OPU 前のホルモン刺激により、平均 COC 採取数が乳牛で 62%（10.7 対 6.6）、肉牛で 20%（9.8 対 8.2）増加し、移植可能胚の平均数も乳牛で 93%（2.7 対 1.4）、肉牛で 35%（3.5 対 2.6）増加しました。従って、ヨーロッパ原産種への FSH 刺激は COC の発生能を高めるだけでなく、OPU に利用できる卵胞数を増加させる効果があるのかもしれませんが、とはいえ、最適な投与プロトコールや吸引した卵胞の最小サイズなど、他の要因に起因している可能性があることから、引き続きデータを収集して検討を重ねていく必要が

あるでしょう。

## 2. 採取卵子数を増やし、発生能を高めるための処置

多排卵処置プロトコルの種類は、ドナーがインド原産種かヨーロッパ原産種か、乳用種か肉用種か、成牛か育成牛かによって異なり、さらに OPU の頻度によっても異なります。

ヨーロッパ原産種のドナーは 4~10 mm サイズの卵胞数を最大化するために、eCG、インヒビン、成長ホルモンなどさまざまなホルモン処置が試されてきましたが、現場で普及している薬剤は FSH 製剤です。FSH による卵巣刺激は多くの小卵胞 (2~4 mm) を中卵胞 (5~10 mm) や大卵胞 (10 mm 以上) に誘導し、COC の発生率を向上させることで IVP プログラムの効率を向上させることができると報告されています。Viera ら (2014) は、泌乳牛および非泌乳牛に対して図 IV-1 のように FSH を投与すると、投与しない場合と比較して胚盤胞率が泌乳牛では 10% から 17.3% に、非泌乳牛では 31.3% から 52.8% に向上し、その結果、OPU 1 回あたりに生産される胚盤胞数が 2 倍以上に増加したと報告しています<sup>15)</sup>。

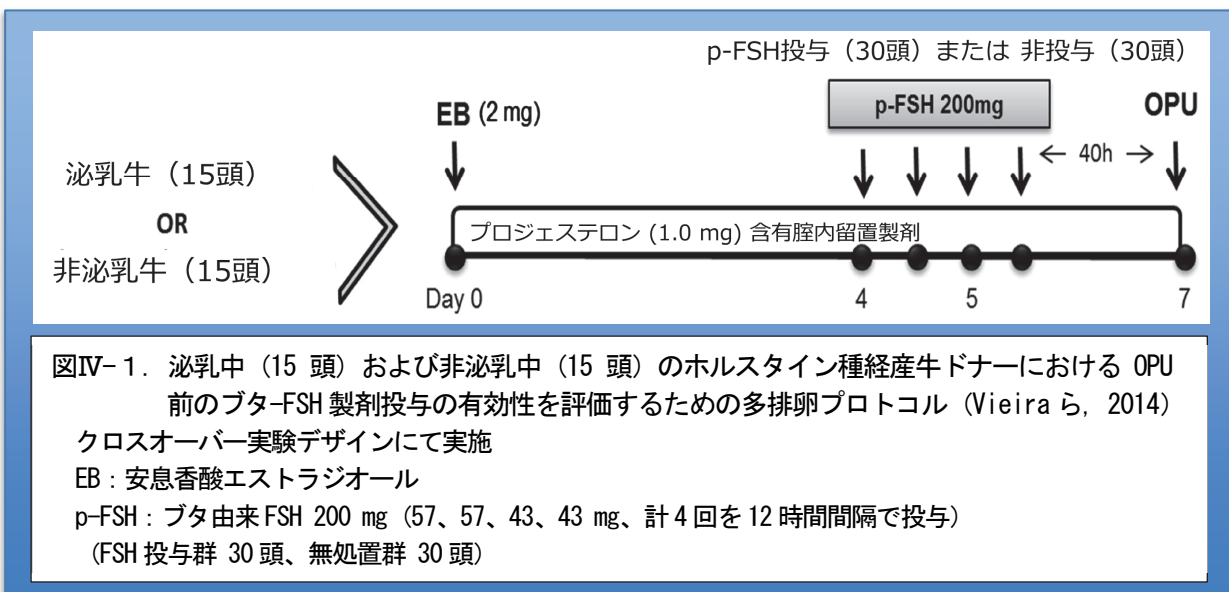
### (1) FSH 製剤による多排卵処置

成牛では、FSH 投与は直径 2 mm 前後以上の卵胞を動員し<sup>16)</sup>、その発育を促しますが、OPU に利

用可能な卵胞総数を増加させることはないと言われています<sup>7)</sup>。一方、生後 5 カ月の子牛に FSH を処置すると直径 2 mm 未満の卵胞が動員され、OPU に利用できる卵胞数が著しく増加すると報告されています<sup>17)、18)</sup>。卵母細胞に発生能を賦与する詳細なメカニズムは不明ですが、*Bos taurus* の経産牛において、卵子が直径 110 microm に達すると成熟能力が 40% から 80% に増加し、これは直径 3 mm 以上の卵胞サイズと関連していることが観察されています<sup>19)</sup>。言い換えると、3 mm 未満の卵胞から採取した卵子でも 40% が胚まで発育できたことを示しています。

直径 10 mm 以上の卵胞からの COC は膨張していることが多く、一般に回収率は低くなります<sup>20)、21)</sup>。直径 4~10 mm の卵胞から採取した卵子は、一般的に胚への発育能が高いですが<sup>15)、22)</sup>、OPU 実施時において特定の卵胞が成長期にあるか、あるいは初期または閉鎖退行期にあるかは不明である点には注意しておく必要があります。COC の質を向上させるために、この 4~10 mm サイズのカテゴリーで活発に成長期にある卵胞数が最大になるようにドナーの発情周期を操作することも検討されています<sup>23)、24)、25)</sup>。

OPU の 72 時間前に 0.5% ヒアルロン酸で希釈したブタ由来 FSH (pFSH) を 1 回筋肉内 (im) 投与する試験が肉牛および乳牛で報告されており、



卵子回収率および胚盤胞生産数は、FSH 投与により増加しました<sup>26)</sup>。Vieira ら<sup>27)</sup>は、ホルスタイン経産牛 (n = 90) に OPU の 72 時間前から 200 mg の pFSH を 2 日間にわたり 4 回に分けて筋肉内投与するか、200~300 mg の pFSH を 0.5% ヒアルロン酸とともに単回筋肉内投与したところ (図 IV-2)、pFSH 処理群間に差はなかったものの、いずれも無処置対照群と比較して OPU1 回あたりの COC および胚盤胞数が多くなったと報告しています。しかし、200 mg の pFSH を単回投与した場合は、300 mg の pFSH を投与した場合よりも OPU セッションあたりの COC 数 (200 mg : 15.6±1.7, 300 mg : 11.4±1.2) および胚盤胞生産数 (200 mg : 4.7±0.7, 300 mg : 3.1±0.6) が多かったことが観察されています。このように、pFSH の投与量を 200 mg から 300 mg に増やしても吸引卵胞数には影響しませんが、卵子の品質と胚盤胞の生産には悪影響を及ぼす可能性が唆されています。末梢血中 FSH 濃度は pFSH 200 mg 投与後 6~12 時間で 1.5 ng/mL のピークに達し、約 36 時間後までに基底値まで戻ったものの、300 mg 投与では、末梢血中 FSH 濃度のピークレベルは 2.5 ng/mL と約 2 倍になりました。末梢血中 FSH 濃度のピークレベルの増加が高品質の卵子数減少と関連している

のではないかと考えられています。

週 2 回の OPU プログラムでは、OPU 間隔が 2~3 日と非常に短いため、ドナーに対する処置はシンプルなプログラムとなります。直径 4~10 mm の卵胞を増加させる目的で、OPU 実施の 2 日前に FSH を単回あるいは 2 日間投与する方法が用いられることが多いです。特定の期間中に最大数の生存可能胚を生産するために最も一般的に使用されるプロトコールは、ドナーが FSH およびその他のホルモン処置で 2 週間毎に OPU を受ける場合です。プロジェテロン処置を受け、機能性黄体がない場合、ドナーは卵胞吸引、エストラジオール製剤または GnRH 製剤によって主席卵胞が除去され、OPU 前の 2.5~3 日間、FSH の漸減投与法により小さな卵胞から構成される卵胞群形成を促します。さらに、最後の FSH 投与と OPU の間に 2~2.5 日の時間を空けることで卵胞をそのまま発育させ続けると、卵母細胞が初期の閉鎖過程に入り、これが成熟の第一段階を模倣する形で卵母細胞の発育能を高め、その結果、体外胚生産率が向上するといわれています<sup>28), 29), 30)</sup>。

FSH の血中での半減期は 2 時間と報告されていますが<sup>31)</sup>、頻回投与で卵胞発育を刺激されるドナーは、時間の経過とともに反応性が低下すること

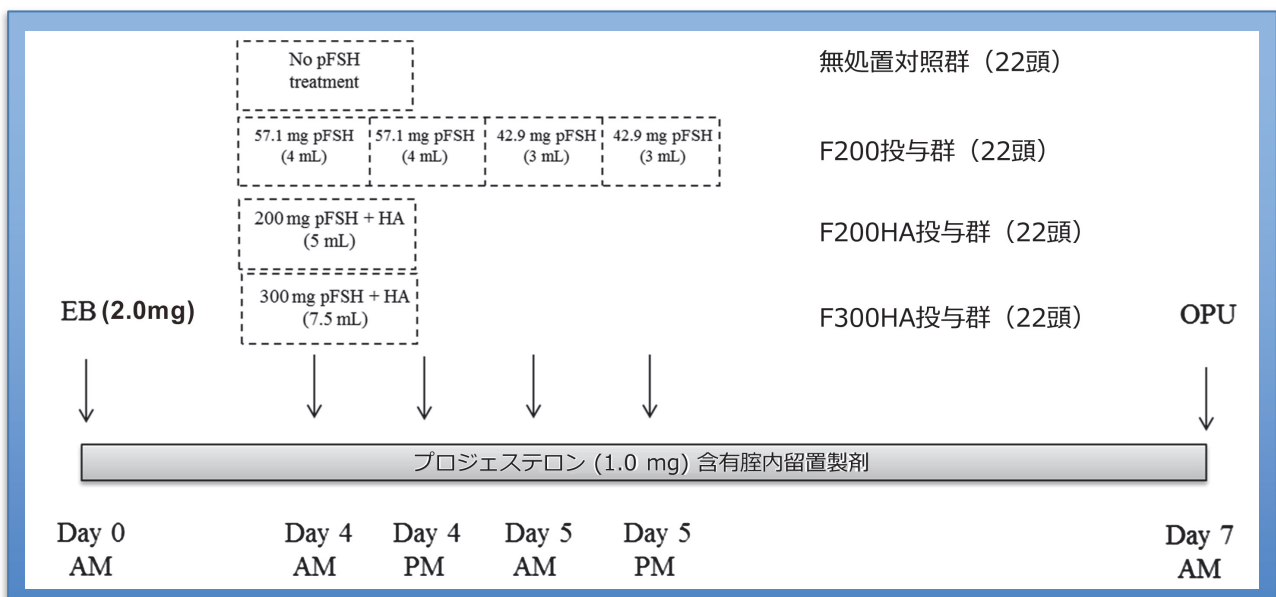


図 IV-2. 非泌乳のホルスタイン牛を 4 群に分け、OPU 後の体外胚を生産した (Vieira ら, 2016)  
 供試牛は無処置コントロール (Control, n=22)、200 mg の pFSH を 1 日 2 回筋肉内投与 (F200, n=23)、200 mg または 300 mg の pFSH と 0.5% ヒアルロン酸溶液を筋肉内投与した (F200 HA, n=22 ; F300 HA, n=23)。  
 EB : 安息香酸エストラジオール、pFSH : ブタ卵胞刺激ホルモン、HA : 0.5% ヒアルロン酸

もあり、豚由来と羊由来の FSH を交互に使用することが有効であるともいわれています<sup>7)</sup>。ヒアルロン酸で調整した FSH のように長時間作用する FSH 製剤<sup>27),32)</sup> は、OPU の頻度が少ないドナーには有益かもしれませんが、繰り返し行う場合には抗体産生の懸念のため、留意する必要があります。同様に、Sakaguchi らによる報告<sup>33)</sup> では、FSH による単回の硬膜外投与により卵胞発育が効果的に刺激されるとのことでありますが、同一ドナーに頻繁に投与すると効果が薄れることも示されています。

## (2) ウマ絨毛性性線刺激ホルモンによる多排卵処置

性腺刺激ホルモンによるアプローチのうち、ウマ絨毛性性線刺激ホルモン (eCG) は、卵胞発育を促進し、吸引に適した卵胞数を増やすために使用されています。eCG は、卵胞刺激ホルモン (FSH) および黄体形成ホルモン (LH) の受容体を刺激し、長い半減期 (約 48~72 時間) を有することが知られています<sup>34)</sup>。これまでの研究で、OPU 前に eCG を使用することにより、中型・大型卵胞の割合が増加、排卵率が向上して卵子の生存率が高くなることが報告されています<sup>35),36)</sup>。しかながら、eCG で刺激した個体から得られた卵子の品質を、形態学的側面から評価した場合、その有効性に関する結果はさまざまです<sup>9),11),35),36)</sup>。Sendag ら<sup>9)</sup> は、FSH と eCG を比較した場合、卵巢の反応および卵子のクオリティともに、FSH の方が良かったと結論付けています。さらに、eCG 製剤を用いる場合におけるもう一つの問題は、このホルモンが長い半減期を持ち、ドナーが抗体を産生すると、以降の同様の処置が効果的でなくなる可能性があることです。

## (3) エストロジェン製剤による多排卵処置

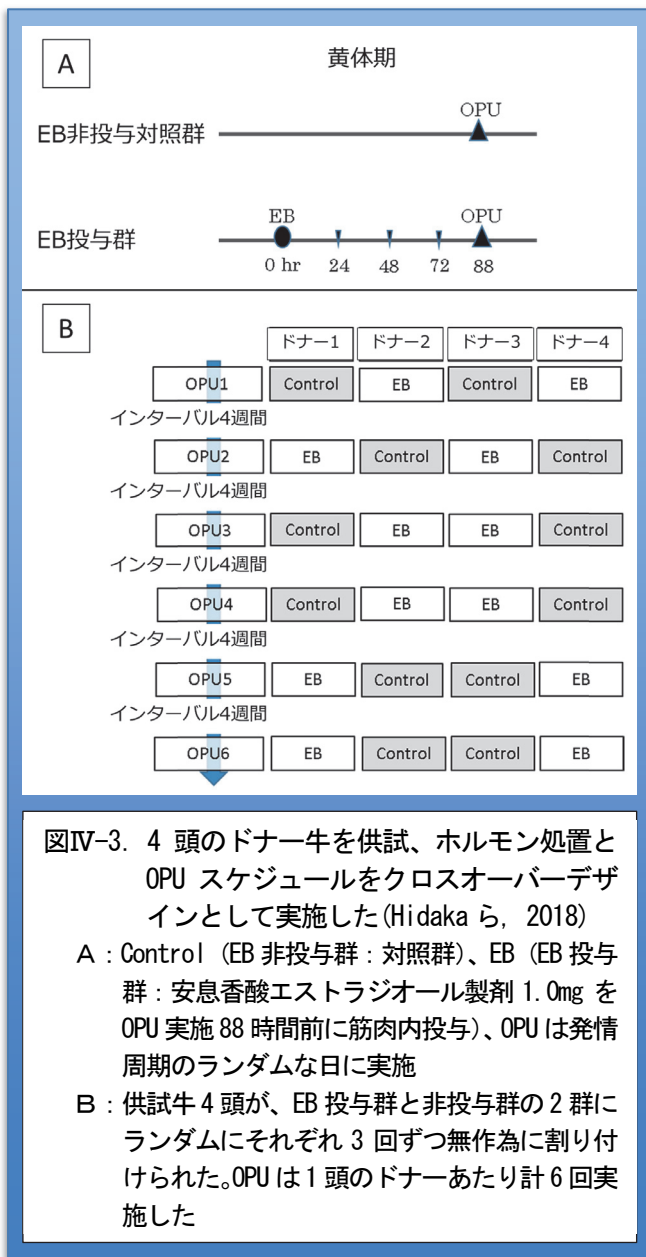
Hidaka ら<sup>25)</sup> は黒毛和種経産牛の黄体期に安息香酸エストラジオール製剤 1 mg を投与後 88 時間に OPU を 12 回実施したところ (図IV-3)、無処置の場合の 12 回と比較して、吸引卵胞数 (OPU 1

セッションあたり平均  $27.8 \pm 1.8$  個から  $36.6 \pm 3.0$  個へ)、回収 COC 数 ( $21.8 \pm 1.4$  個から  $28.9 \pm 2.9$  個へ)、培養 COC 数 ( $15.0 \pm 1.1$  個から  $23.4 \pm 2.4$  個へ)、胚盤胞率 (34.4%から 50.5%へ)、移植可能胚率 (15.6%から 32.7%へ) ともに有意に増加したと報告しています。

## 3. まとめ

牛の OPU は体内生産胚の回収と違い、発情周期のステージに関係なく実施できることが利点の一つですが、多排卵処置によってより多くの卵胞が吸引できるとすれば魅力的です。一方で、1 回の OPU により得られる吸引卵胞数よりも最終的に移植可能な胚がいくつ生産できるかという点の方が重要です。これまでの試験研究により、未經産牛においては FSH により中型サイズの卵胞吸引数が増えるものの、経産牛では差が認められなかったとする報告もあります。ただ、FSH 刺激は OPU で吸引可能な卵胞数を増加させるというメリットよりも、卵子の発生能、すなわち胚盤胞までの発育率を向上させるのに有効であることを示唆する結果が報告されています。FSH による卵胞刺激において複数回の投与が一般的ですが、最近の研究では 0.5%ヒアルロン酸との併用や硬膜外投与により FSH 製剤の投与を単回で済ませられる方法も報告されています。ただし、これらの方法は OPU の実施頻度により有効性が左右される可能性がある点にも留意する必要があります。





[参考文献]

1. Bó GA, Mapletoft RJ. 2020. Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology* 150: 353-9.
2. Baruselli PS, Batista EOS, Viera LM, Ferreira RM, Guerreiro BG, Bayeux BM, Sales JNS, Souza AH, Gimenes LU. 2016. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Anim Reprod* 13: 267-72.
3. Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53: 11-20.

4. Luciano AM, Sirard MA. 2018. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. *Biol Reprod* 98: 162-9.
5. Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61: 329-35.
6. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65: 126-36.
7. Fry RC. 2020. Gonadotropin priming before OPU: What are the benefits in cows and calves? *Theriogenology* 150: 236-40.
8. Goodhand KL, Watt RG, Stainer ME, Hutchinson JSM, Broadbent JP. 1999. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* 51: 951-61.
9. Sendag S, Cetin Y, Alan M, Hadelier KG, Niemann H. 2008. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 106: 208-14.
10. Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Moreira RJC, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2004. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* 82: 318-24.
11. Ongaratto F, Rodriguez Villamil P, Tribulo A, Bo GA. 2015. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complexes obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. *Anim Reprod* 12: 876-83.
12. Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Freitas BG, Bragança LGM, Marques KNG, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2015. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology* 84: 1-10.
13. Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Nunes Dode MA. 2009. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev* 21: 655-64.
14. Monteiro FM, Ferreira MM, Potiens JR, Eberhardt BG, Trinca LA, Barros CM. 2010.

- Influence of superovulatory protocols on in vitro production of nellore (*Bos indicus*) embryos. *Reprod Domest Anim* 45: 860-4.
15. Viera LM, Rodrigues CA, Castro Nette A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Moreira RJC, Sa Filho MF, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* 82: 318-24.
  16. Driancourt MA. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-39.
  17. Findlay JK, Drummond AE, Fry RC. 1996. Intra-ovarian regulation of follicular development and ovulation. *Anim Reprod Sci* 42: 321-31.
  18. Taneja M, Bols PEJ, Van de Velde A, Ju J-C, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X. 2000. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 62: 206-13.
  19. Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42: 437-42.
  20. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-62.
  21. Seneda MM, Esper CR, Andrade ER, Binelli M, Max MC, Oliveira JA, Garcia JM. 2005. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. *Anim Reprod* 2: 178-82.
  22. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Mol Reprod Dev* 37: 48-53.
  23. Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 66: 38-43.
  24. Gimenes LU, Ferraz ML, Fantinato-Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Sá Filho MF, Meirelles FV, Trinca LA, Rennó FP, Watanabe YF, Baruselli PS. 2015. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology* 83: 389-93.
  25. Hidaka T, Fukumoto Y, Yamamoto Y, Ogata Y, Horiuchi T. 2018. Estradiol benzoate treatment before oocyte pick-up increases the number of good quality oocytes retrieved and improves the production of transferable embryos in Japanese black cattle. *Vet Anim Sci* 5: 1-6.
  26. Ongaratto FL, Tribulo A, Ramos M, Rodriguez P, Bo GA. 2011. Oocyte recovery rates and in vitro blastocyst production in cattle treated with a single injection of Follitropin-V diluted in a slow-release formulation. *Reprod Fertil Dev* 23: 202-3.
  27. Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Freitas BG, Bragança LGM, Marques KNG, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2016. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology* 85: 877-86.
  28. Salamone DF, Adams GP, Mapletoft RJ. 1999. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology* 52: 549-61.
  29. Sirard MA. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55: 1241-54.
  30. Nivet AL, Brunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. 2012. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 143: 165-71.
  31. Fry RC, Cahill LP, Cummins JT, Bindon BM, Piper LR, Clarke IJ. 1987. The half-life of follicle-stimulating hormone in ovary-intact and ovariectomized booroola and control merino ewes. *J Reprod Fertil* 81: 611-5.
  32. Bo G, Rogan DR, Mapletoft RJ. 2018. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: what we have learned. *Theriogenology* 112: 26-33.
  33. Sakaguchi K, Ideta A, Yanagawa Y, Nagano M, Katagiri S, Konishi M. 2018. Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black cows. *J Reprod Dev* 64: 451-5.
  34. Combarrous Y, Mariot J, Relav L, Nguyen TMD, Klett D. 2019. Choice of protocol for the in vivo bioassay of equine Chorionic Gonadotropin (eCG / PMSG) in immature female rats. *Theriogenology* 130: 99-102.

35. Aller JF, Mucci NC, Kaiser GG, Callejas SS, Alberio RH. 2012. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. *Anim Reprod Sci* 133: 10-5.
36. Ribas BN, Missio D, Roman IJ, Neto NA, Junior IC, Brum DDS, Leivas FG. 2018. Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. *Anim Reprod Sci* 195: 284-90.

## V. 卵子の吸引

経膈採卵（OPU）による卵子の吸引と体外胚生産技術（IVP）は新しい胚生産技術としてハードおよびソフトの両面からシステムが構築され、海外では移植胚のうち70%以上を占めるようになりました。OPUについては超音波画像検査装置の改良、吸引装置および採卵針の開発などを経て、ここ20年で大きく進歩し、術者に優しい技術へと変貌しました。また、IVPに関してはIVPに用いる溶液のほとんどが既製品として販売されており、培養液の作製などの手間が掛からなくなるとともに、製品の均一化が図られ、IVP成績の向上に貢献しています。そのため、多くの技術者および企業が参入し、事業を立ち上げています。

しかし、OPUについては機器がいくら進歩しても供卵牛の完全な保定、衛生的な卵子の吸引操作なしでは卵子の採取率および胚盤胞への発生率が低下する可能性があります。本章ではOPUによる卵子の吸引採取方法について解説します。

### 1. 卵子吸引前の準備

#### （1）供卵牛の保定

卵子を吸引採取するときは柵場に供卵牛を入れて保定します。この場合、体内胚の採卵時と同じように台を置くなどして前足を少し高くすると、卵巢を無理なくプローブへ誘導できます。供卵牛が足踏みしたり、尻を左右に振ったりしないために柵場内にスペースを作らないことが重要です。そのため、柵場の横にタイヤやマットを入れることがあります。また、家畜改良センター岩手牧場では図V-1のような、柵場の片側の側面を可動式にして牛の動きを封じることのできる柵場を開発して使用しています。さらに、販売されている柵場などでは下腹を持ち上げるベルトなどが付いており、ベ

ルトを装着することでこれらの動きを少なくすることも可能です。

一方、OPU前にキシラジンなどの鎮静剤を投与することで牛の動きをある程度抑制することが可能です。しかしながら、キシラジンを多量に使用すると牛は柵場内で立ってられなくなり、座り込むことがあるので投与量に注意する必要があります。OPU前に成牛1頭あたり0.5ml程度の2%キシラジン注射液を筋肉内投与すると、OPUを実施するのに十分な鎮静効果が得られます。



図V-1. OPUに有効な柵場

#### （2）除糞、尾椎硬膜外麻酔および外陰部の洗浄

直腸内に糞便が貯留していると作業の邪魔になるのでOPU前に除糞を行い、直腸の手の届く範囲の糞をすべて掻き出します。この時、最初は直腸を少し刺激して牛自ら怒責して糞をするように仕向けるとよりスムーズに除糞ができます。直腸に糞便がなくなったのを確認し、膀胱を触り尿が溜まっている場合は外陰部の下を刺激して排尿させます。これはOPUをするときに膀胱に尿が溜まり張っていると、卵巢を操作するとき膀胱に触れて牛が反応して動くことがあるためです。特にキシラジンで鎮静したときなどはキシラジンの利尿作用で尿が溜

まりやすくなります。

尾椎硬膜外麻酔の注射部位と外陰部をポビドンヨードスクラブ液（7.5%液）などで洗浄します。このときポビドンヨードスクラブ液をよく泡立てて外陰部を洗い、お湯で洗い流します。2%ポビドンヨード液を注射部位に噴霧することもあります。その後、アルコール綿花で注射部位をきれいに拭き、尾椎硬膜外麻酔を実施します。

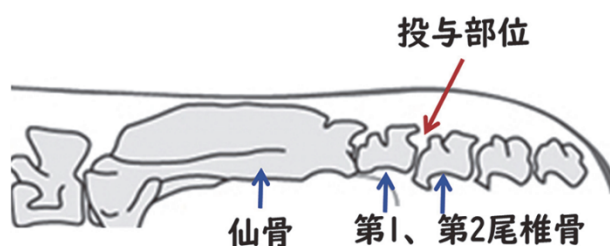


図 V-2. 尾椎硬膜外麻酔の投与部位

尾椎硬膜外麻酔は2%リドカイン3~5 mlを尾椎硬膜外に投与します。投与部位は第1尾椎骨と第2尾椎骨の間の骨のない部分（図 V-2）に針を60~75度の角度で刺していき、針が硬膜外に到達するとその部位は陰圧となっているので、スムーズに注射液が入ります。針先が正しい部位に達していないと注射器を押してもかなりの抵抗があるか、まったく注射液を注入できません。針先が正しい注射部位に到達する直前に「プツ」という少し固い膜を通る感覚があります。また、正しい位置に針先があるかを確認するためには、針から注射器を外して注射液を1~2滴だけ針に滴下します（図 V-3）。針先が正しい部位にあると注射液がそのまま吸入されていきます。これは前述したように注射部位が陰圧になっているためです。また、第1尾椎骨と第2尾椎骨の間が狭く注射部位が見つからないときは、第2尾椎骨と第3尾椎骨の間の尾椎硬膜外に投与します。一方、体格が普通の牛では骨と骨の間の凹んでいる部位に針を刺しますが、過肥の牛では骨と骨の間は脂肪が付

着して盛り上がっている場合があります。このときは盛り上がった脂肪の頂点から針を刺していくと正しい注入部位に入りやすくなります。

尾椎硬膜外麻酔が終わったら、逆性石鹼液で外陰部を洗浄し、紙タオルで外陰部の水分をふき取り、次いでアルコールに浸した綿花で外陰部と膣の入り口をきれいに拭き、ポビドンヨードスクラブ液や逆性石鹼液を拭き取り、OPUの作業に取り掛かります。

また、尾椎硬膜外麻酔が効かない牛には臭化プリフィニウム静脈投与剤（パドリニウム注として10 ml程度）を投与すると直腸が弛緩されてOPUの操作が容易になります。



図 V-3. 尾椎硬膜外麻酔の注入部位の確認

### （3）OPU 機器の準備

吸引装置、50 ml 遠沈管および OPU 用採卵針の接続は吸引をスムーズに行う上で重要です。吸引装置と採取液用 50 ml 遠沈管の間には採取液がオーバーフローしても吸引装置に直接入らないように 50 ml 遠沈管を1つ余分に接続し、50 ml の遠沈管は保温装置で30~37°Cに保温します（図 V-4）。一般的に接続は外径 5 mm、内径 3 mm のシリコンチューブで接続します。採卵針は採取液用 50 ml 遠沈管のもう1つの入り口に接続し、接続箇所はパラフィルムを巻き、接続部から空気を吸わないようにします。こ

のとき採卵針に接続されたチューブに輸液セットの開閉栓を取り付けておくと便利です(図V-5)。吸引装置はフットスイッチを必要に応じて取り付け、18~22 ml/minの液量(吸引圧は90~120 mmHg)を吸引できるように調整します。採卵針も50 ml遠沈管に接続し、吸引前に約5 mlの卵子回収液を吸引し、液の動きから吸引圧が正しいか確かめておくことが大切です(図V-6)。

卵子回収液は乳酸加リンゲル液またはDPBSに1%子牛血清、10 U/mlヘパリンおよび抗生物質(ペニシリン:100 IU/mlおよ

びストレプトマイシン:100 µg/ml)を添加した液を用います(表V-1)。ヘパリンは血液および卵胞液中のフィブリノーゲンの凝固を防ぐために入れます。

超音波画像検査装置にはOPU用プローブを取り付け、プローブカバーを取り付けます。プローブカバーは日本で入手できるものはヒト用のプローブに装着するためのもので、長さが短い欠点があります。ウシ用のプローブカバーは海外で販売されているものを個人で購入および輸入する必要があります。



図V-4. 吸引装置(下)と保温装置(上)および2つ並列した遠沈管



図V-5. 輸液セットの開閉栓を付けた採卵針からのライン



図V-6. 採卵針およびその接続チューブへの卵子回収液の吸引

表V-1. 卵子回収液を100ml作製する場合

溶液および試薬	容量	単位
乳酸加リンゲル液*	98	ml
子牛血清	1	ml
ヘパリン(1000U/ml)液	1	ml
ペニシリン	10,000	IU
ストレプトマイシン	10	mg

\*基礎培地をDPBSにするとき、容量は変わらずここがDPBSとなる

## 2. OPUによる卵子の吸引

### (1) プローブの挿入および卵巣の観察

プローブの先にエコーゼリーを塗り、膣に挿入します。まず、卵巣にある卵胞を把握するため卵巣の観察を行います。

プローブに卵巣を押し当て、卵巣の超音波断層像を得て、卵巣を画面の中心に映るようにし(図V-7)、卵巣をプローブ表面で滑らせるようにゆっくりスライドさせ、卵巣が消えるまでスローモーションを見るように動かします。卵巣が画面から消えるところまで映し、出ては消える卵胞を数えます。このとき、初心者は卵巣の画像が徐々に画面で右に偏ったり、左に偏ったり、画面から消えたりします。卵巣が常に中心にあることがプローブと卵巣の位置関係を把握するうえで大切です。この要領で左右の卵巣にある卵胞を数え、大卵胞および黄体の位置関係を把握します。【動画①②③】

### (2) 膣壁から卵巣への採卵針の誘導

左右卵巣の検査を終えたら、採卵針とそのラインに予め回収液を吸引して満たし、プローブに付属したガイドに入れ、プローブを頸管外口上部の膣壁に誘導します。直腸に入れた手で卵巣をプローブ先端に誘導し、超音波検査装置の画面に卵巣を映し出します。この画面に映る卵巣が最大のところまで卵巣を保定し、膣壁を貫いて卵巣へ採

卵針を刺します【動画④】。このとき、膣壁と採卵針の角度は90度(垂直)になるように向けて、採卵針を刺しますが、これは膣壁を斜めに針が抜けると、膣壁から採卵針を左右上下に引っ張る力が働き、針の前後の動きがスムーズではなくなるためです。

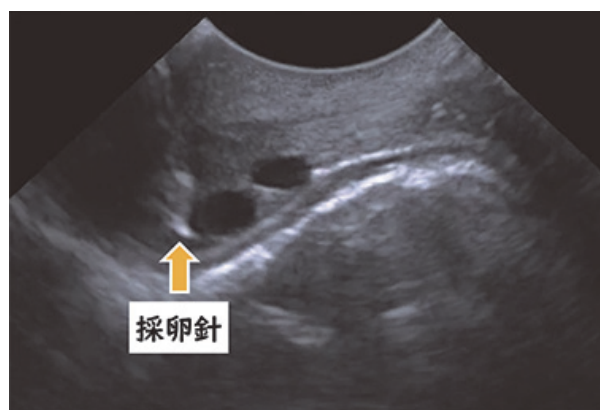
【動画⑤】垂直に針を刺すときに卵巣に大卵胞や黄体が存在するときは、これらを穿刺しないように少しだけずらして穿刺することで、採卵針が膣壁を抜け、卵巣にたどり着くこととなります。採卵針が抜けるとき膣壁が圧されるため一旦画像は真っ暗となりますが、膣壁を抜けたところで鮮明な画像になり、針先が画像で確認できます(図V-8)。一度、膣壁を抜けた針先は卵胞を吸引している間は腹腔内に留め、膣内に戻さず、針を引いても針先を腹腔内に留めることが重要です。

### (3) 卵胞の穿刺

卵胞を採卵針で吸引するときにはガイドラインを表示させます。採卵針はガイドライン上しか移動しないため、卵胞をガイドライン上に鮮明に映し(卵胞を鮮明に映すとは卵胞の中心を映すことです)、採卵針を卵胞に進め、卵胞液ごと卵子を吸引採取します。この動作を繰り返し、卵胞を吸引していきますが、図V-7の超音波画像でいうと左側の卵胞から徐々に右側へ移動しながら



図V-7. 卵胞を数えるときの卵巣の位置

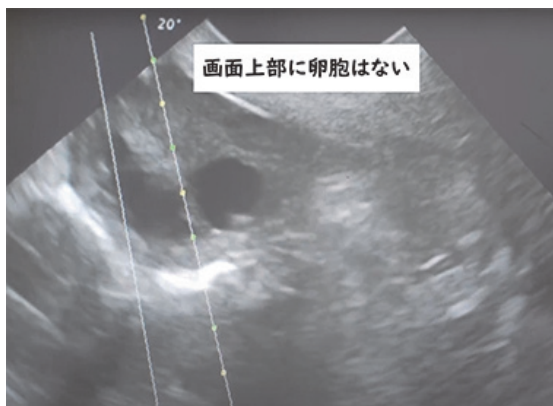


図V-8. 膣壁を貫き卵巣へ採卵針が刺さる

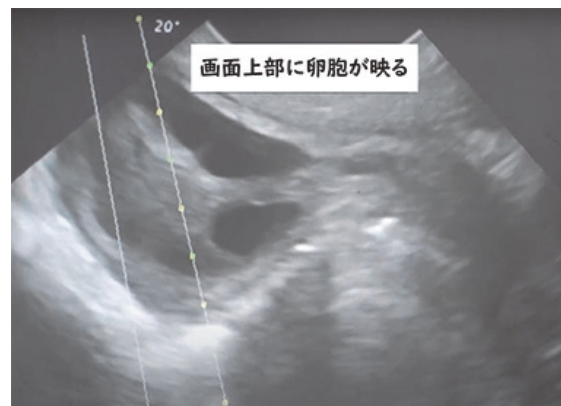
ら卵巢の上側の卵胞を吸引採取します。大卵胞がある場合は最後に吸引するために残しておきます。画面上側の卵胞を吸引採取し終わったら(図V-9)、卵巢を180度回転させて卵巢の裏面をプローブに押し当てます。そうすると図V-10のようにそれまで卵巢の下側に映っていた卵胞が画面上側に映し出されます【動画⑥】。これらの卵胞を再度ガイドライン上に鮮明に映し、1個ずつ吸引します。卵胞がガイドライン上に複数個映し出される場合は連続して吸引することができます。小中卵胞をすべて吸引した後、最後に大卵胞を吸引します。大卵胞を最後に残すのは卵巢を保定しやすくするためです。大卵胞を最初に吸引してしまうと、卵巢は小さくなって張りがなくなり保定が難しくなります。また、卵胞を吸引している間に採卵針とそのチューブ内が血液

や粘液で詰まるのを防ぐために、卵胞10個あるいは2~3分毎に1回採卵針を腹腔内から出し、回収液を吸引して洗浄します。また、助手がいる場合、助手は常にチューブ内の液の動きに注意を払い、卵胞を穿刺するごとに液が動いていることを確認します。

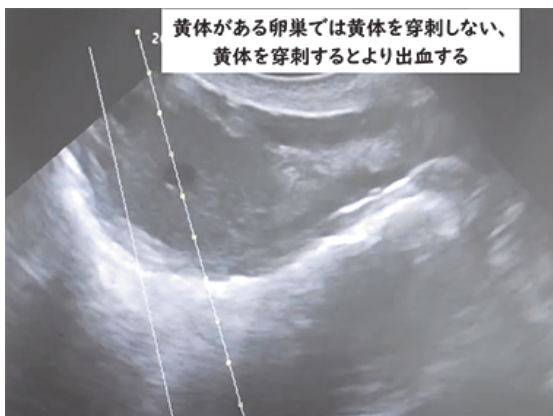
黄体のある卵巢の卵胞を吸引する場合は黄体をなるべく刺さないように気を付ける必要があります。黄体には毛細血管が多く発達しているため、容易に出血し、その血液が針およびチューブ内で凝固して、詰まる原因となりやすいため、黄体がある卵巢(図V-11)の場合は卵巢の角度を変えるなどして画像に黄体が映らないよう卵巢にプローブを当て、卵胞を吸引採取します(図V-12)。



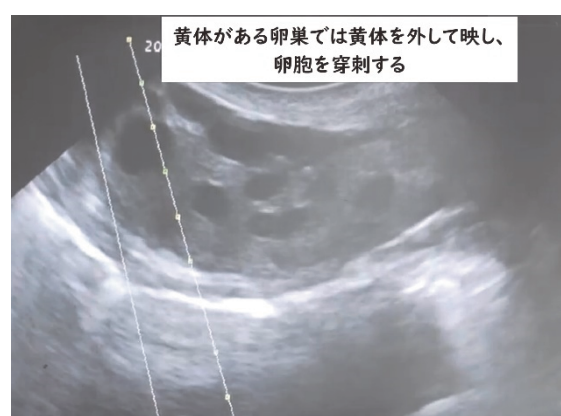
図V-9. 上半分の卵胞吸引が終わった卵巢



図V-10. 図V-9の卵巢を180度回転した卵巢の超音波断層図【動画⑥】



図V-11. 黄体のある卵巢



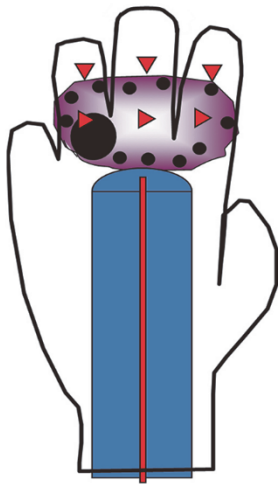
図V-12. 黄体を外して映した卵巢の超音波断層図(図V-11と同じ卵巢)



#### (4) 卵胞吸引の考え方

基本的な卵胞吸引の考え方を以下に箇条書きで示します。これは著者個人の考え方をまとめたものであり、必ずしも守らなければならないことではありません。

- ①卵胞を穿刺するとき、針先に近い卵胞は簡単に吸引できますが、針から遠い卵胞（針を深く刺す場合）は難しくなります。
- ②特に小卵胞を穿刺するときは、まず針先をその卵胞の近くまで進め、卵胞の輪郭が鮮明になるように映し（卵胞の中心に針が刺さりやすくなります）、針の移動する距離をなるべく短くすると穿刺しやすくなります。
- ③卵巣の保定が重要であり、卵巣靭帯の端を親指と人差し指でつまみ、中指と薬指で卵巣靭帯の卵巣側をプローブに押し当て、親指と小指でプローブの側面を押さえ、卵巣を指先で触ることなくプローブに当てます（決して強く当てすぎない：図V-13）。



手のひら全体で保持

黄体がある卵巣では黄体を外して映し、卵胞を穿刺する

図V-13. 卵巣の保定方法

- ④また、卵巣は人差し指、中指および薬指の第一関節から第二関節の間で支えます。

- ⑤針を刺していく面と反対側に④の指がないと卵巣の保定は難しくなります。
- ⑥大卵胞または黄体があると卵巣は保定しやすいです。
- ⑦一方、大卵胞の吸引後は卵巣の保定が難しく、大卵胞の側面にある小卵胞などはほとんど吸引できなくなります。そのため、できる限り小卵胞から吸引します。
- ⑧画面左側の端の卵胞を穿刺するとき、採卵針の角度から針が刺さらないで卵巣表面を滑ることがあります。このときは、卵巣の角度を変え、まず針先を卵巣に刺し、目的の卵胞を鮮明に映し、針を卵胞へ誘導します。
- ⑨採卵針とガイドには隙間があり、針は中心から逸れることが当たり前です。そのため、画像では卵胞に針が入っているように見えても実際は卵胞に刺さっていないことがよくあります。この場合は少し針を戻して角度を少し上下左右の4方向に変えて刺すと、いずれかの方向から刺すことができます。その近くにある卵胞は同じ角度に刺すとほぼ吸引できます。【動画⑦】
- ⑩画面に映っている卵巣の右側と左側で、針にかかる力が逆になるため（ガイドの左右または前後に針が偏る）、針を刺すときの感覚が変わることが多いです。
- ⑪採卵針やチューブの中に空気が入ると卵子の卵丘細胞が剥がれやすくなるため、なるべくこのチューブの中に空気を入れないようにします。
- ⑫吸引圧は常にかけおく必要があります。採卵針を洗浄するときに、針先が腹腔内にある時に吸引装置のスイッチを切ると液が針先の方にそのまま戻ってしまうことがあります。これは腹腔内が陰圧になりやすいためと考えられます。

⑬そのため、洗浄するときもスイッチは切らず輸液セットの開閉栓や鉗子を用いて一時的にチューブを閉じて液が逆流しないようにします。針先が回収液の中に入ったところで栓あるいは鉗子を開けるとチューブの中に卵子回収液が入り、空気が入りません。

## VI. 卵子の検索・選別方法

### 1. 採取液のフィルターろ過

卵子を採取した液には血液が混入しているため、そのままでは卵子を検索することができません(図VI-1)。そこで採取液は採卵の時に使う採卵フィルターを用いて採取液をろ過洗浄します。【動画⑧】

ろ過洗浄はエムコンフィルター(EmCon)またはセルコレクター(FHK)を用いて実施することが多くなっていますが、これらのフィルターによるろ過洗浄はその作業中に卵子周囲の卵丘細胞が剥がれる可能性があるため注意が必要です。

また、洗浄液には1%子牛血清を添加したDPBS、乳酸加リンゲル液などを用います。

### (1) エムコンフィルターによるろ過

採取液からの卵子の検索にはまずエムコンフィルターを通します。このフィルターは径75 μmのメッシュとなっており、直径150 μmの卵子は通過しませんが、採取液に含まれる血球および小さい細胞は通過するため、新しい洗浄液を入れることで、血液



図VI-1. 血液の混入した回収液

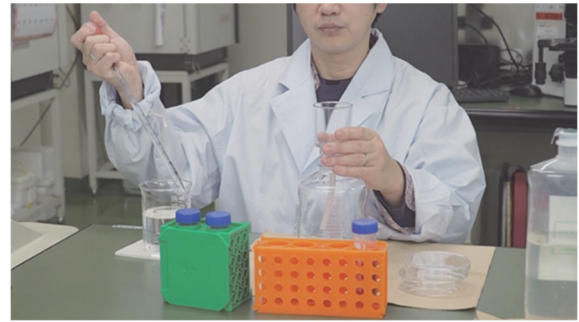
表VI-1. 卵子採取液のフィルターろ過の手順【動画⑧】

① フィルターへ洗浄液(1%CS加乳酸加リンゲル液)を10 ml入れる(図VI-2)
② 採取液をフィルターへ入れる(図VI-3)
③ 採取液の入っていた遠沈管を洗浄液で洗浄し、フィルターへゆっくり入れる(2回実施)
④ わずかに採取液が残る程度までゆっくりろ過する:ろ過の回数をできるだけ少なくするため
⑤ フィルターの壁を伝わらせて洗浄液を20 ml入れる(図VI-4)
⑥ フィルターの底や横の部分をテーブルにコンコンとあて、フィルターに付着している粘液および血餅を剥がす:卵丘細胞剥離の原因となるため、ピペッティングは厳禁【動画⑨】
⑦ (④⑤⑥)の作業を採取液が透明になるまで繰り返す(図VI-5)
⑧ 回収液が透明になったら90~100 mmのシャーレに移す(図VI-6)
⑨ フィルター(メッシュ部分)に粘液および血餅の付着がないかを確認し、洗浄液を20 ml入れる
⑩ 粘液および血餅の付着部分をピペットでゆっくり吸引してメッシュから剥がす
⑪ ろ過した後、10 ml洗浄液を入れ、⑥の要領で粘液と血餅を剥がしたのち、⑧のシャーレに移す
⑫ 最後に10 mlの洗浄液をフィルターに入れ、ピペッティングにより、残っているメッシュへの付着物を剥がし、液を⑧のシャーレに移す
⑬ 大きな血液の塊がある場合は⑤の時点で遠沈管にそれらを回収し、それらをほぐし(ピペッティングあるいはハサミで細切)、⑫が終了後のフィルターでろ過する【動画⑩】
⑭ 90~100 mmのシャーレに移された採取液(図VI-7)を検索して卵子を回収する

を含む赤い採取液が透明になります。

フィルターろ過の手順を表VI-1に示しましたが、特に、エムコンフィルターを用いるときは洗浄液を注入するとき、および排出するときにフィルター上で卵子が回転することで卵丘細胞が剥がれることが考えられます。

そのため、洗浄液はフィルターの側壁を伝わせるようにゆっくりと注入する必要があります(図VI-4)。洗浄液の注入後にろ過を行いますが、ここでもゆっくりと液をろ過排出します。この操作を採取液が透明になるまで繰り返します。通常3~4回のろ過で赤血球はなくなり、採取液は透明になります(図VI-5)。採取液が透明になったらフィルターの側面および底面を実験台にコンコンと当てて振動させ、フィルターから卵子、夾雑物および粘液などを浮遊させ、90~100 mmの底面にマス目を入れた検索用シャーレに移します(図VI-6)。このときに、フィルターに粘液や血餅などの付着がないかをチェックします。次いで約20 mlの洗浄液を入れ、ピペットに液を吸引することにより粘液や血餅をフィルターから剥がし、ピペットに吸引した液が側面を伝わるようにフィルター内へ戻します。この作業を繰り返してフィルターから粘液や血餅を剥がし、採取液を検索用シャーレに移します。最後に10 mlの洗浄液をフィルターへ入れ、フィルターをよくピペッティングし、検索用シャーレに液を移して(図VI-7)、フィルターによるろ過洗浄が終了します。この検索用シャーレを実体顕微鏡(10~20倍)で1マスずつ卵子を検索していき、10%子牛血清添加DPBSを入れた35 mmシャーレに卵子を集めます。フィルター内でピペッティングをすると卵丘細胞が剥離するため、なるべくピペッティングは行わないようにします。また、採取した卵子の透明帯は柔らかいため、体内受精胚と同様にピペッテ



図VI-2. エムコンフィルターを用いた採取液のろ過



図VI-3. フィルターへ採取液を移す



図VI-4. フィルター側面を伝わせ洗浄液を入れる



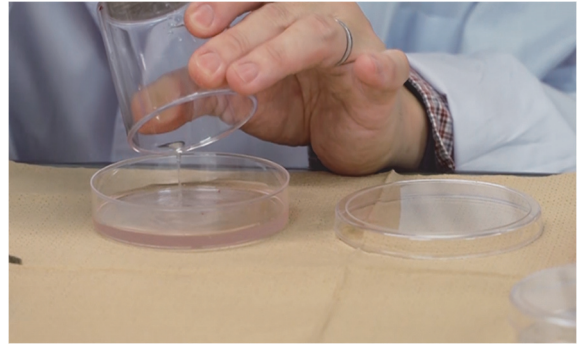
図VI-5. 透明になった採取液

イングすると卵丘細胞が剥がれるだけでなく卵子は壊れ、結果として採取卵子が少なくなります。そのため、上記のような慎重な操作が必要となります。

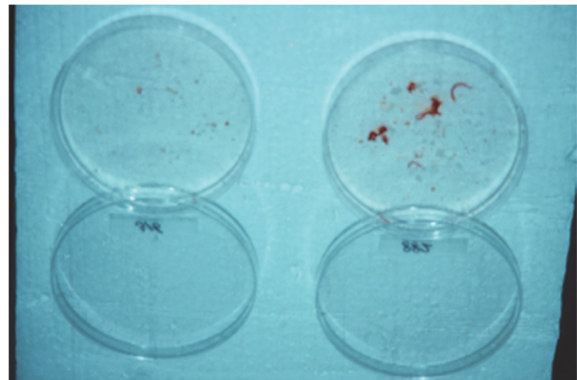
## (2) Easy Strainer によるろ過

最近では採取液のろ過に Easy Strainer (Grainer) (図VI-8)を使う場合もあります。この場合は50mlの遠沈管に Easy Strainer をセットし、採取液を入れ、ろ過します。Easy Strainer を遠沈管から外し、壁面を伝わらせて洗浄液をゆっくり入れ、採取液や Easy Strainer のメッシュ面に血液がなくなるまで洗浄液をゆっくり入れます。次いで90～100 mm シャーレの上で Easy Strainer をひっくり返し、メッシュの裏面に注射器で洗浄液を吹きかけ、メッシュに付着している卵子を夾雑物や粘液とともに剥し、90～100 mm シャーレに入れます。最後にメッシュ面に夾雑物や粘液の付着がないか確認します。

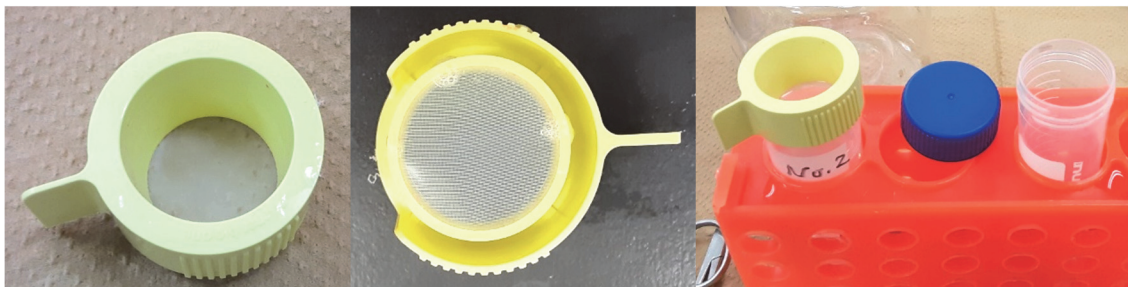
卵子の吸引数が多いときや、発情卵胞を吸引したときはメッシュが詰まる可能性が高いため、それらの場合はエムコンフィルターを使った方が無難です。また、メッシュが詰まった場合は50 ml 遠沈管の口にメッシュを擦りつけることで液の排出を促します。



図VI-6. ろ過の終了した採取液を90～100 mmのシャーレへ移す



図VI-7. シャーレに移された採取液



図VI-8. Easy Strainer を用いた採取液のろ過

## 2. OPU で採取した卵子の検索

卵子の検索は体内胚の検索と同様に実体顕微鏡を用い、10～20 倍の倍率で実施します（図VI-9）。体内胚の検索では透明帯を見つけるために、透明帯が実体顕微鏡でキラキラと輝くように反射鏡を調節しますが、卵子の検索では高品質な卵子ほど透明帯に卵丘細胞が付着しているため透明帯は直接見えません。そのため、反射鏡の調節は明暗がはっきりするように調整します。なお、実体顕微鏡の調整の方法を表VI-2にまとめたので参考にしてください。

90～100 mm のシャーレにマス目（約 10 mm 間隔）を付け、マス目 1 個ずつを確実に検索します（図VI-10）。検索棒あるいは卵子吸引用ピペットを用いて夾雑物を退けながら卵子を探します。1 回目の検索が終わったら、検索棒あるいはゴム球を付けたパスツールピペットでよく攪拌して再度検索します。卵子の検索については検索棒を使った攪拌よりパスツールピペットによるピペッティングの効果が高いと考えられます。シャーレを傾け、血餅などを吸い込み、ほぐすようにピペッティングをします。なるべくピペットの中ですべての夾雑物が入るようにピペッティングを実施します。卵子は夾雑物や血餅に付着していることが多く、ピペッティングにより剥がれると考えられます【動画⑪】。その後、再度 1 マスずつ卵子の検索をします。1 名が 2 回、2 名が見終わるとそのシャーレの検索は終了となります。

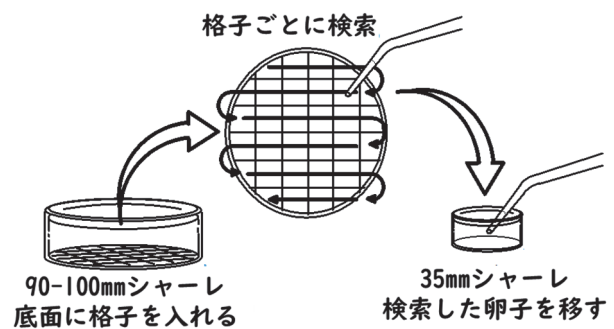
表VI-2. 実体顕微鏡の視度調整

① 実体顕微鏡の電源を入れる
② 反射鏡の角度を合わせる
③ サンプルを見ながら最大倍率にしてフォーカスを合わせる
④ 最小倍率にする
⑤ 左の接眼レンズを廻してフォーカスを合わせる
⑥ 右の接眼レンズを廻してフォーカスを合わせる
⑦ 倍率を変えてもフォーカスが合うようになり、また両目共にフォーカスが合い、観察しやすい状態になる

卵子検索の注意点としては、卵子の周りには卵丘細胞が付着しているため、直接卵子と認識できないものがあり、卵子を見落とす原因となります。著者の経験では体内胚の検索に慣れた技術者は卵丘細胞の剥がれた卵子の検索はできますが、卵丘細胞に多く包まれた卵子を見落とす技術者が多いです。特に初心者は卵丘細胞の形状を理解・確認し、そのような形状の細胞塊があった場合、その塊を裏返すと卵子細胞質が見える場合が多いので、必ず裏返すという作業



図VI-9. 実体顕微鏡によるろ過した回収液から卵子の検索



図VI-10. 卵子の検索方法と卵子の回収

を行うことで、卵子の見落としが少なくなると思います。また、シャーレの中の上澄み液を除去することで検索がしやすくなります。【動画⑫】

検索した卵子は DPBS に 10% 子牛血清を添加した保存液を入れた 35 mm シャーレに集め、この液でよく洗浄した後、卵子の評価をして成熟培養します。【動画⑬】

また、夾雑物が極端に多い場合は、パストールピペットによるピペッティングは卵子の卵丘細胞を剥離させる可能性が高いため、最終の手段として使うことをお勧めします。

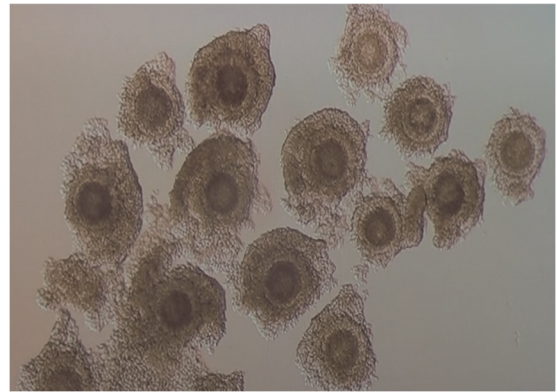
### 3. 採取した卵子の鑑別

一般的に卵子の鑑別は卵丘細胞の付着状況、卵子細胞質の均一性および卵子の直径により分類されています。【動画⑭】

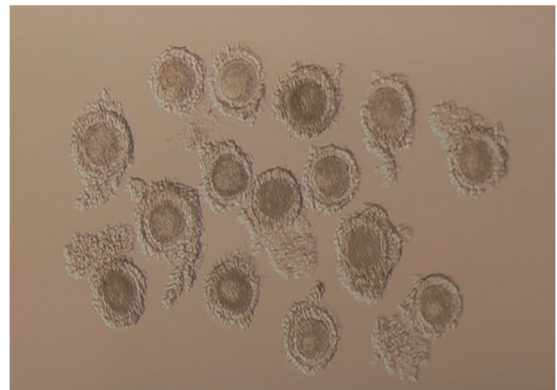
図 VI-11 に卵丘細胞の付着による卵子の分類を示しました。A ランクは卵丘細胞が 3 層以上、かつ透明帯周囲全体に付着している卵子。B ランクは卵丘細胞が 2 層以下または透明帯周囲に 1/3 以上付着している卵子。C ランクは完全な裸化卵子または B ランクより卵丘細胞の付着が少ない卵子。D ランクは卵丘細胞が膨化しているか蜘蛛の巣状に変性している卵子となります。

また、この他に図 VI-12 に示すような変性した卵子も回収されることがあります。細胞膜が消失した卵子および細胞質が委縮した卵子は、いずれも閉鎖に向かっている卵胞から採取されたものです。また、直径が小さく成長途上の卵胞から採取された卵子は細胞質がまだ薄く、透明帯が損傷しやすいという特徴があります。これらの卵子と D ランクの卵子は培養してもほとんど胚盤胞への発生が望めないため、成熟培養しないで廃棄します。

なお、D ランクの中で卵丘細胞の膨化の程度が低い卵子は膨化した細胞を取り除き、



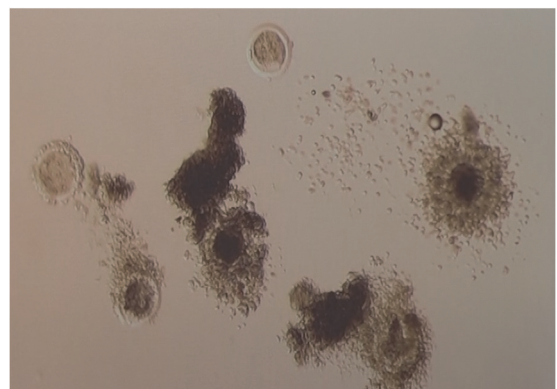
A ランク



B ランク



C ランク



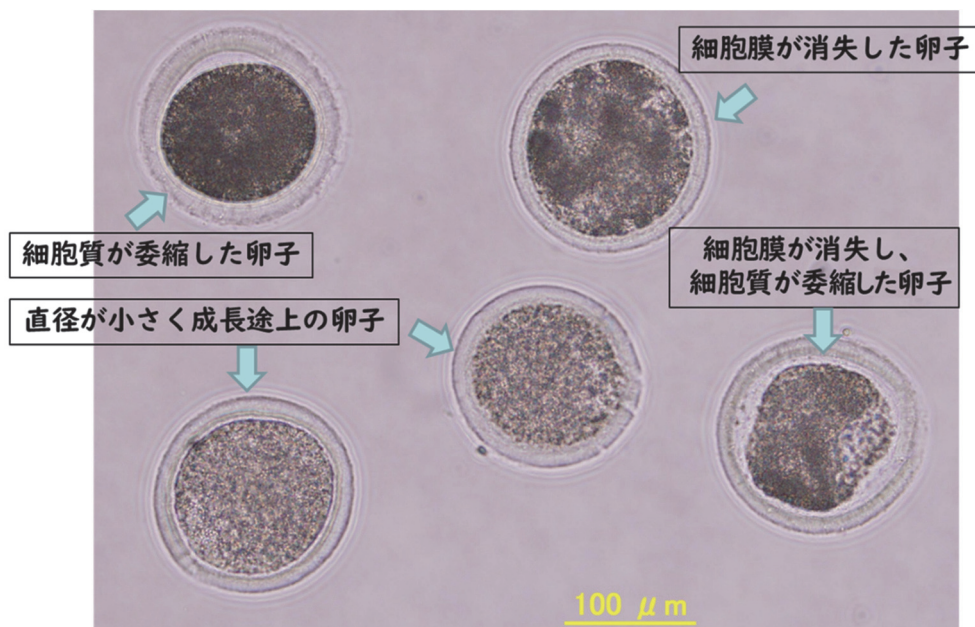
D ランク

図 VI-11. 卵丘細胞の付着による卵子の分類【動画⑭】

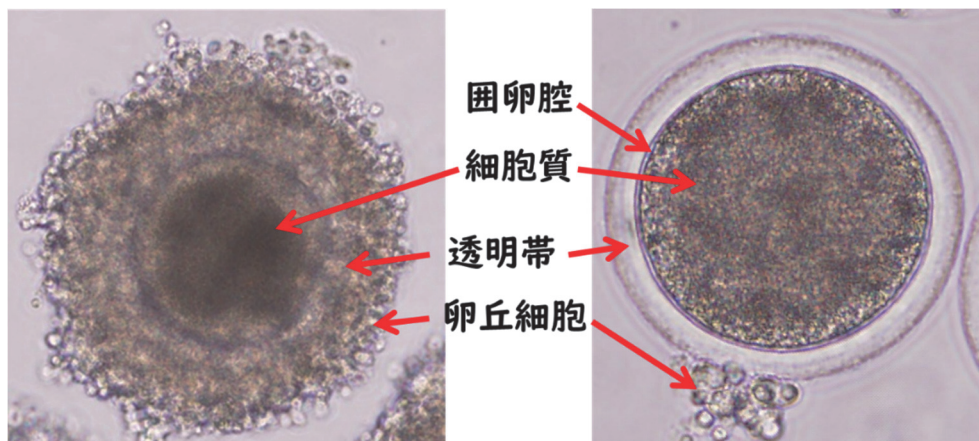
成熟培養に供す卵子もあります。

卵巣より OPU を用いて採取した卵子の構造について図VI-13 に示しました。品質が高い卵子は卵丘細胞が密に複数層付着しており、細胞質は均一です。また、圍卵腔は狭く、細胞質と透明帯が接しているように見えます。直径は 115~125  $\mu\text{m}$  で核は細胞質に多くの脂肪小滴が存在するために見えませんが、本来、細胞質は均一ですが、均一でない卵子が採取される場合があります。卵子の細胞質がサッカーボール状に白い部

分と黒い部分に分かれているもので（図VI-12 の細胞膜が消失した卵子がそれに当たる）、これらの原因はよく分かっていませんが、脂肪小滴やミトコンドリアがクラスターを形成している可能性が考えられます。著者の個人的な見解としてこの場合、卵子の成熟培養中にミトコンドリアや表層顆粒の再配置により、不均一な部分が緩和された場合は特に問題ありませんが、成熟前と変化がない場合は発生率や正常受精率が低下すると考えています。



図VI-12. 変性した卵子



図VI-13. 採取した未成熟卵子の構造および卵丘細胞を剥がした形態



## コラム 2

### 「ピペット」

卵子・胚の移し替えや洗浄、卵子周囲に付着している卵丘細胞の除去など、一般的に卵子・胚を操作するためにはガラスピペットを用います。

基本的にガラスピペットは自作して使用しますが、ガラス管には軟質と硬質の 2 種類があります。ガスバーナーでガラス管を熱する場合、義務教育で習った外心炎と内心炎の温度の違いを踏まえ、熱する時間等の条件を見極めて作成します。

卵子の移し替えと裸化作業などの作業内容では、口径の異なるピペットを用います。ヒト不妊治療用に数種類の口径のピペットが販売されていますが、経費は掛かります。ガラスの質が変わっても、適切な口径のピペットを自由に作れる術を身につけるために、十分な練習をしておくことが大切です。

### 「ガラスを切る」

ピペット作成時に、ハート形のアンプルカッターなどを使ってピペットに不要な部分を切り離します。カッターでギコギコと何回も繰り返して傷をつける姿をよく目にしますが、1回で適切に傷をつけるだけで十分です。

さらに、細いガラス管は折るのではなく、両手で引っ張る様な感覚で切り離します。

適切な傷が付けられ、適切な力で切り離すことができれば、その断面は非常にきれいです。無理やり折れば、切り口はギザギザになってしまいます。何本かピペットを作成したら、実体顕微鏡下で確認することをお勧めします。

### 「ガラス器具について」

今では、ディスポーサブルの消耗器具類がふんだんに入手できることで、ガラス器材を使わない方もいらっしゃいますが、原材料や製品の輸入が滞ると途端に入手困難になります。面倒でも、ガラス器材一式を用意しておくのが適切だと思います。

新規に購入したガラス器具は、5%塩酸に 3 日程度浸漬してアルカリの中和処理をした後、細胞に対する低毒性の洗剤内で脱脂してから水洗、超純水で置換した後に乾燥・乾熱滅菌を行ってから使用します。この間、1 週間以上の時間を要することになります。とても時間を要し、面倒な作業ですが、ガラス器具の良否で成果は分かります。

#### 「卵丘細胞の除去（裸化処理）」

体外受精後、発生培養に至る過程で、透明帯周囲に付着している卵丘細胞を除去する操作を裸化処理といいます。培養液や培養方法により、処理の時期は異なりますが、この操作に用いるピペットは、透明帯より若干狭めの口径が適します。ただ、あまり細いと卵子自体を破裂させてしまいます。逆に太いと、裸化処理に適しません。

何回かの吸引排出を繰り返すことで裸化するのが一般的ですが、中には透明帯からなかなか外れない細胞もあります。この段階で無理やり完全に裸化しなくても、時間が経過するに従い、細胞は剥がれ落ちます。

室温下で十分な光を当て、たっぷりと時間を掛けて操作することは、その後の発生に影響を与えるリスクが大きいので、短時間での処理を心掛けましょう。【動画⑮⑯】

#### 「極体って何？」

減数分裂の際、卵子は1個の卵母細胞から卵細胞の細胞質と、成熟過程で半数の染色体が塊となって弾き出されるように排除される現象が見られます。卵細胞質から出された小体を第一極体といい、この第一極体が卵腔内に確認できれば、その卵子は成熟したと判断できる指標となります。ただ、成熟過程が終了した時点では、卵子周囲に緊密に卵丘細胞（胞状冠）が付着している状態なので、顕微鏡下では見難いです。

体外受精により精子が卵細胞質内に侵入すると、卵子は減数分裂を再開し、極体がもう一つ放出されます（第二極体）。即ち、第二極体が放出されたことが確認できれば、卵細胞質内に精子が侵入し、雌性前核の形成が行われていることの指標になります。ただし、多精子侵入が生じた場合でも同様の現象は起きますので、極体を観察しただけで正常な受精であるかどうかは、判断できかねます。【動画⑰】

## Ⅶ. 体外受精技術（採取卵子の輸送）

牛卵子の体外受精技術は、採取卵子の成熟培養、体外受精（媒精）および発生培養で構成されます。この技術の開発当初、媒精後の胚が 8 細胞期で発生を停止してしまう 8 cell block が打破できず、偽妊娠誘起家兔卵管に移植する手法が採られました。その後卵丘細胞との共培養、非共培養系へと進展してきました。

体外受精に係る手技は多種多様であり、実施機関でさまざまな工夫が加えられ、どの手法が最適であるかを判断することは困難です。また、培養液の選択や工夫も多く、マニュアルとして提示することはできませんので、一連の手法は専門書を参考にしてください。

しかし、OPU により採取した卵子-卵丘細胞複合体（以下、卵子）を自己の施設で体外受精を行う、あるいは他の施設で体外受精卵の生産を依頼する場合、共に必要となる作業工程が採取卵子の輸送です。

そこで、牛卵子の輸送について実務機関が用いている機器等を紹介します。

### 1. 卵子の成熟培養時間を知る

OPU を実施する場所は、体外受精卵の生産施設の近隣である場合と遠隔地である場合とに大別できます。採取した未成熟の卵子が第二成熟分裂中期に到達するまでの時間は、使用する培養液や培養環境などにより 21～24 時間と幅があるため、各施設の条件を基に成熟時間を把握しておくことが、卵子の輸送時間を定めるうえで必要となります。

### 2. 器材に求める条件

採取した卵子を輸送する場合、適正な温度環境を維持しながら運搬できるシステム容器、持ち運び可能なサイズ感、繰り返し

使用可能であること、輸送時の衝撃等を防ぐための外装が選べるなど、相当の機材が必要となります。

一方、卵子を輸送する容器の収納のため、内枠の設定が可能であることなども条件と考えるべきでしょう。

### 3. 航空機への搭載について

遠距離から卵子を輸送する場合、距離により陸送と航空貨物に区分されるため、求める機能が異なってきます。とくに航空貨物（もしくは手荷物としての持ち込み）は、国際的なルールに基づき設定されている航空法ならびに関係規則に従う機器でなければ搭載を拒絶されます。さらには、各航空会社の社内規則により厳しく制限される場合も考慮しなければなりません。国土交通省は、液体バッテリーの航空機への搭載は禁止していることから、輸送機器を購入する際には輸送手段等を勘案し、航空機搭載の可否をメーカーに確認することが必要となります。

### 4. 卵子の輸送機器

卵子の輸送には、恒温機能を備えた輸送器が使われていますが、現在卵子を輸送し体外受精卵の生産を行っている 2 機関が使用している器材を紹介します。

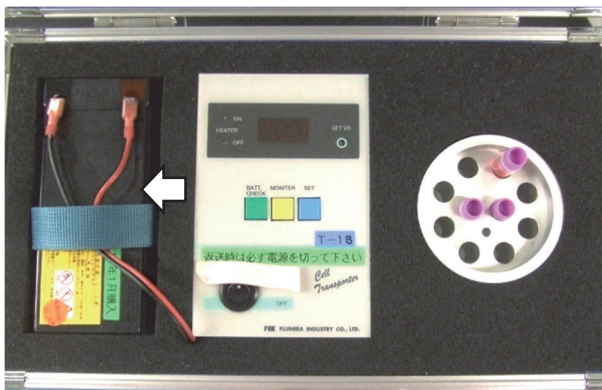
#### （1）細胞培養輸送器（富士平工業株式会社）（図Ⅶ-1）

密閉式バッテリーを動源とし、卵子および胚を陸送により輸送可能な機材ですが、バッテリー搭載機器のため航空路による輸送はできません。

バッテリーが充電されている場合、稼働時間は 24 時間以上であることから、一定の陸路で輸送できる範囲で利用が可能となります。輸送器 1 台あたり 1 ml チューブが 10 本収納でき、38℃を維持できます（図Ⅶ-2）。



図VII-1 細胞培養輸送器外観（富士平工業株式会社）  
電波障害防止のため、外貌はジュラルミンで覆われている

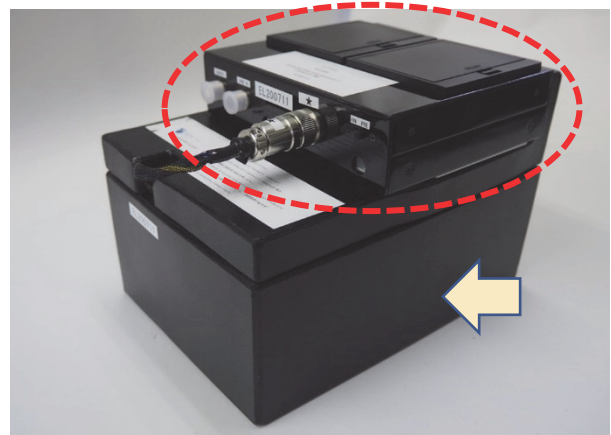


図VII-2 細胞培養輸送器内部  
密閉式小型バッテリー（矢印）を搭載、10本の1mlチューブを輸送できる

度を 38°C に加温する際）に乾電池の消費を減らすため、ならびに恒温槽を長時間 38°C にて保温しておく際には、別売のプレヒーターを利用して AC100V 一般電源で庫内温度を加温することができます。

庫内はフラットで、さまざまな試験管立てを自由に配置することが可能（図VII-4）です。

外装箱（株式会社スギヤマゲン）の Bio-Box Cell（図VII-5）との組み合わせで使用する方法が推奨されています。



図VII-3 エレキセル本体  
上部（○部分）がバッテリー  
下部（矢印）部分が恒温槽

## （2）エレキセル（株式会社バイオ） （図VII-3）

電池/AC 電源供用バッテリー駆動式ですが、パワーボックスにアルカリ単三乾電池もしくはニッケル水素充電電池（フル充電）を 16 本使用し（図VII-3）、航空機に搭載するための電界放射エミッションの要求を満たしているため、航空貨物（JAL、ANA、その他の AIR Cargo）での輸送が対応可能な製品です。ニッケル水素充電電池の場合、必ず全数同時充電、全数同時取り換えの必要があります（一部のみの取り換えは、充電池の特性から発熱や破損の可能性がります）。

機器の立ち上げ時（環境温度から庫内温



図VII-4 恒温槽内部  
恒温槽に 1ml チューブを立てた様子



図VII-5 Bio-Box Cell  
発泡ウレタン製の厚いカバー内に輸送器(エレキセル)が収められる



図VII-7 輸送器内部  
上部左側のコンセント部位に外部の電源を差し込み、充電  
写真中央の穴にチューブを挿入し、培養を行いながら輸送

### (3) IQS (MICRO Q Technologies)

#### (図VII-6)

国内では販売されていませんが、輸入可能です。

輸送器自体は発泡ウレタンの外箱に収められており、陸送は可能です。国際線に搭載可能(カタログ)ですが、国内の各航空会社の認可はとれておらず、飛行機への搭載はできません。多くの個体の卵子を輸送可能とする造りになっています(図VII-7)。



図VII-6 IQS 外観  
(MICRO Q Technologies)

輸送器自体は、発泡ウレタンの外箱内に入れられ、宅配便(陸送)での輸送に利用

## コラム 4

### 「体外受精に必要な環境」

受精は、雌の卵管膨大部で生じる現象です。この体内環境を模した下で受精現象を解明するために生み出された技術が体外受精です。しかし、体内の環境を完全に模することは難しく、大なり小なり体内とは異なる環境の中で作業を行うこととなります。

雌の体内で生じる現象には、「光」という要素はありません。暗室のような環境で操作をすれば違うのかも知れませんが、非現実的です。室内の蛍光灯からは紫外線が出ていますので、少しでも卵子や精子に傷害を与えないよう紫外線が発生しない蛍光管や LED に交換するなどの配慮をお勧めします。

受精・発生環境に適切な温度は、体温と同じ 38.5~39℃。この温度下で操作をすれば、温度に関するストレスは除去できますが、オペレーターは倒れます。例えば、25℃の快適な室温で作業するのであれば、体温より 14℃は低い環境になります。

生殖細胞操作を行う環境について、さまざまなストレスを如何に軽減するかということも、一連の IVP の過程では大切な課題です。

### 「手は汚い？」

細胞を培養するに当たって、手は汚いという概念を持つことが大切です。

試しに、単純組成の寒天培地に洗っていない掌を付着させ培養してみれば、どのくらいの雑菌が付着していたのかが分かります。石鹸で手を洗淨することが第一で、次いでアルコールで消毒することです。

やりがちなミスは、手を洗淨・消毒した後に白衣に着替え、帽子を被るという行動です。白衣等が滅菌されているのであれば問題ありませんが、順番は逆です。白衣に着替えて帽子を被り、手を洗う順です。

アルコールで消毒するだけで良いという概念は捨て、まずは手をきれいに洗うことから始めましょう。

### 「抗生物質」

卵子や精子の培養を行う場合、それぞれの培養液等には抗生物質が添加されています。レシピに書いてあったからではなく、何故なのか、技術者として答えられるようにしておきましょう。

培養中に細菌汚染が生じると、抗生物質の添加量を増やすなどの方法をとる方がいらっしゃいますが、ナンセンスです。作業のどの場面で細菌等が混入したのかの経路を確認することと、どんな菌が混入したかを確認し、それに適合するスペクトラムを持つ抗生物質を添加しなければ、意味がありません。

## Ⅷ. 凍結保存技術・移植技術

### 1. 凍結保存技術について

牛胚の凍結保存は、媒精後 7～8 日目の桑実胚、初期胚盤胞ならびに胚盤胞が主な対象となり、緩慢凍結法と超急速凍結法あるいはガラス化法とに大別できます。

これまで、凍結保護物質を徐々に除去するステップワイズ法、ストロー内で希釈するワンステップ法などの手技が開発されてきましたが、現在ではストロー内融解から直接移植ができるダイレクト法が主流になっています。ここでは緩慢凍結法の概略を主に示しますが、細かな手技は専門書を参考にしてください。

#### (1) 緩慢凍結法

発育段階や形態を検査した後、凍結保護物質（グリセリンやエチレングリコールなど）を添加した凍結保存液中に浸漬し、細胞内への透過により細胞内外の浸透圧の平衡を図ります。平衡を終えた胚は、保存液と共に 0.25 ml プラスチックストローに吸引します。

この際、ストロー表面には家畜改良増殖法に従い、必要事項を直接印字、あるいはラベルに印刷して貼り付けます(p53 参照)。

封入後、凍結保存液の凝固点付近に設定されたプログラムフリーザーのアルコール槽にストローを浸漬し、保存液に氷晶の形成を促します(植氷)。その後、指定の温度(-25～-30℃)まで-0.3～-0.6℃/分の速度で冷却を行います。この間に細胞外の氷晶形成、保存液の濃縮、細胞内の脱水が進みます。指定の温度に達した後、液体窒素ガス中にストローを移して急速に冷却することにより、細部内および細胞周辺の保存液はガラス化します。その後、液体窒素中に投入して保管します。

#### (2) 超急速凍結法あるいはガラス化法

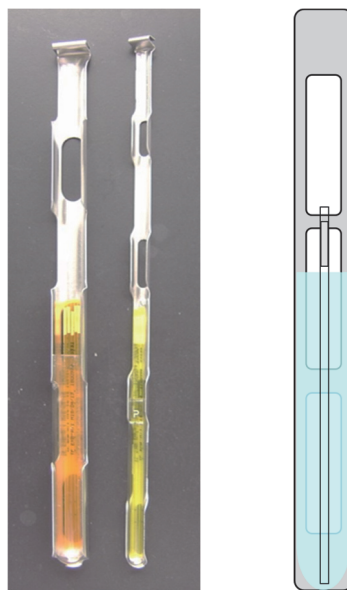
緩慢凍結に比べ、高浸透圧で高濃度の凍結保護物質を添加したガラス化液中で胚を平衡し、直ちに液体窒素内で超急速に保存する方法です。

現在でもガラス化保存胚のダイレクト移植を試みるケースもありますが、多くは移植前に顕微鏡下で凍結保護物質の除去が必要となります。庭先融解後の直接移植を可能とする対応技術が検討されています。

#### (3) 凍結胚の取扱い

液体窒素中で保管されているストローを外気に曝すとストロー内の温度が急激に上昇し、胚に傷害をもたらす可能性が高まります。風が当たる場所で行うと、そのリスクが一層顕著になりますが、無風状態であっても長時間外気に曝すことは厳禁です。

ケインにガラスの試験管等を装着し、その中でストローを保管(図Ⅷ-1)すると、液体窒素ボンベからケインを取り出しても試験管内に液体窒素が入っているため、ストロー内の急激な温度上昇による傷害を防げます。



図Ⅷ-1. ストローの収納

ケインに試験管を装着し、ストローを収納する

#### (4) 融解の基本

ストローを無風の場所で、一定の時間空气中に保持してから温水に浸けて融解します。凍結精液のように直接温水に浸漬すると、胚はフラクチャー傷害を受ける可能性があります。また、空気中での保持時間が長い場合、あるいは風の吹く中での保持はストロー内の温度が上がり、細胞内も細胞周辺も脱ガラス化して胚細胞は浸透圧傷害や細胞内凍結など、致命的な障害を受けることとなります。

フラクチャー障害や脱ガラス化による傷害は、凍結保存液の組成や冷却条件、ストローの素材などにより異なるため、凍結胚作製者等が発行する融解マニュアルに従ってください。適切な融解を行うには、温度計とタイマーは必須です。

融解胚の保管や移植器具への装着、ストロー装着後の移植器具の保管などは、20～30℃で行うことが一般的ですが、凍結胚製作者の指示に従ってください。また、融解後の胚は、速やかに移植しましょう。

## 2. 移植技術について

胚の移植は、レシピエント牛の黄体が存在する側(黄体側)の子宮角に移植します。反対側の子宮角に移植しても受胎しない訳ではありませんが、受胎率は低くなる傾向が否めません。また、黄体側の子宮角でも深部あるいは中央部に移植すると受胎する確率が高いことが報告されています。

移植の基本手技は人工授精とほぼ同じですが、シース管カバーを必ず使用し、膣部から膣内の細菌等を子宮内に持ち込まないようにします。

最も広く使用されている移植器は、人工授精の精液注入器と同じ構造ですが、移植器の先端から約 15 cm のカテーテルを延伸し、容易に子宮角中央部から深部に胚を注入できる器具も市販されています。



## Ⅸ. 法令事項への対応（家畜改良増殖法における受精卵に係る規定について）

和牛の精液と受精卵の不正輸出未遂事案を受け、令和2年第201回国会での審議を経て、令和2年10月1日に改正後の家畜改良増殖法（昭和25年法律第209号。以下「法」という。）が施行されました。

改正の目的は、「最近の家畜人工授精及び家畜受精卵移植をめぐる状況の変化に鑑み、家畜人工授精用精液等の保存等に関する規制を強化するとともに、特にその適正な流通を確保する必要がある家畜人工授精用精液等について容器への表示等の規制を整備する等の必要がある。」とされているとおり、特定家畜人工授精用精液等の流通管理の規制強化にあります。

特定家畜人工授精用精液等の「等」は、受精卵のことを指します。

一方、体内受精卵の生産のみならず、経膈採卵（以下、OPU）を用いた体外受精卵の生産も活発に行われていますが、法の条文中にOPUという単語は含まれていません。

そこで、受精卵の採取等に関わる規定を基に、OPUに関する法令上の対応ならびに解釈を記します（図Ⅸ-1）。

### 1. 診断書交付

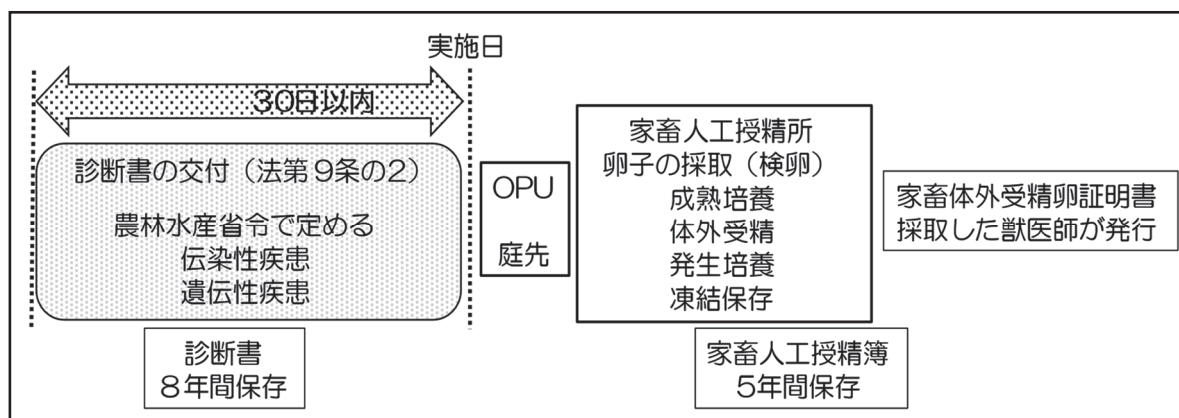
#### （1）診断書交付

OPUを実施する雌牛に対し、一番初めに行わなければならない作業です。

家畜体内受精卵等の採取の制限については、以下のとおり規定されています。

**法第9条の2 牛その他政令で定める家畜の雌は、その飼養者において、農林水産省令で定める伝染性疾患及び遺伝性疾患を有しないことについての獣医師による診断を農林水産省令で定めるところにより受け、診断書の交付を受けたもの（次項において「診断書交付家畜」という。）でなければ、家畜体内受精卵の採取の用に供してはならない。ただし、学術研究のため家畜体内受精卵の採取の用に供する場合その他農林水産省令で定める場合は、この限りでない。**

**2 牛その他政令で定める家畜の雌は、当該家畜の雌又はそのとたいから家畜卵巣を採取する者において、当該家畜の雌が診断書交付家畜であることを確認しなければ、当該家畜の雌又はそのとたいを家畜卵巣の採取の用に供してはならない。ただし、学術研究のため家畜卵巣の採取の用に供する場合その他農林水産省令で定める場合は、この限りでない。**



図Ⅸ-1. OPU実施にあたっての法律上の注意点

家畜体内受精卵の採取では、受精卵を採取しようとする家畜の雌が伝染性疾患及び遺伝性疾患を有していないことについて獣医師による診断を受け、さらに診断書の交付を受けたもの（診断書交付家畜）でなければ、受精卵の採取に供することができないとされています（法第9条の2第1項）。

また、家畜の雌又はとたいから家畜卵巣を採取する者においても、診断書交付家畜であることを確認しなければならないとされています。したがって、生体から卵巣を採取する（卵巣割去）場合、あるいは食肉処理場等と畜解体された牛から卵巣を採取し、未成熟卵を採取して体外受精卵を生産供給する場合も、卵巣を採取する雌は診断書交付家畜であることが必要です。これらのことから、OPUを行う雌に対しても同様の解釈をすることになります（法第9条の2第2項）。

この制限は、受精卵を介して伝染性疾患又は不良な遺伝形質の伝播を防止することを目的にしたものであり、体内受精卵採取の用に供する雌の家畜、並びに生体から卵巣・卵子を採取する、あるいは、とたいの卵巣から卵子を採取する場合も同様、衛生検査が必要とされています。

## （2）検査時期

検査を行う時期は、以下のとおり家畜改良増殖法施行規則（昭和25年農林省令第96号。以下「規則」という。）に規定されています。

**規則第13条の3 法第9条の2第1項の獣医師による診断は、雌の家畜を家畜体内受精卵（法第3条の3第2項第4号に規定する家畜体内受精卵をいう。以下同じ。）の採取の用に供する日又は雌の家畜若しくはそのとたいを家畜卵巣の採取の用に供する日前30日以内に受けたものでな**

**ければならない。**

家畜体内受精卵の採取、OPU、生体から採取した卵巣からの未受精卵の採取、並びにとたい由来の卵巣からの未受精卵の採取を行う場合、その採取を行う日の30日前以内に獣医師による診断と診断書交付を受けなければならないこととされています（規則第13条の3）。

なお、上記の規定に違反し、「診断書交付家畜」以外の雌牛から体内受精卵や体外受精卵を生産した場合は、法第38条第1号の規定により100万円以下の罰金に処される可能性があります。

また、家畜伝染病予防法（昭和26年法律第166号）における届出伝染病（例えば、牛伝染性リンパ腫（牛白血病）など）の検査を行わなかった場合、受精卵を介してこれらの伝染病が国内に蔓延する可能性が否定できません。法第9条の2により診断の対象として規定されている疾患以外であっても、疾病の蔓延防止の観点から、届出伝染病の陽性牛を利用する場合には都道府県の衛生担当者に確認をとり、指示に従ってください。

## （3）診断書の保存

交付された診断書の保存期限について法の規定はありませんが、法第15条第2項の規定により家畜人工授精簿（体内受精卵や体外受精卵の生産記録）の保存期間は5年とされ、また獣医師法施行規則第11条の2の規定により、牛等の診療簿及び検案簿の保存期間は8年とされていることから、各都道府県において特別な定めがある場合を除き、8年は保存してください。

## 2. 実施者の限定

体内受精卵の採取の実施者については、以下のとおり規定されています。

法第 11 条の 2 獣医師でない者は、雌の家畜から家畜体内受精卵を採取し、又はこれを処理してはならない。ただし、学術研究のためにする場合、自己の飼養する雌の家畜から家畜体内受精卵を採取し、又はこれを処理する場合その他農林水産省令で定める場合は、この限りでない。

2 獣医師でない者は、雌の家畜から家畜卵巣を採取してはならない。ただし、学術研究のためにする場合、自己の飼養する雌の家畜から家畜卵巣を採取する場合その他農林水産省令で定める場合は、この限りでない。

3 獣医師又は家畜人工授精師でない者は、雌の家畜のとたいから家畜卵巣を採取してはならない。ただし、学術研究のためにする場合その他農林水産省令で定める場合は、この限りでない。

4 獣医師又は家畜人工授精師でない者は、家畜未受精卵（家畜体外受精卵移植の用に供する未受精卵をいう。以下同じ。）を採取し、若しくは処理し、家畜体外授精を行い、又は家畜体外受精卵（家畜体外受精卵移植の用に供する受精卵をいう。以下同じ。）を処理してはならない。ただし、学術研究のためにする場合その他農林水産省令で定める場合は、この限りでない。

獣医師でない者は家畜体内受精卵を採取し、又はこれを処理してはならないこととされています（法第 11 条の 2 第 1 項）。

体内受精卵の採取が獣医師に限定されている理由は、

- ①麻酔薬の使用
- ②子宮頸管の外科的拡張
- ③採取器材の子宮角への挿入
- ④子宮の灌流
- ⑤子宮内への抗生物質の投与

等の家畜体内受精卵の採取等に必要の一連の作業は、獣医学的判断および技術を以て

行わなければ家畜に危害をおよぼすおそれがあり、このような業務は獣医師法（昭和 24 年法律第 186 号）第 17 条に規定される獣医師のみが行い得る診療業務に該当するものと解釈されるためです。

また、獣医師でない者は、雌の家畜（生体）から家畜卵巣を採取してはならないこととされています（法第 11 条の 2 第 2 項）。これは、雌の家畜（生体）から家畜卵巣を採取する行為は、獣医療行為に該当すると考えられるためであり、OPU も同様に解釈されます。

家畜体外受精卵移植においても、家畜卵巣の採取、家畜未受精卵の採取・処理、家畜体外授精、家畜体外受精卵の処理を行う者については、専門的な知識と技術を要することから、法第 11 条の 2 第 2 項から第 4 項までにおいて制限を定めています（当該各項ただし書に規定する場合を除く）。

家畜体外受精卵移植のうち、雌の家畜のとたいから卵巣を採取する場合は、獣医師又は家畜人工授精師でない者は採取してはならないと規定されています（同法第 3 項）。

これは、卵巣を採取する雌の家畜の衛生検査の結果を担保するとともに、血統の混乱を防止するためには、家畜卵巣の採取から家畜体外授精業務に至るまでの行為を特定の者が一貫して行うことが必要であるためです。

なお、上記の規定に違反し、「無資格者による実施」が確認された場合は、法第 38 条第 1 号の規定により 100 万円以下の罰金に処される可能性があります。

### 3. 実施場所の限定

受精卵の採取・処理については、以下のとおり規定されています。

なお、受精卵の採取・処理する獣医師は、獣医療法（平成 4 年法律第 46 号）第 3 条の規定に基づく診療施設の開設の届出とは別

に、法第 24 条に基づく家畜人工授精所の開設許可を得る必要があります。

**法第 12 条 家畜人工授精所、家畜保健衛生所その他家畜人工授精又は家畜受精卵移植を行うためセンター又は都道府県が開設する施設（次項及び第 14 条第 3 項において「家畜人工授精所等」という。）以外の場所で家畜人工授精用精液を採取し、若しくは処理し、家畜体内受精卵を処理し、家畜未受精卵を採取し、若しくは処理し、家畜体外授精を行い、又は家畜体外受精卵を処理してはならない。ただし、家畜人工授精用精液を採取する回数が、都道府県知事の定める回数に満たない雄の家畜から家畜人工授精用精液を採取し、又はこれを処理する場合並びに第 11 条ただし書並びに前条第 1 項ただし書及び第 4 項ただし書の場合は、この限りでない。**

2 家畜人工授精所等以外の場所で、家畜人工授精用精液又は家畜受精卵を保存してはならない。ただし、学術研究のためにする場合、自己の飼養する雌の家畜に注入し、又は移植するためにする場合その他農林水産省令で定める場合は、この限りでない。

家畜体内受精卵の「採取」については、家畜人工授精所以外（生産者の牛舎等）で行うことは可能ですが、受精卵等の処理（検査〔検卵、洗浄、形態確認〕、ストローへの封入、凍結等）は家畜人工授精所の開設許可を得た施設でなければ行うことができません（法第 12 条）。

したがって、生産者の事務所等で処理を行う場合は、

- ①家畜人工授精所の付帯設備を現場に持ち出して受精卵の処理をすること
- ②①の処理が的確、かつ、衛生的に実施

できること

等について、家畜人工授精所の開設許可を得る際に都道府県の確認を得ている必要があります。具体的には、家畜人工授精所の付帯設備として処理に必要な機材と設備を搭載した ET 車を登録し、現場における作業手法等について都道府県の確認を受けることなどが挙げられます。これらの確認が済んでいない場合は、法第 25 条の 2 に基づき「家畜人工授精所の構造、設備及び器具」の変更の届出を速やかに行うようにしてください。また、家畜人工授精所の所在地は ET 車の駐車場ではなく、獣医師又は家畜人工授精師と連絡が取れる住所（事務所若しくは自宅等）としてください。

なお、上記の規定を無視し、「家畜人工授精所」でない場所で処理等を行った場合は、法第 38 条第 1 号の規定により 100 万円以下の罰金に処される可能性があります。

#### 4. ストロー表示の義務化

今回の法改正により、令和 2 年 10 月 1 日以降に生産された特定家畜人工授精用精液等を収めた容器には、以下のとおり表示の義務が規定されています。

**法第 32 条の 4 獣医師または家畜人工授精師は、第 13 条第 4 項から第 6 項までの規定により特定家畜人工授精用精液等を容器に収めたときは、当該容器に、当該特定家畜人工授精用精液等に係る種畜の名称その他の農林水産省令で定める事項の表示をしなければならない。**

具体的には、施行規則第 42 条の容器への表示事項、および第 43 条の容器への表示方法に以下のように示されています。

**規則第 42 条 法第 32 条の 4 の農林水産省令で定める事項は、次のとおりとする。**

一、二 一省略一

三 家畜体外受精卵にあつては、次に掲げる事項

イ 当該家畜体外受精卵が生産された家畜人工授精所等の管理番号

ロ 当該家畜体外受精卵に係る家畜卵巣の採取の用に供した雌の家畜及び当該家畜体外受精卵に係る家畜人工授精用精液の採取の用に供した雄の家畜の名前（牛の場合にあつては、当該家畜体外受精卵に係る家畜卵巣の採取の用に供した雌の家畜及び当該家畜体外受精卵に係る家畜人工授精用精液の採取の用に供した雄の家畜の名前又はこれらの個体識別番号）

ハ 当該家畜体外受精卵の検査年月日

2 一省略一

3 第1項に規定する事項のうち次の各号に掲げる事項については、それぞれ当該各号に定める事項をもつてその事項に代えることができる。

一 一省略一

二 第1項第3号ロ及びハ家畜体外受精卵証明書番号

規則第43条 法第32条の4の容器への表示を行うに当たつては、次に掲げる方法で行うものとする。

一 特定家畜人工授精用精液等を取めた容器に表示する方法

二 特定家畜人工授精用精液等を取めた容器にラベルを貼ることにより表示する方法

家畜体外受精卵を生産するためには、家畜人工授精所の開設が必要となります。

家畜人工授精所の開設が許可されると、家畜人工授精所管理番号が付与されます。

ストロー表示に必要な項目は、

①家畜人工授精所管理番号

②OPUに供した雌牛の名号もしくは個体識別番号

③体外受精に供した種雄牛の名号もしくは個体識別番号

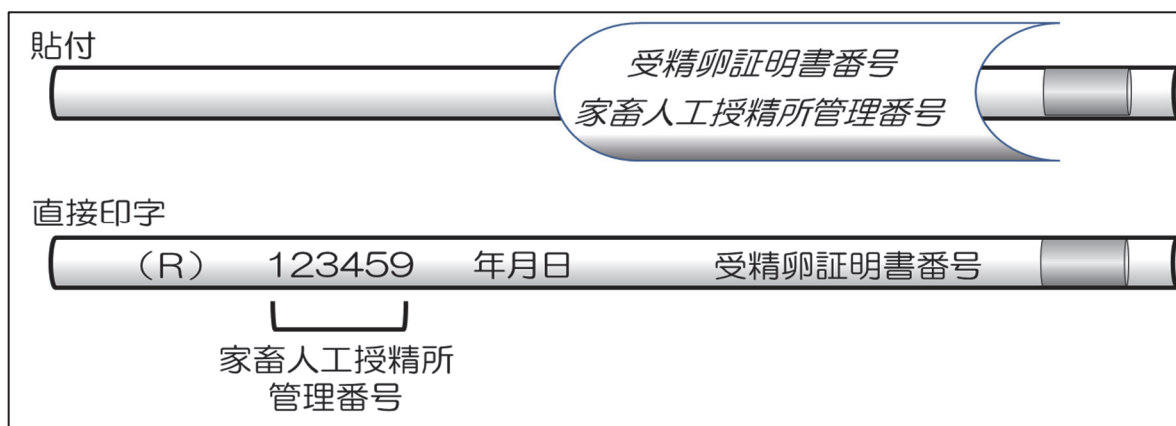
④検査年月日

となります。また、上記項目の②～④の替わりに

⑤体外受精卵証明書番号

を記載することも可能です。

現在、一般的に胚移植に用いられている容器は0.25 ml量のプラスチックストローですが、このストローに①～④の情報を印字するには物理的に無理があります。そこで、図Ⅸ-2に示したように必要事項を印字したシールを貼り付ける、あるいは直接印字を選択することができます。



図Ⅸ-2. ストローの表示方法

## 5. 受精卵証明書の発行等

受精卵証明書の発行や受精卵の譲渡については、以下のとおり規定されています。

**法第 13 条第 4 項** 獣医師又は家畜人工授精師は、前 3 項の検査の後速やかに、農林水産省令で定める方法により、家畜人工授精用精液、家畜体内受精卵又は家畜体外受精卵を容器に収めた上これに封を施し、かつ、家畜人工授精用精液証明書、家畜体内受精卵証明書又は家畜体外受精卵証明書を添付しなければならない。ただし、検査の後その場所において雌の家畜に家畜人工授精用精液を注入し、若しくはこれを用いて家畜体外授精を行い、又は雌の家畜に家畜体内受精卵若しくは家畜体外受精卵を移植する場合は、この限りでない。

**法第 14 条第 2 項** 前条第 4 項の封がなく、又は家畜体内受精卵証明書若しくは家畜体外受精卵証明書を添付されていない家畜体内受精卵又は家畜体外受精卵は、これを譲り渡し、又は雌の家畜に移植してはならない。ただし、次に掲げる場合は、この限りでない。

獣医師または家畜人工授精師は、受精卵を生産（検査後、ストローに封入）した際には、家畜体内受精卵証明書（規則様式第 8 号）または家畜体外受精卵証明書（同様式第 9 号）（以下「受精卵証明書」という。）を添付しなければならないこととされています（法第 13 条第 4 項）。

受精卵証明書は、基本的には、受精卵を採取した獣医師、生体から卵巣又は未受精卵を採取した獣医師、とたいから未受精卵を採取した獣医師又は家畜人工授精師がそれぞれ発行します。

なお、受精卵の生産において、例えば OPU

を A 社の獣医師が実施し、家畜人工授精所における未受精卵の採取以降は B 社の獣医師が実施している等の分業がされている場合は、両社間で責任の所在を明確にした契約等を交わした上で、体外受精卵を生産した B 社の獣医師が家畜体外受精卵証明書を発行することも可能です。

また、受精卵を検査した後に、その場で雌牛に移植する場合は、受精卵証明書を添付する必要はありませんが体内（体外）受精卵採取に関する証明書を発行するか、それ以外の場合（隣の農家など他の場所で移植する場合は、受精卵証明書の添付が必要です（第 14 条第 2 項）。

なお、上記の規定に違反した場合は、法第 38 条第 1 号の規定により 100 万円以下の罰金に処される可能性があります。

## 6. 運営状況の報告等

法改正により、新たに家畜人工授精所の開設者に義務付けられたのは、譲渡等記録簿と運営状況の報告です。

**法第 32 条の 5** 家畜人工授精所の開設者は、特定家畜人工授精用精液等の譲受け（保存の委託を受けた特定家畜人工授精用精液等の搬入を含む。以下この項において同じ。）、譲渡し（保存の委託を受けた特定家畜人工授精用精液等の搬出を含む。以下この項において同じ。）、廃棄又は亡失をしたときは、遅滞なく、譲受け、譲渡し、廃棄又は亡失に関する事項を譲渡等記録簿に記載しなければならない。

2 家畜人工授精所の開設者は、前項の譲渡等記録簿を 10 年間保存しなければならない。

**法第 34 条第 3 項** 家畜人工授精所の開設者は、毎年、農林水産省令で定めるところにより、当該家畜人工授精所の運営の

状況を都道府県知事に報告しなければならない。

特定家畜人工授精用精液等を生産する家畜人工授精所は、精液や受精卵の出入庫について譲渡等記録簿（規則様式第 24 号）に記載する必要があります。この帳簿には、家畜人工授精所が購入した精液・受精卵のみならず、生産者から預かった精液・受精卵の搬入・搬出についても記載する必要があります（法第 34 条第 3 項）。

なお、生産した受精卵に関する譲渡等記録簿は、家畜人工授精簿（規則様式第 13 号）の事項を漏れなく記録するとともに、譲渡先の家畜人工授精所の開設の有無を別途取りまとめておくことでも充足することができます（保存期間が 10 年であることに留意してください）。

また、上記譲渡等記録簿の記録や、当該家畜人工授精所において生産された受精卵数量や譲渡（搬出）数量等を運営状況の報告書（規則様式第 28 号）にとりまとめ、毎年 4 月末までに都道府県知事に報告する必要があります。なお、ホルスタイン等和牛以外の受精卵を生産する家畜人工授精所は、同様式第 29 号にとりまとめます（法第 34 条第 3 項）。

## X. 和牛の登記・登録を行うために遵守すべき事項について（家畜人工授精および受精卵生産・移植に係る留意事項）

### 家畜人工授精師・獣医師の皆様へ

本会では、円滑かつ正確な登記登録を実施するために、人工授精および受精卵生産や受精卵移植などに関する規程を設けています。規程に抵触する行為があった場合、生産された子牛の登記は認められませんので、下記の点について十分にご留意いただきますようお願いいたします。

なお、以下の説明は、規程を一部抜粋したものととなります。

#### 1. 血統に混乱が生じる交配は行わないこと

人工授精および受精卵生産や移植において、血統に混乱が生じるような行為によって生産された子牛は、遺伝子型検査などによる血統の判明の可否に関わらず、登記は認めていません。下記事項を遵守いただきますようお願いいたします。

##### （1）同一発情期に授精する種雄牛は1頭のみとし、種雄牛が特定できること

同一発情期に複数の種雄牛を授精してはいけません。

短い発情周期で授精を行う場合は、前回の授精と同じ種雄牛の精液を用いるか、正常な周期に回復するまで授精を控えてください。

##### （2）レシピエントに移植する受精卵は、原則として1個とする

レシピエントに異なる父母の受精卵を複数移植してはいけません。2卵移植では、同じ父母から生産された受精卵か、同じ父母から生産された受精卵と同じ条件となる分割卵に限ります。生まれる子牛が同一血統となる組み合わせであることが条件です。

#### （3）追い（重ね）移植は認めない

人工授精を実施した数日後に受精卵を移植する「追い（重ね）移植」は認めません。

ただし、ドナー牛として採取した自らの受精卵を移植し、AIとETで父母が同じになる場合は除きます。人工授精の後、受精卵を移植する場合は、必ず次の発情周期まで間隔を空けてください。

#### 2. 提出書類に不備がないこと

授精証明書や貼付の家畜人工授精用精液証明書（以下：精液ラベル）、家畜体内（体外）受精卵証明書（以下：受精卵証明書）と受精卵移植証明書などの提出書類に不備がある場合、その産子の登記はできません。

##### 【登録関連規定に関すること】

##### （1）授精証明書に精液ストローが添付されていること

子牛登記を申請する場合、授精証明書には精液ラベルに加えて、精液ストローの添付が必要です。受精卵生産の際の授精に対する授精証明書も同様ですので注意してください。

授精証明書発行までは、家畜改良増殖法に基づいた家畜人工授精簿での精液ラベルの管理と併せて精液ストローも管理・保管してください。

##### 【家畜改良増殖法に関すること】

##### （1）証明書の記入漏れや記入誤りがないこと

子牛登記に際して提出のあった各証明書に不備（誤記載や記入漏れなど）がある場合、不備が解消されない限り、子牛登記は受け付けられません。

なお、各証明書の訂正は発行者しかできません。とくに、精液ラベルや受精卵証明書を発行者以外が訂正や書換えをすることがないように注意してください。



**(2) 各証明書の記載に不備や疑義がないこと  
(譲渡経由など)**

①家畜改良増殖法により、精液や受精卵を譲渡・譲受した際は、精液ラベルや受精卵証明書の譲渡・経由欄にその内容を記載することとされています。

人工授精や受精卵移植の際には、必ず各証明書の譲渡・経由欄に内容が正しく記載されているかどうか確認してください。

②家畜改良増殖法に違反する精液ラベル・受精卵証明書が貼付された授精証明書や受精卵移植証明書は無効と判断されます。なお、疑義や不安がある場合は各都道府県担当部署に報告し指導を受けてください。

(例)

- ・記載内容に不備のあるもの(項目の未記入や明らかな誤りなど)
- ・譲渡・経由欄の記入に不備のあるもの
- ・記載内容に改ざんや不適切な修正のあるもの(各証明書の修正は、発行者以外できません)
- ・「家畜遺伝資源に係る不正競争の防止に関する法律」に関連する不正流通の恐れがあるもの

**3. 受精卵生産に関する留意点**

**(1) ドナー牛は登録牛であること**

採卵される雌牛(ドナー牛)は、本会の登録牛でなければなりません。ただし、登録可能な月齢までに採卵を実施する場合など、やむを得ず、登記牛から採卵する場合は、採卵時の所有者が責任をもってドナー牛の登録を受けてください。

登記牛から採卵後、登録前にドナー牛を移動(販売・譲渡など)した場合、それらの受精卵から生産された産子の子牛登記が認められない場合があります。

**(2) ドナー牛は採卵前に親子判定を実施すること**

ドナー牛は受精卵製造時までに「遺伝子型検査要綱」により、親子判定のための遺伝子型検査を実施していなければいけません。遺伝子型検査を実施しないまま、採卵や移植を行った後にドナー牛が死亡・廃用となった場合、それらの受精卵から生産された産子の子牛登記は認められません。

**(3) 精液ストローの分割・分注は認めない(体外授精も含む)**

人工授精、体外授精に際して精液ストローを分割や分注する行為は認めません。必ず、1本の精液ストローは1頭の雌牛(または1頭から採取された未受精卵)に使用してください。なお、精液ストローの分割は家畜改良増殖法に抵触すると考えられます。

**4. 家畜人工授精師・獣医師の皆様へお願い**

**(1) 授精証明書は授精後、速やかに繁殖者へ交付してください。(移植証明書も同様)**

本会では会員農家に対して、授精後速やかに、また授精の都度、授精証明書の発行を受けるよう指導していますので、ご理解とご協力をお願いします。

また、ドナー所有者に対しても、受精卵生産時の人工授精(体外授精を含む)に関する授精証明書の発行を受けて、授精後5年間保管することとしていますので、併せてご協力をお願いします。

**(2) 家畜人工授精簿(各種台帳)は正しく記載し、保管年限まで保存してください。**

登記に際して血統矛盾などの事故が発生した際に、家畜人工授精簿などの台帳記録は重要な手掛かりとなります。家畜改良増殖法に定められた様式で項目に漏れなく記載し、保管してください。

### 【子牛登記の交配条件と申請に必要な書類】

(子牛登記取扱方法：令和3年7月一部改正から抜粋)

共通条件としては、以下を満たすもの。

- (1) 交配又は採卵される雌牛は、本会の登録(登記)牛であるもの。
- (2) 交配、採卵又は移植の際、鼻紋等により対象となる雌牛の個体確認がされたもの。
- (3) 家畜改良増殖法に定められた書類については、その様式に従って発行されていること。

また、交配に使用される精液や移植される受精卵は、法令に基づき適正に生産、使用及び流通したものであること。

通常産子は、以下の条件を満たすもの。

#### (1) 人工授精

- ①同一発情期に授精する種雄牛は1頭のみとし、種雄牛が特定できるもの。精液ストローを分割や分注しての使用は認めない。
- ②獣医師又は家畜人工授精師により、授精証明書(家畜人工授精用精液証明書又は精液採取に関する証明書及び、精液ストローの添付)が発行されたもの。また、授精証明書は授精の度に速やかに発行され、受胎までに要した授精証明書は全て保管されていることを原則とする。

なお、自家授精の場合も同様とする。

#### (2) 自然交配

- ①種付証明書が発行されたもの。また、受胎までの全ての種付について記録の追記または種付証明書の発行がされ、保管されていることを原則とする。

#### (3) 雌雄混牧

- ①本会から、事前に「雌雄混牧地域の承認」を得ていること。
- ②種付された種雄牛が確認できるもの。
- ③種付年月日、分娩年月日が確認できるもの。

受精卵産子(以下、「ET産子」という。)については、次のとおりとする。

受精卵移植においては、下記の項目を満たし、受精卵移植証明書(体内(外)受精卵移植証明書には体内(外)受精卵証明書又は体内(外)受精卵採取(生産)に関する証明書を添付すること)があるもの。

#### (1) 受精卵生産は以下のいずれかのもの。

##### 1) 体内(外)受精卵生産

##### ①ドナーの遺伝子型検査

ドナーは登録牛で、原則として受精卵製造時まで、「遺伝子型検査要綱」により、親子判定のための遺伝子型検査を実施していること。ただし、平成元年度以前に凍結受精卵が採取され、平成元年度までに廃用されているドナーの場合は、血液型検査成績報告書がなくても、その産子の登記を認める。

②同一発情期に授精する種雄牛は1頭のみであること。精液ストローを分割や分注しての使用は認めない。

③ドナー所有者は、受精卵生産時の人工授精に関して授精証明書の発行を受けて保管し、協会から指示があった場合、授精証明書を提出しなければならない。なお、授精証明書は授精後5年間保管すること。

##### 2) と畜場卵生産

①と畜場卵を活用して、体外受精卵を生産しようとするものは、予め支部長の承認を得ること。

②支部長は卵、受精卵等の個体管理が適切に行われる体制にあるか確認のうえ、適切であれば承認するとともに本会に報告すること。

③ドナーは個体確認(鼻紋)のうえ親子判定のための遺伝子型検査を実施したもの。

④ドナーは登録牛であるもの。

#### (2) 移植

①レシピエントに移植する受精卵は、原則として1個とする。

- ② 2 卵移植では、同じ父母から生産された受精卵か、同じ父母から生産された受精卵と同じ条件となる分割卵に限る。
- ③ 追い（重ね）移植は原則として認めない。  
ただし、自卵の追い（重ね）移植で父牛が同じ場合は認める。
- ④ レシピエントが本会登録牛以外の場合は、受精卵移植証明書の体内（外）受精卵を移植した雌畜の名号の欄に個体識別番号を記入しておくこと。（登録牛であっても個体識別番号を記入することが望ましい）

#### **【体外受精卵における「と畜場卵」と「OPU（経膈採卵）」の扱いについて】**

体外受精卵は「と畜場卵」を基本として、家畜改良増殖法などでも取り扱われてきました。しかし、近年になって「OPU（経膈採卵）」の技術が浸透したことにより、多く実施されるようになりました。

「と畜場卵」は上記規程の通り、生産に際して「予め支部長の承認を得ること」とされています。これは「と畜場卵」の場合、と体から卵巣が採取されるため、と畜場で正確に卵巣の個体管理が実施される体制が整っているかを確認するため、事前申請を必要としています。（と体と卵巣を離して取り扱うため、どの牛の卵巣かを正確に管理する必要がある。）

一方で「OPU（経膈採卵）」の場合、生体から卵子を採取しますので、ドナー牛は鼻紋等の通常の方法で個体確認が可能です。また、獣医師による一貫した卵子の管理が可能ですので、事前申請などは必要としていません。

## XI. ホルスタイン種の血統登録を行うために遵守すべき事項について

### 1. はじめに

ホルスタイン種、ジャージー種など、牛の血統を明らかにするものは血統登録（以下、「登録」という。）のみであり、登録牛の純粋性は「血統濃度」で示しています。

血統濃度とは、父牛、母牛それぞれの祖先が同じ品種であることが明確となっている割合、即ち同一品種の祖先への遡り度を割合（％）で表示します。血統濃度 100％の両親から生まれた牛は血統濃度 100％となります。

また、ホルスタイン種、ジャージー種などの毛色や特徴を備えているが無登録である雌牛に対しては、同じ血統の登録雄牛（血統濃度 93％以上）を交配して生まれた雌牛は、血統濃度（47％～50％）で登録されます。なお、同じ血統ではない乳用種の交配や、乳用種に黒毛和種を交配して生まれた雌牛は登録できません。

### 2. 受精卵移植による生産牛の登録

受精卵移植によって生産された牛（以下、「ET 生産牛」という。）を登録する場合は、真の母牛（供卵牛）と分娩した母牛（受卵牛）が異なることから、真の母牛、父牛を DNA による遺伝子型の検査で確認してから登録をします。これは体内受精卵だけではなく、体外受精卵も同じです。

従って、（一社）日本ホルスタイン登録協会（以下、「登録協会」という。）では、ET 生産牛を登録する際の取り決めを、ホルスタイン種牛登録規程及び同登録取扱手続に定めるほか、受精卵移植に関する登録取扱要項により取り扱っています。

以下は、受精卵移植に関する登録取扱要項を基に、体外受精卵移植による登録について説明します。

なお、（1）から（7）の説明は、受精卵移植に関する登録取扱要項から一部抜粋したものととなります。

### （1）対象

ET 生産牛として登録の対象となるものは、次のとおりとする。

ア. 国内において採取した受精卵又は採取後胚操作を施した受精卵を移植した牛から生産された牛

イ. 国内において生産した家畜体外受精卵を移植した牛から生産された牛

ウ. 国外において採取した受精卵又は採取後胚操作を施した受精卵を移植した輸入牛から生産された牛

エ. 国外において採取した受精卵又は採取後胚操作を施した受精卵を移植した国内牛から生産された牛

オ. 国外に輸出される受精卵

カ. 国外に輸出される受精卵の移植牛

### （2）登録申込みの条件

ET 生産牛の登録申込みは、次に掲げるすべての条件を満たしたものでなければならない。

ア. 受精卵の採取の用に供した雌牛（以下、「供卵牛」という。）は、（1）のアとイにあつては、登録協会で登録されたもの、（1）のウとエにあつては本会承認の外国登録団体で血統登録されたもの  
イ. 受精卵の移植を受けた雌牛（以下、「受卵牛」という。）は、血統登録証明書や個体識別耳標等によって個体が確認されたもの

### （3）体外授精

ET 生産牛の登録を受ける見込みで、体外授精を実施したときは、家畜体外受精卵証明書（省令様式第 9 号）又は体外受精卵生産に関する証明書（省令様式第 12 号）を用いるものとする。

### （4）移植の条件

ET 生産牛の登録を受ける見込みで、受卵牛に対し一度に 2 個以上の受精卵を移植する場合は、その受精卵は父母が同じものでなければならない。

#### (5) 受卵牛の移動

受卵牛を移動するときは、譲渡人は別記様式の体内受精卵移植証明書又は体外受精卵移植証明書（省令様式第19号）を譲受人に渡さなければならない。

#### (6) 登録申込

登録の申込者は、出生時の当該生産牛の所有者とする。

登録の申込者は、登録申込書に別記様式の体内受精卵移植証明書又は体外受精卵移植証明書を添えて申込む。

この場合、登録は体内授精にあつては受精卵採取時の供卵牛の所有者を繁殖者、申込者を所有者として、また体外授精にあつては媒精時の当該卵子の所有者を繁殖者、申込者を所有者として登録する。

#### (7) 遺伝子型の調査

ET生産牛を登録するときは、次のとおり遺伝子型の調査により父母牛の確認を受けなければならない。

ア. 供卵牛は、受精卵を採取したとき、すみやかに「父母牛の判定」の調査を受けなければならない。ただし、すでに本牛の親子関係が遺伝子型の調査により確認されているものにあつては、省略することができる。また、遺伝子型の調査済の牛は、以後の受精卵採取の場合、特別の事情のない限り、遺伝子型調査のための検査試料（毛根又は血液等、以下同じ）の採取を省略する。

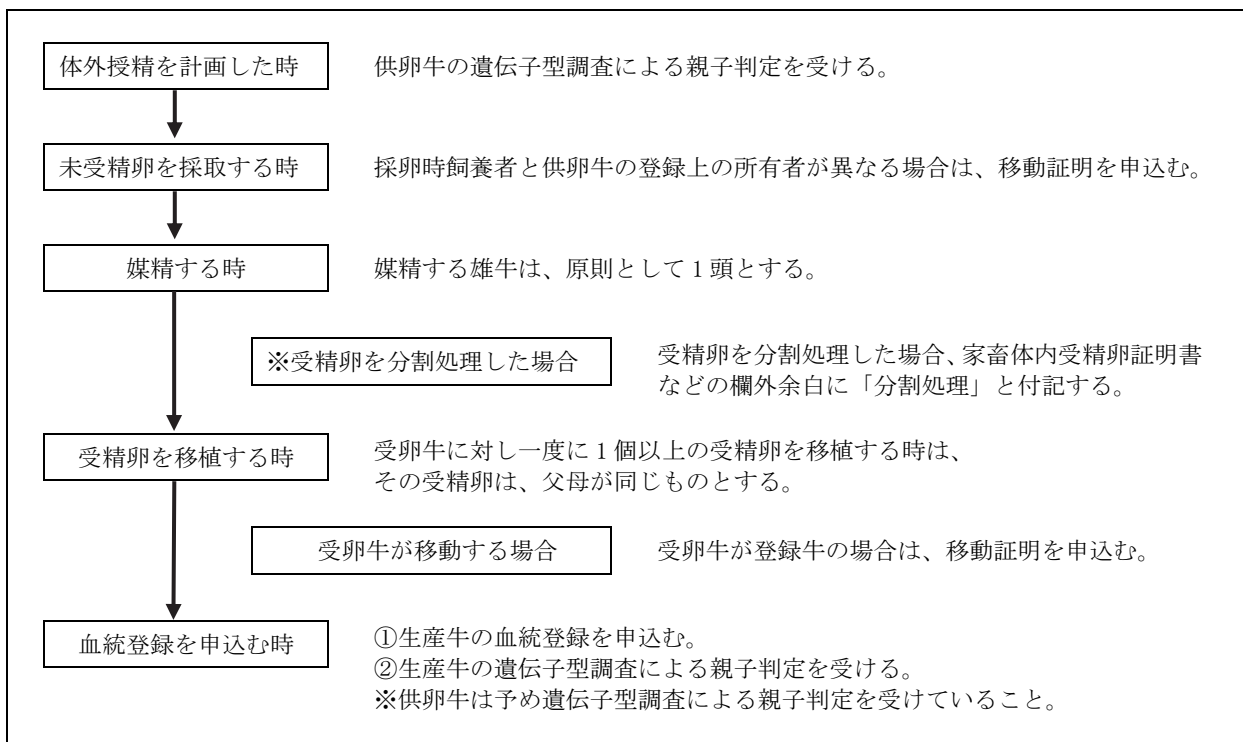
イ. ET生産牛は、登録申込時に遺伝子型の調査を受けなければならない。申込者は、遺伝子型調査を申込む旨を登録委員に連絡し、登録委員はET生産牛から検査試料（毛根等）を採取する。所定の遺伝子型検査申込書（別紙）に必要事項を記入の上、支部・承認団体を經由して、登録協会に調査を申込むとともに、検査試料を（一社）家畜改良事業団家畜改良技術研究所遺伝検査部（群馬県前橋市）に送付する。

ウ. 登録協会が特に必要と認めるときは、受卵牛の遺伝子型の調査を受けなければならない。

なお、ジャージー種については、日本ジャージー登録協会が定めるジャージー種牛登録規程及び同登録取扱手続、受精卵移植に関する登録取扱要項があり、それに沿って取り扱います。

その他の乳用種については、ホルスタイン種牛登録規程等を準用して行います。

### 3. ET生産牛の登録までの手順



### 別紙

(別紙) **遺伝子型検査申込書** (支部経由で登録協会本部へ送付)

(一社)日本ホルスタイン登録協会 会長 殿 申込番号 \_\_\_\_\_ 申込/令和 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

申込者 住所 \_\_\_\_\_ 都道府県 \_\_\_\_\_ 区市町村 \_\_\_\_\_ 氏名 \_\_\_\_\_ 印 会員番号 \_\_\_\_\_

採取日 令和 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日 雄牛 SNP 検査申込時は必ず記入して下さい ⇒ 牛群検定農家コード \_\_\_\_\_

採取者職氏名 \_\_\_\_\_ 印 支部・承認団体名 \_\_\_\_\_ 印

(血液試料は獣医師、その他試料は登録委員が採取を行うこと)

毛根貼付台紙(袋)には、**個体識別番号、採取者、立会人を明記して下さい**

●申込にあたって、次の事項を確認願います

1. 特定遺伝性疾患及び単蹄、赤毛因子の判定結果を登録証明書等に表示することに同意しますか (はい・いいえ)
2. SNP 検査申込にあたって、ゲノミック評価値の公表/情報開示について同意します (必須)
3. 国内雄牛の SNP 検査を申込みときは、後代検定に参加又は参加予定のものに限ります (JAAB 等発行の承諾書添付)

品 種 10. ホルスタイン 11. ジャージー 12. その他 \_\_\_\_\_ ◎試料採取を伴わない判定   
(SNP検査では使用できません)

検査種目 親子の判定: 11. 登録申請雄牛 16. 登録申請雄牛 (ET生産牛) 14. 供卵牛 22. 登録申請抜取検査  
23. ET 生産雌牛 24. 親子判定 (一般) 40. 雑種の親子判定  
その他: 32. 卵性の判定 36. 個体確認 58. MSHR 遺伝子型 (赤毛) 65. フリーマーチンの判定  
遺伝性疾患: 50. BLAD 60. CVM 62. 単蹄 76. ブラキスバイナ (BY)  
74. H1 ~ 7 同時検査 88. BLAD, CVM 同時検査 48. BLAD, CVM, 単蹄同時検査 90. 牛コレステロール代謝異常症 (CD)  
SNP 検査: 70. カスタム (XT) SNP その他 \_\_\_\_\_

検査対象牛 (無登録牛は個体識別番号、記号、生年月日などを記入して下さい) 試料採取は感染症のない健康な牛からお願いします。










続柄	個体識別番号・登録番号	外国符号	試料(血液)番号	送付試料	名 号	生年月日	性	双子
父牛			新規牛は事業団が記入 検査済牛は申込者記入	送付する試料に ✓印を付けて下さい		H-R 年 月 日	雄・雌	単・双
母牛				<input type="checkbox"/> 毛根 <input type="checkbox"/> 耳片 <input type="checkbox"/> 血液 <input type="checkbox"/> その他		H-R 年 月 日	雄・雌	単・双
本牛				<input type="checkbox"/> 毛根 <input type="checkbox"/> 耳片 <input type="checkbox"/> 血液 <input type="checkbox"/> その他		H-R 年 月 日	雄・雌	単・双
				<input type="checkbox"/> 毛根 <input type="checkbox"/> 耳片 <input type="checkbox"/> 血液 <input type="checkbox"/> その他		H-R 年 月 日	雄・雌	単・双
				<input type="checkbox"/> 毛根 <input type="checkbox"/> 耳片 <input type="checkbox"/> 血液 <input type="checkbox"/> その他		H-R 年 月 日	雄・雌	単・双

未経産 SNP 検査申込の際、牛群検定に加入してください。 牛コード \_\_\_\_\_ 連絡事項 \_\_\_\_\_

試料番号は家畜改良事業団で付けますが、すでに検査済みで今回試料を送付しないものは、判定書記載の試料 (血液) 番号を記入して下さい。  
本申込書に記入いただいた個人情報は、検査業務以外の目的に利用することはありません。

## OPU 関連動画一覧

内 容	QRコード
<p><b>動画① プローブの挿入と卵巣の持ち方</b></p> <p>プローブは子宮頸管のところまで挿入します。卵巣を保持するときは靭帯の端を持ち、卵巣をプローブの上に乗せるような感じにします。卵巣自体を指でつかまないようにします。</p>	
<p><b>動画② 卵胞が見つらいときの対応と反対側の卵胞を採卵する方法</b></p> <p>卵胞が見つらい場合は、卵巣をずらしてプローブとの距離を取ります。また、卵巣の手前側の作業が終わった後は、卵巣の反対側を映す必要があるため、卵巣を 180 度回転させて作業を行います。</p>	
<p><b>動画③ 卵胞数の計測と黄体の確認</b></p> <p>最初に OPU 画像を見ながら卵巣の様子を確認します。卵胞数を計測するとともに、黄体の確認をします。黄体があるときは、黄体を映さないようにして針を刺し作業を行います。</p>	
<p><b>動画④ 針を刺す前に卵胞の位置を確認</b></p> <p>針を刺す前に卵胞や黄体の位置を確認します。針を刺す際には黄体を避けます。</p>	
<p><b>動画⑤ 腔壁と採卵針の角度</b></p> <p>腔壁に採卵針を刺す角度は 90 度（垂直）になるようにします。斜めに針を刺すと余分な力がかかり、針がスムーズに動かなくなります。</p>	
<p><b>動画⑥ 卵胞を画面上部に映し出す</b></p> <p>画面下部に卵胞が映っているときには、動画②のように卵巣をひっくり返して、画面上部に卵胞が映るようにします。</p>	
<p><b>動画⑦ OPU 針の遊び</b></p> <p>針とガイドには隙間があり、針にかかる力によって若干左右にズレてしまいます。また、遠いところにある卵胞を吸引しようとするときにさらにズレが生じます。針にかかる力や卵胞までの距離なども考えながら、採卵する必要があります。</p>	
<p><b>動画⑧ フィルターによる採取液のろ過</b></p> <p>採取液をフィルターでろ過する際の一連の作業です。ろ過する際には、卵丘細胞が剥がれないように、ゆっくりとした速度で行います。洗浄液はフィルターの壁面を伝わらせるように入れていきます。この作業を採取液がきれいになるまで何度か繰り返します。血餅がある場合は、遠沈管に移し、残りの液をシャーレに移します。</p>	

内 容	QRコード
<p><b>動画⑨</b> きれいになった採取液をシャーレに移す際の注意</p> <p>フィルターに付着している卵子や組織を剥がすための作業です。フィルターの中でのピペッティングは、卵丘細胞が剥がれる恐れがあるため行いません。</p>	
<p><b>動画⑩</b> 血餅の処理</p> <p>ピペッティングで血餅をほぐしたり、ハサミで細かく切ったりします。血餅をほぐした後は、フィルターを使って、ろ過します。</p>	
<p><b>動画⑪</b> パスツールピペットで血餅をほぐす作業</p> <p>1 回目の卵子の検索が終わった後にパスツールピペットで採取液を吸ったり吐いたりして血餅をほぐします。</p>	
<p><b>動画⑫</b> 卵子が見えにくく、検索が難しい場合の対処</p> <p>上澄み液を除去することでシャーレの中を見やすくすることができます。その際には卵子を吸ってしまわないように注意が必要です。</p>	
<p><b>動画⑬</b> 卵子の洗浄</p> <p>ピペットで吸引して、卵子に付着している顆粒層細胞を落とします。顆粒層細胞が多く付着している場合は、顆粒層細胞の一部をピペットで押さえて卵子を吸引すると効果的です。</p>	
<p><b>動画⑭</b> 卵子形態のランク</p> <p>A ランク、B ランク、C ランク、D ランクの卵子をそれぞれ画像で紹介しています。</p>	
<p><b>動画⑮</b> 媒精後の卵丘細胞の剥がし方</p> <p>卵子をピペットから吐き出す際にピペットの角度を調節して、卵子がその場で回転するような感じで吐き出していきます。</p>	
<p><b>動画⑯</b> 卵子の洗浄仕上げ（卵丘細胞の除去）</p> <p>動画⑮で使っていたピペットよりもう少し細いピペットで卵子を吸ったり、吐いたりすることで、卵子の周囲についている卵丘細胞を剥がします。ピペットの太さは透明帯の大きさと同じかほんのわずかに太いものを使います（直径で 150 <math>\mu\text{m}</math> くらい）。</p>	
<p><b>動画⑰</b> 卵子の洗浄仕上げ（極体の説明）</p> <p>卵丘細胞の剥離が終わった後、個別培養ディッシュに卵子を入れていきます。卵子の状態を確認して、第2極体が出ている卵子（最も状態が良い）、第1極体が出ている卵子、何も出していない卵子（少し問題がある）など、状態別に分類します。（1:27～1:40の間、一番上の卵子に極体が2つ見えています）</p>	

※本誌に掲載されている QR コードから動画が見られない場合は、(公社)畜産技術協会の HP に掲載されているマニュアル内の QR コードからアクセスして下さい。



