FAQ (frequently asked questions)

よくある質問

1. iSeedingのストローは他社製とどこが違うのですか？

弊社ストローの価格は、国産および外国製の未滅菌バルク（500～2000本単位で販売されている）ストローより高めに設定されています．その理由を下記に順に示します．特に『胚移植／胚凍結保存には滅菌済みストローを用いるべきである』という弊社の理念に基づいて、滅菌バリデーション試験を経て電子線照射線量を決定し、さらに適正な保管条件（直射日光を避け、殺菌灯の紫外線を避け、高温多湿を避けて）ではシールが3年間は破綻しない包材にストローを封入しており、生産原価が高くなっているためです．また、滅菌済みストローを無駄なくご使用いただくために個包装（１本、３本、５本）の３種類を取り揃えています．

販売開始以来、多くのユーザーから弊社製ストローは一切綿栓クズ等が出ないので、今までバルクストローを1本ずつ滅菌蒸留水で洗浄乾燥した後のEOガス滅菌実施、その後のガス抜き期間を気にせず、購入後直ちに使用することができて非常に便利と高評価をいただいています．

また、販売開始以来、綿栓部が固すぎてストロー内容液を押し出すことが出来ない、逆に融解時に綿栓が抜け落ちるなどのクレームもありません．これは、製造工程中の品質管理としてデジタルフォースゲージによって押し圧管理を行っているためです．

発売当初、外側綿栓から液漏れするというクレームがありましたが、それに対しては外側綿栓の長さを長くする、組紐の中心に芯糸を挿入するという対策を講じました．ただ、一気に外側綿栓まで液を吸引すると、融解時に外側綿栓が膨張して思わぬ事故につながりかねませんので、使用上の注意として、内側綿栓、次いでゲル化剤（アルギン酸ナトリウム）が湿った段階で吸引を止めていただくようにお願いをしております．

次頁につづく

電子線滅菌を前提にストローの素材を選択していく中で辿り着いたのがG-PET（グリコール変性ポリエチレンテレフタレート）です．ストロー自体は国内のプラスチック押出成形の企業に製造委託しておりますが、完成したストローは同様の素材を使用している外国企業のストローよりも格段に透明度が高いことから、日本企業の技術力の高さを改めて認識することができました．バルクストローに使用されているPVC（ポリ塩化ビニル）よりも原材料費が高いですが、それを上回るメリットがあります．

時折、他社製ストローの融解時にストローが破裂したとの話を聴きますが、これはほとんどの場合、シールの不備によりストロー中に液体窒素が浸入する／識別プラグを使っている場合はプラグと液の間に空気が残っていることが原因と考えられます．しかし、ストロー自体にひび割れがある場合も融解時の破裂につながりますので、弊社では綿栓を装填する前の工程で、目視により全ストローの外観検査を慎重に行っています．→37頁、38頁参照

自動植氷機能を内蔵したiStraw®の場合、内側綿栓に氷晶核となるヨウ化銀を含浸しています．さらに、氷晶形成確認試験（10%EG液を吸引して、 - 7℃のアルコール槽に浸漬して2分以内に氷晶が形成されたストローを合格として、100%合格することを確認）を行う（次頁参照）など、iStraw®の工程数がもう一方のエムビジブルストロー®よりも多いために価格が高くなっています．

以上述べてきましたように、ユーザーの皆様に安心して弊社ストローを使っていただけるように製造工程、製品検査、梱包の隅々まで目を配っています．今後も製造工程の自動化を含めて製造段階のコストダウンのために不断の努力を行っていきますので、皆様のご理解をお願いいたします．

次頁につづく

iStraw植氷試験

植氷可否（〇=成功，×=失敗）

2024.9.12

本数	植氷結果	本数	植氷結果
1	〇	51	〇
2	〇	52	〇
3	〇	53	〇
4	〇	54	〇
5	〇	55	〇
6	〇	56	〇
7	〇	57	〇
8	〇	58	〇
9	〇	59	〇
10	〇	60	〇
11	〇	61	〇
12	〇	62	〇
13	〇	63	〇
14	〇	64	〇
15	〇	65	〇
16	〇	66	〇
17	〇	67	〇
18	〇	68	〇
19	〇	69	〇
20	〇	70	〇
21	〇	71	〇
22	〇	72	〇
23	〇	73	〇
24	〇	74	〇
25	〇	75	〇
26	〇	76	〇
27	〇	77	〇
28	〇	78	〇
29	〇	79	〇
30	〇	80	〇
31	〇	81	〇
32	〇	82	〇
33	〇	83	〇
34	〇	84	〇
35	〇	85	〇
36	〇	86	〇
37	〇	87	〇
38	〇	88	〇
39	〇	89	〇
40	〇	90	〇
41	〇	91	〇
42	〇	92	〇
43	〇	93	〇
44	〇	94	〇
45	〇	95	〇
46	〇	96	〇
47	〇	97	〇
48	〇	98	〇
49	〇	99	〇
50	〇	100	〇

津山グンゼで実施

２．自動植氷の優位性（ヒューマンエラーが減る確率的数字）とはどういうことを意味しますか？

一般的に、人は適度な緊張感をもって仕事をしていても、1000回に3回、必ずミスをすると言われています．そのミスに気づかず、流出させてしまう見落としのミスが1000分の３あり、これを掛け合わせると100万分の9となります．いくら注意をしても、この100万分の9のヒューマンエラーは避けられないことになります．また、ある研究＊によれば、人間が間違える確率は電話のダイヤル回しで20回に1回、単純な繰り返し作業で100回に1回だと言われています．

＊「ヒューマン・エラーとのつきあいかた」笠原秀樹(2007)鹿島出版会

手動植氷操作は、単純な繰り返し作業ですが、slow freezingでは必要不可欠な作業とされていますので、実施する人はより注意深く実施すると考えられます．しかし、本資料集の22頁「手動植氷時にヒューマンエラーが起る要因」に示したように、手動植氷では技術の標準化が図られていないために、実際の植氷ミスは100回に1回よりも、もう少し高い割合で起こると想像されます．

iStraw®では手動植氷に付随するヒューマンエラーを完全に回避できますので、植氷に不安を抱く必要がなくなります．言い換えれば、iStraw®の出現によって、植氷操作が非常に大切なステップであることの理解醸成が進めば、標準化が進み、手動植氷時のミスが自ずと減少することが期待されます．

YouTube動画

iStraw®による自動植氷

3．iStraw®を使用することによって受胎率が上がりますか？

受胎率が上がる理由を列挙すれば下記のようなことが考えられます.

ア．電子線滅菌済みストローの使用によって、EOガス滅菌ストローと異なり、残留ガスの懸念がない．また、未滅菌ストローとの違いは歴然.

イ．自動植氷のため、①多本数でもほぼ同時に植氷されるため、胚と凍結保存溶液との平衡時間をいたずらに長くしない、②過度の温度刺激を胚に及ぼす危険性が減少する、③ストロー内の氷晶成長速度が一定で理想に近いなどが融解後の胚の生存性に寄与すると考えられる.

ウ．ストローの透明度が高いので、融解後の胚の品質評価がストロー越しに可能になり、胚の有効利用（品質が悪い胚は移植回避できる）に繋がる.

エ．上記の理由のみで受胎率が上がるかどうかは断言できないが、ET技術者に『安心感を与える』ストローであることも重要な要素であると考えられる.

※現時点では、対照区（他社製ストローあるいはエムビジブルストロー®を使用して手動植氷した場合とiStraw®による自動植氷機能を利用した場合を比較したところ、受胎率に差は認められていません（次頁、次々頁の表参照）.

YouTube動画

iStraw®による自動植氷

凍結融解胚の移植《社内試験データ》
複数農家

表１．iStraw®を使って凍結保存された牛生体内胚の移植後の受胎率について(2024年10月30日現在)

	移植数	受胎数	受胎率（%）
iStraw	86	43	50.0
通常のストロー	205	108	52.7

両区間に有意差はみられない（TurkeyのWSD法による）

・iStraw®では、-5.5℃の冷却チャンバーに挿入して-32℃まで緩速冷却を行った（YTフリーザーを使用）.
・通常のストローでは、-5.5℃の液層に浸漬して1分後に手動植氷を行い、-32℃まで緩速冷却を行った（YTフリーザーを使用）.

凍結液：EG 4%、PG 4%、Suc 0.3モル、抗生物質 0.1ml/100ml
アルブマックス添加, 内側綿栓に接する液は0.3モルSuc

試験区および対照区の凍結胚移植試験を実施継続中.

ヤマギシズム生活豊里実顕地農事組合法人の成績
ここに至るまでの途中経過は次頁を参照のこと

YouTube動画
iStraw®による自動植氷

ヤマギシズム生活豊里実顕地農事組合法人での移植試験結果（途中経過）

iStrawを用いた凍結融解胚の移植試験（ヤマギシズム生活豊里実顕地組合農事法人　中江果林さん提供）

試験区	胚種別	使用フリーザー	使用ストロー	植氷操作	移植条件		家畜受精卵移植師＊	移植頭数	うち受胎確認頭数	受胎率(%)
試験区	生体胚	YTフリーザー	iStraw	なし	自然発情	黄体があればET	1人	23	14	60.9
対照区	生体胚	同上	PETS製ストロー	手動植氷	同上	同上	同上	29	16	55.2

2024年2月10日時点、試験は継続中（各区100頭の移植が目標）

＊移植師は固定で、両試験区の移植は同一移植師

受胚牛の品種：ホルスタイン、F1、黒毛和種

受胚牛の産歴：未経産および経産

供胚牛および受胚牛は同一農場で飼養

```
outcome      iStraw PETS Sum
conception     14   16  30
fail            9   13  22
Sum            23   29  52
> chisq.test(x = df$outcome, y = df$straw, correct = F)
Pearson's Chi-squared test
data:  df$outcome and df$straw
X-squared = 0.17057, df = 1, p-value = 0.6796
```

ユーザーの感想

【iStrawのユーザー　三重県津市の農事組合法人】：
夢のようなiStraw®の出現に、これだ！と思いました．多数の胚を凍結する際にも平衡時間を気にすることがなくなりました！

【iStraw®のユーザー　岩手県の開業獣医師】
iStraw®の品質の良さに、使用して良かったと思っています．

《エムビジブルストローのユーザー　鹿児島県のET関連企業》
今まで電子線滅菌済み輸入ストローを使っていましたが、価格面、透明度が高い点が気に入って、ストローをすべてエムビジブルストローに替えました．

《エムビジブルストローのユーザー　F県酪連の人工授精師》：
YTガンに胚を移す際、今まで使っていた輸入ストローの場合、綿栓が固くて押せなくなるので、綿栓の間をストローカッターでカットしていましたが、エムビジブルストローではその手間がなくなるので非常に作業が円滑にできるようになりました．

《エムビジブルストローのユーザー　愛知県の開業獣医師》：
ストローに胚を吸引したら必ず胚の位置を確認していますが、エムビジブルストローでは透明度が高いので胚を探す時間が短縮されました．特に本数が多いときは非常に助かっています．

《エムビジブルストローのユーザー　茨城県の開業獣医師》：
エムビジブルストローはET技術者、特にラボ技術者に安心感を与えるストローだと思います．

《ET関連の技術的な質問の例を挙げてみました》

①　採卵から凍結開始までの生存性を落とさないための許容時間はあるのですか？

採卵してから凍結開始（正確には、-7℃の冷却槽にストローを設置して植氷操作を開始する時点）までの時間は、早ければ早いほど受胎率にプラスに反映すると言えます（つまり、遅くなればなるほど、受胎率が低下する危険性が高くなります）．農場で採卵をして実験室まで持ち帰るまでに一定の時間がかかる場合、少なくとも回収ボトルから受精卵を見つけて、滅菌済みテストチューブに入れた適当な保持用液（等張であること、ろ過滅菌されていること、適度な高分子成分や栄養分を含むこと）内に移す（その後は肌身に付けて温度低下を防ぐ）慎重さが必要です．そうするためには、実体顕微鏡、受精卵フィルター、シャーレ、パスツールピペットなどの受精卵検索ツール一式を農場に持って行く必要があります．回収液に入ったまま数時間放置するのは禁忌です．以前、Theriogenology という米国科学雑誌に、この時間経過と共に凍結・融解後の生存性が低下するという研究論文が掲載されました．それによると凍結・融解受精卵が問題のない受胎率を得るためには、回収液のままでは2～3時間が限度だったと記憶していますが、早ければ早いほど良いとお考え下さい．

弊社公式X

② ストローへの吸引様式を教えてください.

従来から行われている手動による植氷の場合には、できるだけ受精卵から離れたところ（この「できるだけ離れたところ」の意味は、受精卵に手動植氷による温度衝撃を与えない距離という意味です）を冷却して確実に氷晶を作り、その氷晶がストロー内を成長していくことを確認することが絶対必要です．実際、何℃に冷却した金属片をどれぐらいの時間触れさせ、受精卵とどれぐらいの距離を離しておく必要があるのかは明確ではありません．経験的には、1本のストローに対して液体窒素中で5秒間冷却し、ストロー管の液相部分の外壁に3秒間触れる方法では間違いなく植氷が可能です．ただ、凍結保存溶液の見かけの氷点近くで植氷をするとストロー全体に氷晶が行き渡る前に氷晶が消えることがあります．受精卵の位置を肉眼で視認することはほぼ不可能ですので、受精卵の真上を植氷をしないために、複数のカラムを設けて、受精卵を入れるカラムを予め決めておきます．しかし、手動による植氷では失敗したり、受精卵に過度の温度衝撃を与える危険性（液体窒素で冷却したピンセットで挟んだストロー内部の液体温度はおよそ－80℃になります）は常に存在します．空気層の大きさには規定はありませんが、あまり大きすぎると氷晶がストロー全体に行きわたるのに時間を要します．最大でも3mmまでにした方が安全です．1本のストローに連続して凍結保存溶液を吸引すると、気泡部分のストロー内壁が濡れた状態となっているため、氷晶が成長するのに問題はありません．ストロー内に異なる組成の液を吸引する場合は、液が相互に融合しないために、気泡を吸引した直後にストロー断端をキムワイプ等の上に軽く接触させることによって気泡部分のストロー内壁の濡れを除去する手段をとることがあります．こうした場合、例え気泡が上記の3mm以内でも氷晶の成長がストップすることがあるので注意してください.

ストローの全長は、メーカーが異なっても133mmで一定です．メーカーによって多少異なると思いますが、綿栓部とヒートシール部を除くと有効長さは約110mmです．均一な長さのカラム3つ、2つの空気層を各3mm、ヒートシール（閉封）側の空気層を仮に10㎜とするとカラムの長さはおよそ各31㎜となります．この条件下で見た目にきれいに吸引する場合、ストロー断端から約30mmの箇所にマジックインキなどで印をつけておくことによって可能になります．この印まで液を吸引して、3mmの空気層を設けることを反復します（液30mm→空気3mm→液30mm→空気3mm→液30mmの順に吸引する）．一度お試しください.

現在、酪農学園大学の堂地修教授にiStrawを使用した場合の適切な液層カラム配置、長さと受精卵の位置関係が融解後の生存性に及ぼす影響について試験をお願いしています（2024年8月8日時点）.

③　採卵時の注意事項ならびに受精卵処理室の適正温度はいくらに設定するのが良いのですか？

哺乳動物の受精卵は低温（15℃以下）に曝されると細胞膜脂質二重層が不可逆的構造変化を起こし、細胞膜の適正な機能（半透性など）発揮が困難になると言われています．したがって、採卵する現場の温度あるいは灌流液と回収液の保温が大事になってきます．また、受精卵を扱う実験室の温度は最低でも20℃（できれば25℃）に保つことが必要です．ラボの照明も紫外線が出ないLEDランプとそれ対応の照明器具に切り替えるのが良いかも知れません．LED照明でも紫外線が発生するものがないわけではありませんので、注意してください.

ただし、15℃以上をキープしていても、温度の急激な上下は避けるのが賢明です。例えば、室温→35℃→室温は禁忌です.

YouTube動画

iStraw®による自動植氷

弊社公式X

④　受精卵と凍結保存液の適切な平衡時間について教えてほしいのですが、

平衡時間は凍結・融解後の受精卵の生存性に影響します．ただ、これは短ければ短いほど良いと言うのではなく、“平衡”（受精卵の細胞内部に凍結保存溶液が浸入し、凍結保存溶液に移す前の等張保持用液に入っている状態の受精卵とほぼ同じ容積を占めるようになった時点）には、ある一定の時間が必要です．これは、細胞膜透過型耐凍剤（エチレングリコール、プロピレングリコール〈別名：1,2-プロパンジオール〉、グリセロール、DMSO〈別名：Me_2SO_4〉など）の種類、受精卵の由来動物種、受精卵の発育ステージ、シュクロースなどの細胞膜不透過型耐凍剤の存在・濃度に影響を受けます．ただし、最近はダイレクトトランスファーが牛凍結受精卵移植の主流です．ダイレクトトランスファーが可能になった主たる理由は、その動物の受精卵に対して細胞膜透過速度が速い耐凍剤が見つかったことにあります．例えば、エチレングリコール（EG）の場合であれば、耐凍剤は瞬時に牛受精卵細胞内に浸入しますので、収縮→再拡張の過程を実体顕微鏡下で確認することはほぼ不可能です．ですから、1.5MEGが入ったシャーレに牛受精卵を移動し、直ちにストローに吸引して、直ちに凍結処理を行っても理論的には問題ありません．逆に、処理する受精卵の個数が多すぎて、この時間が無駄に長すぎると、室温下では耐凍剤の毒性が受精卵の生存性を損なう危険性があります．EG以外の耐凍剤を使用したり、他の耐凍剤と混合して使用される場合は、その凍結保存溶液に受精卵を浸漬して顕微鏡下で収縮から元の容積への再拡張までの時間を一度計測されることをお薦めします．プロピレングリコールも比較的速やかに牛受精卵細胞内に浸入します．グリセロールの場合、牛受精卵細胞質内に透過するのに室温で15分<の時間がかかりますので、浸透圧ショックを避けるために段階的に濃度を高めていくことが必要です．

iSeeding

弊社公式X

⑤　一般に行われている室温から植氷温度への急冷は問題ないのですか？

現行の牛受精卵の緩慢凍結では、室温で平衡させたストローを－7℃のアルコール液槽／冷却チャンバーに直接に浸漬／装填する方法が採用されています．牛受精卵凍結保存法の開発当初は、室温から分速1℃の冷却速度で‐7℃まで冷却するプログラムが採用されていましたが、Theriogenologyに掲載された研究論文が契機になり、室温から‐7℃に直接浸漬しても生存性に影響はないと考えられるようになり、室温が25℃とすると植氷開始まで、約30分以上の時間の節約が図られました.

YouTube動画

iStraw®による自動植氷

弊社公式X

⑥　ウシ受精卵の slow freezing（いわゆる緩慢凍結法）における適切な植氷温度について詳しく知りたいのですが、

まず植氷の意義をおさらいしておきます．凍結保存溶液の氷点（凝固点）より少し低い温度で人為的に細胞外液に氷晶形成を誘起することによって“細胞外液濃縮”→“浸透圧上昇”→“受精卵の細胞内自由水の細胞外への排出”を促すことにあります．植氷を行わない／植氷に失敗（手動による植氷操作をしたが氷晶が途中で消失する）すると、過冷却が進み通常−12℃付近でストローに吸引した凍結保存溶液全体が瞬時に氷結し、その溶液の氷点近くまで温度が急上昇します（温度センサーでモニタリングするとほぼ垂直に起ち上がります）．この温度上昇は凝固潜熱（溶液が氷結するとその温度帯の高低に拘わらず水と氷の境界線での相変化に伴って発生する熱）によるものです．しかし、この急激な温度上昇自体が受精卵に有害なのではなく、凝固潜熱により上昇したストロー内の温度がプログラムフリーザーの温度（この例であれば、−12℃付近）に追いつこうとして冷却速度が速まることが受精卵に細胞内凍結と言う致死的傷害を及ぼします．受精卵（マウス）の緩慢冷却法では開発当初（1972年）から植氷が行われてきました．最初に植氷を行ったのは、1932年に英国ケンブリッジ大学の Low Temperature Research Station のRobert Chambers and H. P. Hale (Proceedings of the Royal Society B) により行われたという記録が残っています．

植氷操作によっても凝固潜熱が発生します．過冷却が進行した時点での凝固潜熱発生による冷却速度の上昇は細胞内凍結と言う致死的傷害を細胞に与えることから、どういう訳か植氷においても凝固潜熱をできるだけ低く抑える方が良いと誤解されてきました．しかし、植氷において最も重要なことは、氷晶形成が確実に行われ、ストロー中を氷晶が成長して保持時間内（一般的には10分と設定されることが多い）に受精卵が位置する溶液部分が氷晶に覆われることです（氷晶が受精卵に時間的に早く到達した方がよいのか、遅く到達した方がよいのか、それともこのことはあまり融解後の生存性に関係ないのかは、議論が分かれるところです）．一般に、牛受精卵の緩慢冷却法では、耐凍剤は1.5M前後で用いられることが多く、そのモル凝固点降下は下記のようになります．モル凝固点降下は溶質の種類に関係なく溶媒の種類によって決まり、凝固点降下度 $\Delta T_f=K_f$（モル凝固点降下：溶媒に固有）× m（質量モル濃度）の式で計算されます．純水のモル凝固点降下は1.85、したがって純水に1.5Mの耐凍剤を添加した場合は1.85×1.5=2.775℃．ただし、凍結保存容器の基礎溶液は等張液から成っているので、仮に生理食塩水のモル濃度154mmol/Lを用いると1.85×0.154=0.2849、最終的に2.775+0.2849=3.0599℃が凝固点となりますが、-7℃で確実に植氷することによってストロー内を成長する氷晶を形成させ、10分間その温度で保持する方法が推奨されています．その間に発生した凝固潜熱が保持時間内に-7℃に追いつけば、その時の冷却速度の上昇は無視できるほど小さいため、凝固潜熱発生後に受精卵に細胞内凍結を起こす危険性はほとんどないと考えられます．

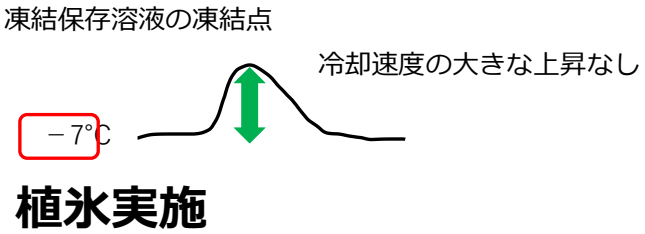
【参考資料】

凝固潜熱の高さを低く抑える（＝できるだけ溶液の凍結点に近い温度を植氷温度に設定する）ことが融解後の胚の生存性を損なわない要因のひとつだと誤解されている！

誤解の原因

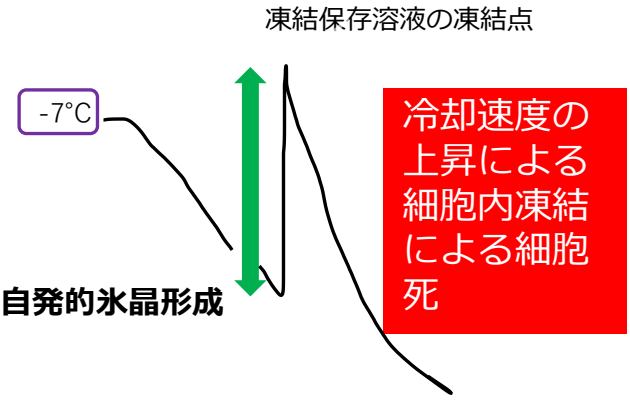
植氷あり vs. 植氷なし
（冷却曲線の対比）

凝固潜熱の発生あり



植氷実施

凝固潜熱の発生あり



凝固潜熱の大きさが胚にダメージを与えるのではなく、最高点から冷却槽の温度に追いつく際の冷却速度の上昇が胚にダメージを与える！

したがって、植氷操作の意義は確実に細胞外液に氷晶を形成させることであり、そのためには - 7℃が安全確実な氷晶形成を保証する温度である.

⑦　植氷後の緩慢冷却の意義について教えてください.

植氷は、凍結保存溶液の氷点（凝固点）より少し低い温度で人為的に細胞外液に氷晶形成を誘起することによって“細胞外液濃縮”→“浸透圧上昇”→“受精卵の細胞内自由水の細胞外への排出”を促す契機になります．しかし、受精卵の細胞内自由水の脱水を効果的に進めるには液体窒素に投入する温度まで、その細胞膜透過性に見合った速度で冷却することが必要です．通常は、分速0.3℃で‐30℃までとします．プログラムフリーザーの到達温度を‐30℃としておくと、機種によってはなかなか‐30℃に到達しない場合がありますので、設定温度は‐32℃としておき、冷却が終了する時刻の少し前から温度を観察して‐30℃になったら液体窒素に投入する方法が適していると思います．この液体窒素投入する直前の温度やそれまでの冷却速度について過去多くの研究者により試験が行われてきました．脱水を進めたいときは冷却速度をやや遅めにするか、液体窒素に投入する直前の温度を低くするかで対応できます．したがって、牛桑実胚と牛拡張胚盤胞とでは、冷却プログラムは異なっても良いかも知れません.

⑧　液体窒素への投入時の注意点について教えてください.

素早く確実に投入するのが基本ですが、素早く確実に行うためには、発泡スチロール製の適当な間口の容器に液体窒素を入れておき、そこに緩慢冷却が終了したストローのストロー端を-冷却した（液層フリーザーをお使いであれば、-30℃になったアルコール槽に数秒間入れる）ピンセットで挟んで、素早く投入します．液体窒素タンクのキャニスターに直接入れるのは、「素早く」と言う点から考えると狙いを定めるのに時間を要し、室温に曝される時間が長くなり危険です．富士平工業製のフリーザーではストローを水平にして冷却を行えますが、液体窒素に投入する際は垂直に近い状態にすると液体窒素に投入する操作がより円滑に行くと思います．ヤマネテック社製のYTフリーザーではチャンバー内で水平状態にあるストローを1本ずつ確実に把持して液体窒素に投入します．本番前に一度、ダミーストローを準備してこの操作をシュミレーションすることをお薦めします.

⑨　アルコール槽式プログラムフリーザーのメンテナンスについて教えてください.

メーカーによる機械的なメンテナンスは別途必要ですが、ここでは冷却終了後のアルコール（無水エタノールか無水メタノールが使われる）のメンテナンスについてお話しします．その日の凍結保存作業が終了したら、アルコールは全量を密閉容器に回収するようにします．特に梅雨時期から夏季にかけては湿度が高いので、アルコール槽に放置したままにしておくと、アルコールが吸湿し、その結果冷却性能が低下します．そのまま放置されている場面を目にすることがありますが、禁忌です．これはそのラボの品質管理および意識の高さを測るひとつのチェック項目です.

⑩　プログラムフリーザーの表示温度の校正は必要ですか？

1年に1回程度は、表示温度が正しいのかどうか製造元に依頼して校正することをお薦めします．あるいは、温度校正をした熱電対や白金測温抵抗体のセンサーで測定して、プログラムフリーザーの表示温度の精度を確認しておくことが必要です．氷を入れた純水中、氷が融解しないで残っている温度を0℃、液体窒素の温度を－196℃として、2点較正する簡便法もあります.

YouTube動画

iStraw®による自動植氷

English version

⑪　ストロー中を成長する氷晶の色がストローによって異なるのはなぜですか？

ものの色が見える仕組みを考えると、白い光にはさまざまな色の光が含まれていて、物体に当たると特定の色の光だけが反射します．つまり他の色の光は吸収され、その特定の色が物の色として見えます．このとき、物体の表面にとても細かな凹凸があると、光はいろいろな方向に反射します（乱反射と言います）．これは物体に吸収される前の白い光なので、反射する光に白い光が多くなります．反射した光全体で見ると、少し白っぽくなり、色が薄く見えることになりなす．一方、表面に薄い水の膜ができ、凹凸が埋まって滑らかになると、表面の乱反射が減るため、反射して目に届く光から白い光が減り、濃く見えることになります．しかし、この色の違い（表面の凹凸の多寡）が受精卵の生存性にどう影響するかは解明されていません．各メーカーのストローは大まかに3種類の素材からなっています；ポリ塩化ビニル樹脂（PVC）、グリコール変性ポリエチレンテレフタレート樹脂（G-PET；弊社のストロー）、ポリアミド樹脂（＝ナイロン）などです．これら素材の違いによってストロー内の氷晶の色が異なるのかどうかは私自身比較したことがありません．

⑫　私の事業所ではストローを始め、子宮灌流用チューブ類のEOガス滅菌を自家で行っています．その場合に気をつけなければいけない点を教えてください．

EOガス滅菌は、液体以外のほとんどすべての製品に適用でき、非常に便益性が高い滅菌方法です．しかし、ガス抜き期間（＝エアレーション期間）には気をつける必要があります．そのご質問にお答えするのに格好の試験結果があります．第15回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会（富山県）の講演要旨集からです．次頁と次々頁をご覧ください（概略は13の1でも述べました）．

結論を申し上げますと、受精卵用ストローをEOガス滅菌した場合、ガス抜きを50℃24時間（自動EOガス滅菌機ではプログラムに組まれている）＋その後室温で行う場合は8週間が必要です．一貫して50℃で行う場合は2週間のエアレーション期間が必要ということになります．

受精卵が一瞬で通り過ぎる子宮灌流用チューブ類よりも受精卵が一定時間閉じ込められるストローのガス抜きはより完璧にする必要があります．次頁と次々頁を参照のこと

19 EOガス滅菌後の胚移植ストローに対する加温処理が胚の生存性に及ぼす影響

Effect of heat treatment for EO gas sterilized plastic straw on survival of *in vitro*-produced bovine embryos.

○遠山牧人・今井　敬[1)]・小林修司・新納正之・橋谷田豊
金山佳奈子・米内美晴・小島敏之
（農林水産省家畜改良センター・[1)]現農林水産省畜産試験場）
○ Makito TOHYAMA, Kei IMAI [1)], Syuji KOBAYASHI, Masayuki SHIN-NOH
Yutaka HASHIYADA, Kanako KANEYAMA, Miharu YONAI, Toshiyuki KOJIMA
(National Livestock Breeding Center, [1)] National Institute of Animal Industry)

【目的】胚移植ストローなどの非耐熱性プラスチック製品の滅菌にはエチレンオキサイド（EO）ガス滅菌が用いられているが、滅菌物に浸透したEOガスが長期間に亘り残留し、胚の生存性に悪影響をもたらすことが漠然と危惧されている[1)]。しかし、このEOガス滅菌物を50～60℃前後に加温することでより早く残留EOガスを除去することができると言われている。本調査ではEOガス滅菌後の胚移植ストローに対する加温処理が胚の生存性に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】家畜改良センターの常法により牛体外受精胚を生産した。その牛胚を用いて以下の実験を行った。

実験①：供試胚は体外培養7日目および8日目（媒精日を0日目とする）の胚盤胞（Bl）および拡張胚盤胞（Exp.Bl）とした。この胚を0.1 mM β-メルカプトエタノール（β ME）を添加した20％牛胎子血清（FCS）加TCM199を用いて胚移植ストロー（IMV社製、0.25mlストロー、AAA:201）内またはマイクロドロップで38.5℃、5％ CO_2 in airの気相条件で72時間培養し、脱出胚盤胞（Hed.Bl）まで生育した胚を生存としてHed.Bl率を求め、その差を比較した。

胚移植ストローは、EOガス滅菌後室温で放置したもの（無処理区）とEOガス滅菌後50℃24時間加温した後に室温で放置したもの（加温処理区）を用い、それぞれの保存期間（0週、4週、8週）における胚の生存性を調査した。また、対照区としてEOガス滅菌後3～6ヶ月室温で放置したストローでの培養（ストロー対照区）およびマイクロドロップでの培養（マイクロドップ対照区）を行った。培養液量はストロー、マイクロドッロプ共に100 μl とし、胚は100 μl 当たり3～5個の培養密度とした。

実験②：供試胚は体外培養7日目および8日目のExp.Blで形態的品質がGoodのものとした。この胚を実験①と同様の方法により培養し、Hed.Blまで生育した胚を生存としてHed.Bl率を求め、その差を比較した。

胚移植ストローはEOガス滅菌後2週間室温で放置したもの（非加温区）とEOガス滅菌後2週間50℃で連続的に加温したもの（加温区）を用い、それぞれの胚の生存性を調査した。対照区および培養液量等の設定は、実験①と同様の方法を用いた。

実験①および②におけるEOガス滅菌は酸化エチレン濃度10w/w%のボンベ（ノン

バクト-E）を接続した、Zクレーブ　E－3（三浦工業株式会社製）で行った。滅菌条件は加湿下で缶内圧力 1 kg/cm²、60 ℃、15 時間とし、洗浄は 500 mmHg の高真空条件で 15 回とした。また、加温処理は理化学用恒温器（三洋電機株式会社製　MIR-151）で行った。

【結果および考察】実験①の結果は表 1 のとおりであった。加温処理の有無に関わらず、滅菌後 8 週間で対照区とほぼ同レベルの濃度まで EO ガスが除去されることが明らかとなった。また、室温放置の状態よりも迅速に残留 EO ガスを除去するためには 50 ℃、24 時間の加温処理では時間的に不充分であり、より長い期間加温処理を続ける必要があると思われた。実験②の結果は表 2 のとおりであった。加温区は Hed.Bl 率が 90.0 %とマイクロドロップ対照区およびストロー対照区と比べ差はみられなかった。一方、非加温区はマイクロドロップ対照区、ストロー対照区および加温区に対して Hed.Bl 率が 42.3 %と低く、その差は有意であった（$P<0.01$）。以上の結果から、今回の滅菌条件において胚移植ストローから残留 EO ガスを除去するためには 50 ℃で 2 週間加温処理をすることが有効と思われた。今後は実験②の結果をふまえ、加温処理の期間が 2 週間よりも短縮できるかどうかについて検討する必要がある。ただし、EO ガス滅菌装置の機種や被滅菌物の材質により残留 EO ガス濃度が異なるため、それらの条件が異なる場合には今回の成果をそのまま適用するのは避けた方が良いかも知れない。

表 1．50 ℃ 24 時間の加温処理の有無と保存期間による胚の生存性．

		培養 72 時間後のステージ				
	胚数	Exp.Bl	Hing.Bl	Hed.Bl	Deg.	Hed.Bl 率
ﾏｲｸﾛﾄﾞﾛｯﾌﾟ対照区	58	13	3	41	1	70.7 a
ｽﾄﾛｰ対照区	83	10	3	65	5	78.3 a
無処理区（0 週）	15	0	0	0	15	0.0 c
加温処理区（0 週）	27	0	0	0	27	0.0 c
無処理区（4 週）	34	3	0	10	21	29.4 b
加温処理区（4 週）	44	5	3	18	18	40.9 b
無処理区（8 週）	25	1	3	20	1	80.0 a
加温処理区（8 週）	25	1	2	21	1	84.0 a

a>b>c：異符号間においてそれぞれ 2.5%水準で有意差有り．

表 2．50 ℃ 2 週間の加温処理の有無による胚の生存性．

		培養 72 時間後のステージ				
	胚数	Exp.Bl	Hing.Bl	Hed.Bl	Deg.	Hed.Bl 率
ﾏｲｸﾛﾄﾞﾛｯﾌﾟ対照区	54	2	0	52	0	96.3 a
ｽﾄﾛｰ対照区	54	3	0	51	0	94.4 a
加温区	50	1	1	45	3	90.0 a
非加温区	52	2	2	22	26	42.3 b

a>b：異符号間において 1%水準で有意差有り．

【参考文献】1) T.Takeda, L.J.Kennel and J.F.Hasler ;Theriogenology, 1987, 27: 286.

⑬　iStraw® の開発経緯を教えてください.

弊社代表取締役が人工降雨の種まき剤として利用されているヨウ化銀（純水中−4℃で氷晶形成する性質を有することから氷晶形成有機剤としての利用を思いついた）を家兎桑実受精卵の凍結保存の植氷時の氷晶形成誘起核として利用して（手動植氷なし）凍結保存し、融解受精卵から子ウサギを得た報告（T. Kojima et al., Theriogenology 26:341-52,1986）に端を発しています．その後、ヨウ化銀をアルギン酸カルシウムドロップレット内に固定化して利便性を高める改良を行って、牛受精卵と家兎受精卵から子を生産しました（T. Koima et al., Theriogenology 30:1199-207,1988）．その後、豚受精卵の凍結保存にこの手法が使われ、当時、成功の確率が低かった凍結・融解豚受精卵からの子豚生産に成功しました（Y. Fujino et al., Cryobiology 30:299-305,1993）．その後、わが国の複数の県の畜産試験研究機関で豚精液の凍結保存試験ならびに米国コーネル大学での牛精液の凍結保存試験に利用されたことが報告されています.

現代表取締役が鹿児島大学を退職した直後、株式会社COWOXの代表と株式会社AnimoScienceを設立し、その事業のひとつとして、再び自動植氷の研究に着手しました．当初は、氷晶形成温度がヨウ化銀よりも高い氷核結晶細菌の利用を考え、農林水産ジーンバンクから供与を受け、岐阜大学農学部の岩橋仁教授や門上技術開発研究所所（函館市）所長の門上洋一先生のアドバイスを得て鋭意取り組みましたが、常温環境でその氷晶形成能力が失活することがネックとなり氷核結晶細菌の利用を断念しました．そして、再びヨウ化銀による自動植氷の研究に取り組むことになりました.幸い、グンゼ株式会社の全面的協力を得て、ストロー管自体に自動植氷機能を持たせることを基本コンセプトとして開発に取り組みました．当初は、市場の大きさから牛精液の凍結保存への利用を考え、家畜改良事業団家畜改良技術研究所のご協力を得て、実験を繰り返しましたが、現状の冷却プロトコルでは、牛精液の凍結保存に対する植氷の意義を見出すことができなかったために試験を中断して、実績がある受精卵をターゲットに自動植氷ストローの開発に集中して取り組むことになりました.

⑭　iStraw®利用の直接的な利点について教えてください.

iStraw 利用の直接的な利点として下記のことが挙げられます： ① 手動植氷時の諸々の**ヒューマンエラー＊**が回避できる（表にまとめましたので、ご参照ください） ② 手動植氷の手間が省ける（液体窒素の準備も含めて；液体窒素がない環境でも植氷が可能→スペースシャトル内での受精卵凍結実験） ③ 所要時間の節約ができる；植氷に要する時間（特に、多本数のストローを凍結する場合）＆植氷温度で保持する時間（∵すべてのストローがほぼ同時に植氷されるため） ④ 平衡時間（受精卵を凍結保存溶液に浸漬～氷晶が受精卵を含むカラム全体を覆う）を短縮することができる ⑤－7℃で自然に発生する氷晶の成長速度（およそ1cm/分）が理想的なため、受精卵からの効果的な脱水を促す ⑥内側綿栓部から氷晶が発生するため、内側綿栓に接する液に保存溶液よりも高い温度で氷結する液を用いることによって‐7℃よりも高い植氷温度設定が可能である.

また、酪農学園大学の堂地修教授によるiStrawのストロー内氷晶成長速度測定により、その速度がが理想的な値に近いことが報告されています（下図参照）.

＊手動植氷時にヒューマンエラーが起る要因
ヒューマンエラー4つの要因 & 考えられる影響

要因	内容	結果
認識の欠如	ミスした本人が認識していない. または本人でミスを修復しているため周囲が認識できない.	ヒューマンエラーが認識されず潜在化する.
標準の欠如	スポット作業なので「標準」を設けずに作業を続ける.	ヒューマンエラーが定義されず放置状態となる.
標準の不備	標準を順守する目的や指示内容が曖昧、NGの定義が不明確	作業者の解釈に依存するため、ヒューマンエラーが多様化する.
教育・訓練、適正の不足	作業者への教育・訓練が不足すると同時に適正判断が困難である.	ヒューマンエラーを回避することが難しくなる.

※「標準」：液体窒素に何秒間浸漬した金属（例えば、ピンセット）をストロー外壁のどの部分に何秒間、どの程度の力で触れるかについての標準のこと

㈱AnimoScience社製自動植氷ストロー「iStraw」の植氷発生確認試験結果

- 凍結媒液（FM）：1.5Mエチレングリコール ＋ 0.1Mショ糖 in ダルベッコPBS+20%CS
- 凍結器：アルコール液槽式（FHK-ET-1N）
- 氷晶発生確認

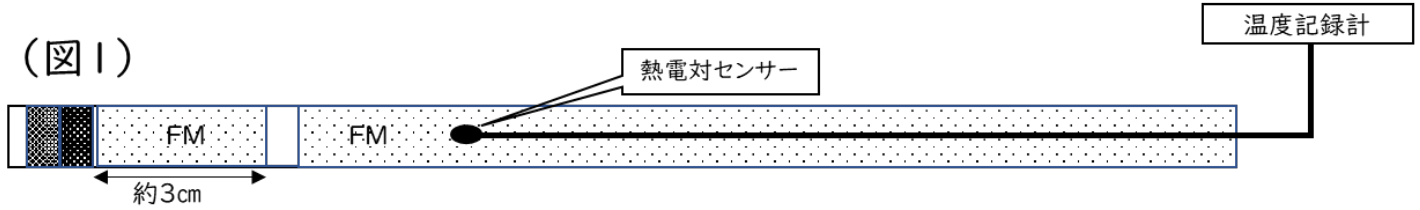
① 氷晶発生確認方法：凍結媒液をストローに吸引（図1）し、熱電対センサーをストロー内に挿入して、凍結器のチャンバー内のストローラックに装填した時間を0秒として、目視で氷晶発生を確認した時間

✓ 結果：1回目：54秒、2回目：28秒、3回目：38秒

所見：

- 3回の実験とも1分以内に氷晶発生を確認
- 氷晶発生時間に差があった理由として、ストローパウダーの重点密度の差が影響した可能性が考えられた（FMをストローに吸引する際にパウダーを超えてFMが吸引されるストローがあった）。
- また、ストローをチャンバーに浸漬した時のチャンバー内のアルコール液槽の状況（アルコール液の対流の強弱がチャンバー内で一定でないこと）が影響した可能性も考えられた。
- しかし、氷晶発生時間の差は、受精卵の生存率や受胎率に影響する可能性は皆無と判断された。

（図1）



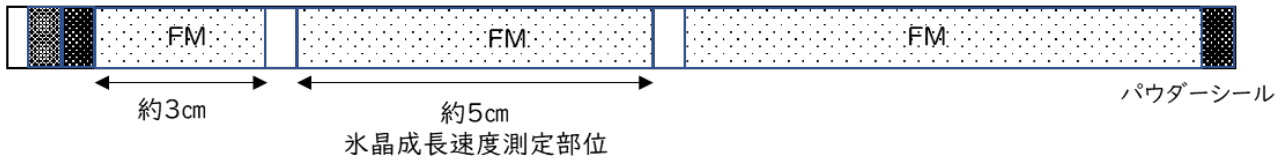
②氷晶成長速度の測定

ストロー内に5cmのFM層を作り（図2）、自動植氷後、氷晶が5cmのFM液層に侵入し、次の空気層（5cm層全体）に氷晶が完全に到達するまでに要した時間を測定

✓ 結果：1回目：1.31cm/分、2回目：1.22cm/分

所見：理想的な氷晶成長速度は毎分1cm程度とされていることから、ほぼ理想に近い値と判断される。氷晶成長速度は、凍結媒液（濃度）の種類によって異なることから、本実験で使用したFMに適した氷晶成長速度であるとも判断される。

（図2）

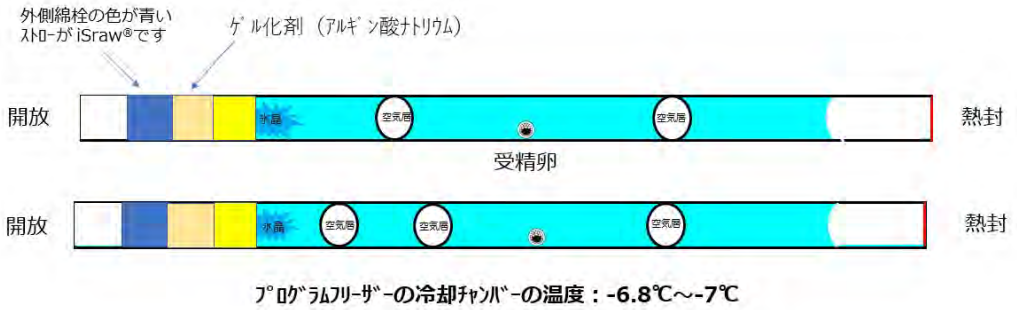


YouTube動画
iStraw®による自動植氷

⑮　iStraw®への凍結保存溶液と受精卵の吸引方法について教えてください.

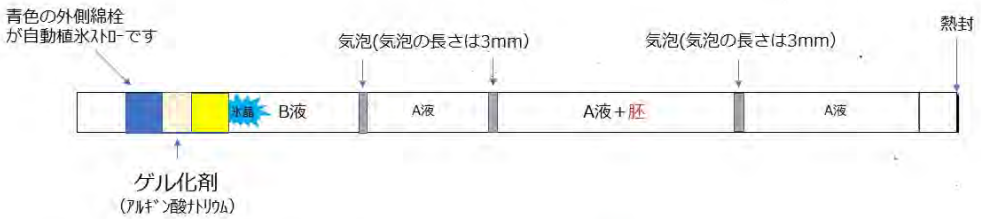
iStraw®（自動植氷ｽﾄﾛｰ；self-seeding straw）への受精卵と液の吸引様式

※下図のように、ｽﾄﾛｰ内に吸引する溶液すべてが耐凍剤1.5M前後を含む場合は、-6.8℃～-7℃で保持してください。
※※各ｶﾗﾑの長さは任意ですが、空気層の長さは3mm以下としてください。
　∵形成された氷晶が空気層を超えて確実に次のカラムに達するようにするため



ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑﾌﾘｰｻﾞｰの冷却ﾁｬﾝﾊﾞｰの温度：-6.8℃～-7℃

iStraw®を使って植氷温度を-6.8℃くに設定した際の推奨ストロー吸引方法
製AnimoScience



※各カラムの長さは任意ですが、空気層の長さは3mm以下としてください。
　∵B液（例えば、0.1M～0.3MSuc）で形成された氷晶が気泡を超えて確実に次のカラムに達するようにするため。
※※胚が入っているカラムとB液の間に凍結媒液（A液）のみのカラムを入れる。
　∵最初に吸引するB液によって胚を含むA液が希釈されないようにするため。
※※※すべてのカラムをA液とする場合は、-6.8～-7℃での植氷が適切（前ｽﾗｲﾄﾞ参照）

国内では、主に富士平工業製のアルコールバス式プログラムフリーザーとヤマネテック製のYTフリーザー（乾式）が使われていますが、iStraw®はどちらのフリーザーでも使用していただけます。また、外国製の簡易凍結機にはストローをホルダーに垂直に保持するタイプがありますが、こちらにも使用可能です。
もし使い方を確認されたい方は、下記にお問合せください
→ 090-9546-1961 もしくは k1887523@kadai.jp

YouTube動画

iStraw®による自動植氷

⑯　自動植氷の氷晶核にヨウ化銀を使用されていますが、受精卵に悪影響はないのですか？

農研機構畜産研究部門の緒方和子研究員にお願いして、牛体外受精受精卵を弊社のiSeed（ヨウ化銀をアルギン酸カルシウムで固定化したビーズ）と共培養してその発育成績を対照区と比較していただきました．その結果を下記の表に示します．

結論

ヨウ化銀は牛体外受精受精卵との共培養成績において、すべての指標で対照区と差はみられなかったことから、ヨウ化銀は牛受精卵の凍結保存用の氷晶形成誘起剤として使用しても問題がないことが明らかになりました．しかし、今後も産子生産率なども追跡調査をして異常が認められないかどうかを調べて行きます．ヨウ化銀は人工降雨の氷晶核としてり現在もわが国を始め多くの国で利用されている他、その殺菌性能等を利用して動物医薬品分野、抗菌フィルター等にも利用されています．

日本動物医薬品協会が定めている受精卵用ストローに課せられている溶出物試験等についてもすべての項目で「適合」でした．次頁から3ページ参照.

YouTube動画

iStraw®による自動植氷

弊社公式X

氷晶核として用いているヨウ化銀（AgI）が
牛体外受精卵の発育に及ぼす影響-1
（共培養試験；自家試験）

iSeed： Silver iodide alginate gel dropletを指す.

表1. 牛体外受精卵と iSeed の共培養の結果-1

	卵割/培養卵			
	あり	なし	%	計
対照区	85	24	78.0	109
共培養区	96	23	80.7	119
計	181	47		228

有意差はみられない（P=0.6159）

表2. 牛体外受精卵と iSeed の共培養の結果-2

	胚発生/培養卵			
	あり	なし	%	計
対照区	33	76	30.3	109
共培養区	43	76	36.1	119
計	76	152		228

有意差はみられない（P=0.34851）

表3. 牛体外受精卵と iSeed の共培養の結果-3

	胚発生/卵割卵			
	あり	なし	%	計
対照区	33	52	38.8	85
共培養区	43	53	44.8	96
計	76	105		181

有意差はみられない（P=0.41683）

氷晶核として用いているヨウ化銀（AgI）が
牛体外受精卵の発育に及ぼす影響-2
（共培養試験；自家試験）

iSeed： Silver iodide alginate gel dropletを指す.

表4. 牛体外受精卵と iSeed の共培養の結果-4

	脱出胚/胚盤胞			
	あり	なし	%	計
対照区	14	19	42.4	33
共培養区	27	16	62.8	43
計	41	35		76

有意差はみられない（P=0.34851）

表5. 牛体外受精卵と iSeed の共培養の結果-5

	脱出胚/培養卵			
	あり	なし	%	計
対照区	33	76	30.3	109
共培養区	43	76	36.1	119
計	76	152		228

有意差はみられない（P=0.07747）

溶出物試験は動物用医療機器基準（平成17年4月1日；社団法人日本動物用医薬品協会）の「XVIII 動物用受精卵用ストロー管」に課せられている試験です.

溶出物試験結果：

（2022年10月3日：住重アテックス株式会社つくばセンター）
サンプル：iStraw®

ア）外観及び pH ･･･**適合**
サンプル→ブランクとサンプルの差：1.00（基準2.0以下）

イ）重金属･･･**適合**
→試験液の色は比較液よりも濃くなかった.

ウ）過マンガン酸カリウム還元性物質･･･**適合**
サンプル→ブランクとサンプルの消費量の差：0.9mL（基準2.0mL以下）

エ）蒸発残留物･･･**適合**
サンプル→残留物量：0.4mg（基準1.0mg以下）

iStraw®サンプルにおいて**全ての項目で適合！**

YouTube動画
iStraw®による自動植氷
English version

⑰ iStrawとエムビジブルストローの品質管理の要点について教えてください.

① 外観検査（目視による汚れ、傷等を全数検査）と寸法検査（抜取）で合格したストローのみ次の工程へ
② ストローの溶液吸引部分の長さの均一性検査の結果、不具合があれば修正して次の工程へ
③ 10%エチレングリコール溶液（生理食塩水）をストローに吸引後、‐7℃（プログラムフリーザーのアルコールバス）に浸漬後2分以内に氷晶形成が開始されるか確認する（当社独自試験による抜取検査方式；ロット適合判定は自社管理基準にて運用）
④ ①、②、③の試験後、デジタルフォースゲージ（ZTS-５N、イマダ）により4～５ニュートンの力で押し出されるかを確認
⑤ 押し出された液を35mmディッシュに空け、夾雑物の有無を検査
⑥ 上記の④、⑤の各検査で合格したストローを包材に熱封（20mm幅；清浄な環境下でグローブを装着して手作業で行う）
⑦ 包材に封入されたストローの外観、綿栓位置等を目視による検査後、パッケージに詰めて電子線滅菌（住重アテックス）工程へ

※エムビジブルストローについては、ストローの寸法および材質はiStraw®と同一ですが、氷晶形成機能は具備していないので、③の検査は行っていません．また、⑤についても③の付随検査として実施しているため、エムビジブルストローでは実施していません.

押し圧管理に用いる
デジタルフォースゲージ

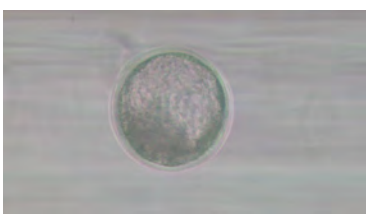
⑱　iStrawとエムビジブルストローの透明度は非常に高いですが、どう言うメリットがあるのですか？

開発に当たり最も重要視した要件のひとつは、電子線滅菌済みのストローとすることでした．しかし、電子線照射をするとプラスチック素材の中には黄変するものがあることがわかり、この黄変（≒材質劣化）を起こさない素材を探した結果、最終的にG-PET（グリコール変性ポリエチレンテレフタレート：コポリエステルの一種）に辿り着きました．G-PETを使ってのストロー製作を国内のプラスチック押出成形を専門とする企業にお願いをした結果、非常に透明度の高い均一なストローが出来上がってきました,G-PETを使っているとパッケージに記載がある外国製ストローと比べた場合、明らかに透明度が異なることがわかりました.日本の技術の高さを証明するものだと思います.

G-PET製ストロー表面のデジタル顕微鏡写真画像の比較

エムビジブルストロー® & iStraw®

外国製G-PETストロー



ストローの透明度が高いと、①ストローに吸引した受精卵を即座に見つけることができる（個数が多い場合は、その時間が累積するので無視できない）、②ダイレクトトランスファーの場合、ストロー越しに受精卵の品質を従来のストローよりも正確に評価できる、③このことは受精卵の有効利用につながる（完全に死滅した受精卵の移植を中止する、品質が非常に高い受精卵はより良好な状態のレシピエントに移植するなど）がメリットと考えられます.

⑲ iSeeding ではなぜ個包装1本、3本、5本を取り揃えているのですか？

外国製の滅菌済み受精卵ストローのほとんどは個包装5本の1種類ですが、例えば、受精卵が4個しか採取できなかった場合、１本を余らせてしまうことになります．使用するストロー4本を無菌的に取り出して直ちに封をしたとしても残りの1本の滅菌状態は破綻していると考えるのが妥当です．そこで弊社では、1本、3本、5本を取り揃えておくことによって、採取できた受精卵の個数に応じて、滅菌済みストローを無駄なく使うことができると考えました．今まではストロー単価に差がありましたが、この度価格差をなくしましたので、弊社の滅菌ストローへのこだわりがユーザーにより強く伝わることを期待しています．

⑳ iSeedingの滅菌済みストローの品質の良さは理解できましたが、未滅菌のバルクストローをそのまま使っておられる事業所があります．iSeedingがストローにそれほどこだわる意味を教えてください．

受精卵移植師資格を取得するために受講しなければならない講習会用テキストには、受精卵移植に用いる器具・機材は適切な方法で滅菌したものを使用すると記載されています（日本家畜人工授精師協会刊の家畜人工授精講習会テキスト；家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編の100～107頁、116～120頁）．ストローについては詳しく書かれていませんが、採取した受精卵を新鮮移植する場合及び採取した受精卵を凍結保存して融解後に深部注入用移植器に充填する場合を考えると受精卵が比較的長時間納まっている容器と考えることができますので、滅菌ストローの使用ならびにその滅菌条件に拘る理由が明確に存在します．移植された受精卵の受胎性確保ならびに意図しないレシピエント牛の子宮内感染を予防するためにストローの滅菌、滅菌保証のあるストローの使用は絶対に必要です．

㉑　ストローの電子線滅菌をするに当たって、滅菌バリデーション試験をされたとありますが、具体的にどういう試験ですか？

滅菌バリデーション試験では、①ストローに既知の菌数を入れて回収率の測定、②バイオバーデン試験（滅菌前のストロー中の細菌数算定）、③その結果に基づく電子線照射線量の決定、④検定線量の決定、⑤電子線照射を実際に行うパッケージ内での線量分布試験を経て、商業的電子線照射線量を決定しています（実際は25kGy）.

一般的に動物医療機器を滅菌する場合、滅菌保証レベル10^{-6}（100万個の製品の中に発育可能な菌が付着している製品が1個以下）を確保するため、科学的に妥当性を検証（バリデーション）して設定した滅菌条件にて実施する必要があります．この点、受精卵処理を行う事業所では、ストローを始めとするEOガス滅菌対象器材に対しては厳密な意味でのバリデーションは行われていないのが現状です．弊社が販売しているiStraw®とエムビジブルストロー®は残留ガスの懸念が一切ない電子線滅菌方式を採用していますが、滅菌を外注している住重アテックス（株）に滅菌バリデーション試験を依頼したうえで適切な線量を決定しています．また、両ストローの包材を製作しているメイワパックス（株）にて包材のシール強度についても促進耐候試験を実施して、滅菌保持期間を示しています.

㉒　iSeeding製ストローにインクジェットプリンターで印字可能ですか？

耐アルコールMEKフリーインク（有機則非該当インク）で数字や各記号を表面に印字した弊社ストローを10分間無水エタノール（-7℃）中に浸漬した後に取り出して印字の状態を確認しましたが、印字状態は良好に保たれており、擦っても印字が消えることはありませんでした.

㉓ 有限会社iSeedingが製造販売するストローが他社製品と異なる特徴を教えてください.

まず、自動植氷機能を内蔵したストローであるiStraw®を世界で初めて開発したことです.

2番目は、滅菌バリデーション試験を行ったうえで電子線照射量を決めた電子線滅菌済み製品であることです．個包装5本、3本および1本を取り揃え、滅菌済みストローを無駄なく使っていただけることも他社にはない特徴です．包材のシール強度も耐候促進試験済みです.

3番目は、完全に日本国内で製造していますので、為替変動、国際物流の影響を受けにくいことです.

4番目は、メーカー直販体制ですので、ユーザーの声に対して迅速に対応できることです.

5番目は、素材にG-PET（グリコール変性ポリエチレンテレフタレート）を使っているためにストローが高い透明度を有していることです.

以上の結果、ストロー単価が従来の未滅菌バルクストローと比べて高くなっていますが、その価格差を超えてユーザーの皆様に安心感を持っていただき、結果的にユーザーや農家の皆様に高い費用対効果を実感していただけると確信しています．また、今後も製造部門のコストダウンに不断の努力を傾注し、より利用しやすいストロー価格にするように全力を傾けます.

“たかがストロー、されどストロー”のこだわりを大切にして行きたいと思っています.

YouTube動画

iStraw®による自動植氷

English version

㉔ ストローの価格差と受胎率の差が経営に及ぼす影響について、お考えがありましたら教えてください.

例を挙げて仮説となりますことを予めご了解ください．受胚牛100頭を飼養している農家を対象とした場合を想定します.

iStraw®（税込み価格385円）と未滅菌バルクストロー（税込み価格11円）を受精卵の凍結にそれぞれを使用して、前者の受胎率が56%、後者の受胎率が55%と仮定します（この1%の差は自動植氷の有利性、滅菌効果、移植直前の胚の品質評価の正確性等から妥当性のある数字だと考えます）．黒毛和種子牛価格を平均624,158円（茨城県全農統計資料2023年度）とします.

ETを上記の受胚牛群100頭に対して受胎するまで計6回反復して行うと仮定すると、iStrawでは計179回（56/100 → 44×0.56/44 → 20×0.56/20 → 9×0.56/9 → 4×0.56/4 → 2×0.56/2；分母合計179回）、バルクストローでは計184回（55/100 → 45×0.55/45 → 21×0.55/21 → 10×0.55/10 → 5×0.55/5 → 3×0.55/3；分母合計184回）の移植を行う必要があります．したがって、各ストローにかかる経費は、iStraw® 68,915円（＝385×179）、未滅菌バルクストロー 2,024円（=11×184）で、ストロー経費の差は66,891円となります．iStraw®ではETを最大6回反復する間に受胎する牛の頭数は56+24＋11＋5+2+1=97頭に対し、バルクストローでは55+24+11+5+2+1=96頭で、iStrawを使用した方が受胎頭数は1頭増える計算になります.

弊社公式X

その結果、受胎した全受胚牛が無事に出産に至ればiStraw®を使用した場合、バルクストローよりも１頭多く生まれることになります．出生子牛１頭増は624,158円の収入増となります．しかし、上記のストロー経費差額を計算に入れた場合、収入増は624,158円－66,891円＝557,267円です．また、iStraw®を使用した場合は184回ー179回＝5回のET経費（移植器等の機材費、人件費、労働時間等プラスα）が節約できます．ただし、子牛市場出荷までの9カ月間の飼養管理費が別途必要になりますので、1頭当たり生産費を425,000円とすると、iStraw®を使用した場合、最終的に557,267円－425,000円＝132,267円プラスαの収入増が期待されることになります．

結論として、安価な未滅菌のバルクストローを用いた場合と比べて、iStraw（税込み単価385円）を使用して受胚牛100頭規模の農家で6回反復したETにより1頭多く子牛が生まれた場合（それぞれの受胎率を55%、56%と仮定）、安価な未滅菌バルクストローを使用した場合よりも132,267円の収入増が期待できることになります．ただし、この額は飼料価格、光熱費、人件費等によって変動します．今回はストロー経費66,891円全額を農家が負担すると仮定した場合ですが、技術者が全額負担する場合は農家の収入増は、199,158円（624,158－425,000）となります．いずれにしても受胎率1%の差は受胚牛100頭規模で6回ETを反復した場合、子牛1頭増となり、ストロー経費を完全に吸収することができることになります．

ここで展開した議論は仮定が多く、ストローを滅菌済みの自動植氷ストローに代えたことにより、未滅菌のストロー＋手動植氷の場合と比べて、受胎率が向上するとするのは少し飛躍しすぎかも知れません．しかし、滅菌済み器具を使い、植氷を確実に成功させるのは受胎率を向上させる要因のひとつには違いありません．また、その他の受胎率を向上させるのに不可欠な要因を満たすことが前提であるとお考え下さい．

㉕ ダイレクトトランスファーのストローが融解時に破裂する原因としてどのような原因が考えられますか？

これは普段頻繁に起こることではない．もし起ったら、欠陥があったロットナンバーとストローをチェックする；納入業者にコンタクトして、他所でも同様の事例が起っているのかどうかをチェックする．この問題と可能な解決法に関してのコメントを紹介する．

a) ストロー内への液体窒素の侵入で、これはシール／閉封が適切に行われていない（PVA ポリビニールアルコール；※訳者注：原文ではPVCとなっている、識別プラグが挿入される綿栓端）、あるいはストロー自体に裂け目がある．

b) 識別プラグと液相の間に少量の空気が残っている．陽圧がかかる条件下では、プラグに対して ストローの先端にある空気ポケットが圧力をかけることになる．シールに欠陥がある場合、液体窒素はそのスペースに侵入する（液体から気体=24℃で650倍の拡張係数）

c) 液体窒素が保管中にストロー内に侵入する．融解時の急激な膨張が破裂を起こす．

d) PVA 粉末（※訳者注：ゲル化剤；弊社のストローはPVAではなくアルギン酸ナトリウムを使用している）は外側綿栓と内側綿栓の間に充填されているが、ダイレクトトランスファー（DT）用のストローを保持して光に当てると分離しているかどうかを確認できる．また、ストローのパッケージを実体顕微鏡で拡大して観察すると綿栓の分離が識別できる（下図の写真では右側の6本のストローが欠陥品だが、裸眼では確認することができない）．

引用文献：Top 10 Questions of the New Bovine Embryo Practitioner 和訳：牛の胚移植に新しく参入した技術者からの質問トップ10 （出展： Embryo Technology Newsletter Volume 41, Number 2, June 2023 IETS）．

可能な対応策：

a) 融解するストローの大部分が液体窒素中にある間あるいは融解時に識別プラグを抜取り、ストローの開放端がお湯に浸からないように留意しながら融解する.

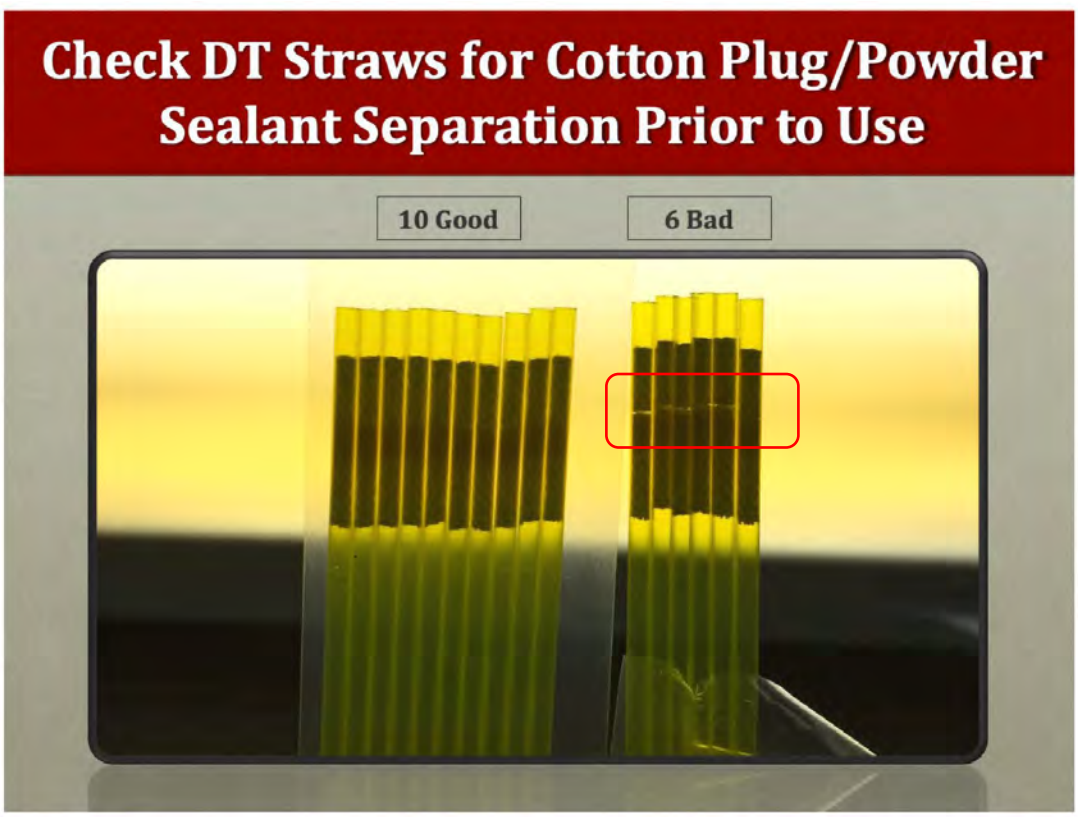
b) 識別プラグを抜取り、保存液が入ったバイアル中にストローを保持する．もし 1本のストローが破裂すれば、その他のストローも同様の現象を起こす可能性がある.

c) グリセロールの場合：20℃の温湯に浸ける前に空気中（20℃）で 10 秒間ストローを保持する間にプラグを抜取れば、ストローの破裂を減らす助けになる．これはまた、透明帯の亀裂防止にも役立つ（Rall and Meyer, 1989）.

d) ダイレクトトランスファーの場合：30℃の温湯に 30 秒間浸ける前に空気中（20℃）で5～10秒間ストローを保持する間にプラグを抜取る.

e) 適正なストローへの胚と凍結保存液の充填と確実なシーリングはストロー破裂の発生を低下させることができる.

f) ダイレクトトランスファーのストローは激しい振動が起らない場所に保管する．そのストローが長期間、温かく、がたがた振動が多い可動式ユニットに保管されている場合、ゲル化剤が綿栓から分離する現象を多く目にしている（J. H. Pryor, personal communication）. g）ストローはヒートシールをして、融解後にシール端を切り離す.



㉖　牛に受精卵移植をする際に注意すべき事柄を教えてください.

一　子宮洗浄により受精卵を回収する段階からレシピエント牛への移植完了まで、それぞれに適した方法で滅菌した器具や溶液を使用することが重要です．特に注意を要するのはストローの滅菌です．EOガス滅菌の場合はガス抜き（エアレーション）期間に注意してください．室温では8週間、50℃の加温器の中なら2週間が必要です．電子線滅菌の場合は滅菌直後からでも使用可能ですが、滅菌バリデーション試験を経て線量が決定されているかどうか、器具・機材が封入されている包材のシールの形式、シール強度も保管可能期間に影響します．市販の深部注入器はEOガス滅菌が施されている上に使い捨てになっていますが、そこに入れる受精卵が未滅菌あるいは滅菌状態が破綻しているストローに入っている状況は絶対に避けるべきです.

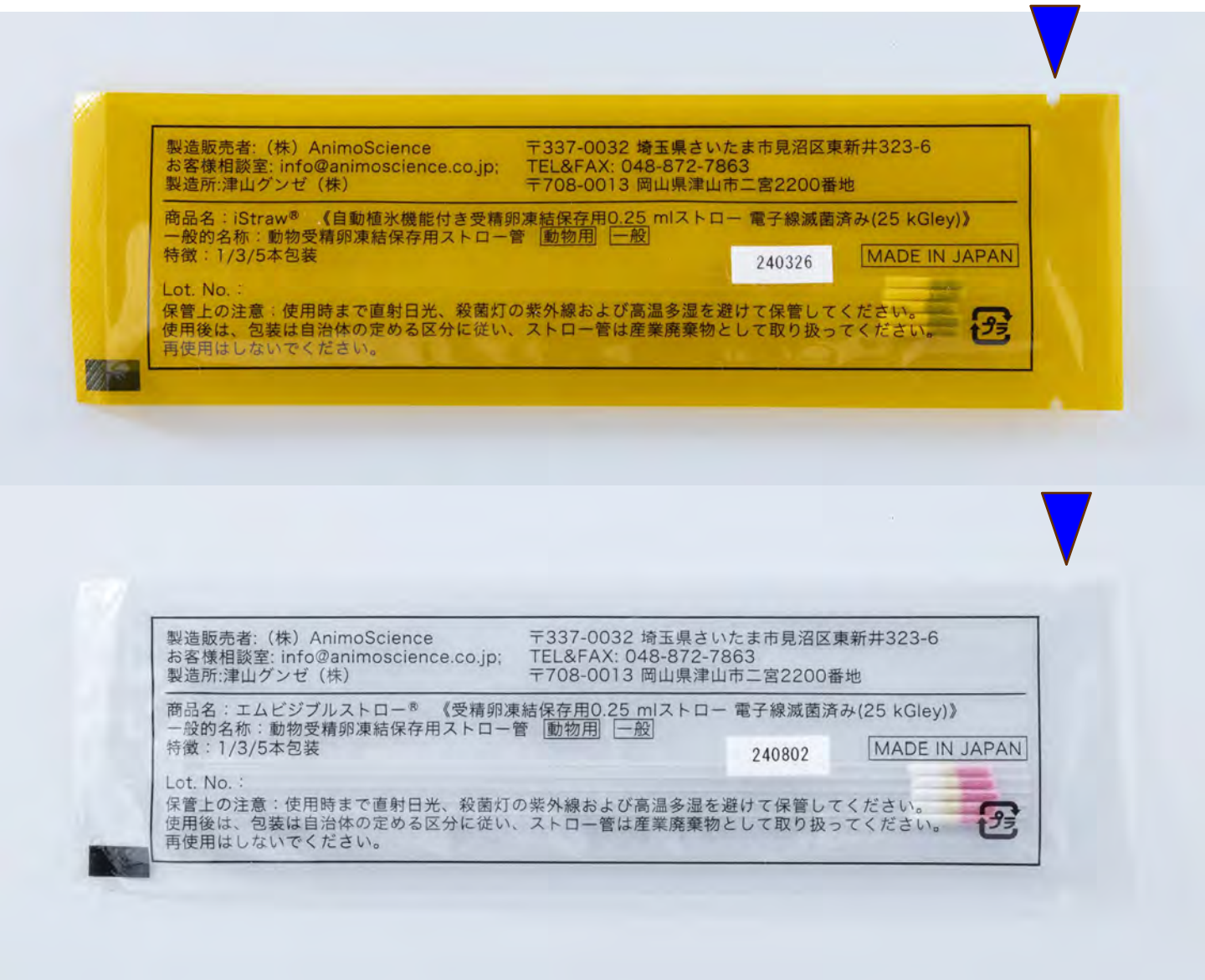
二　受精卵移植のレシピエント牛は黄体期ですので、子宮の中は細菌感染に対する抵抗力が低下しています．したがって、実際の移植に際しては外陰部の洗浄・乾燥と消毒・乾燥、移植器の外鞘被覆が必要です．外鞘は腟内部の細菌を子宮内に持ち込まないために用いますが、外鞘から移植器先端を露出させて子宮外口に挿入しようとしていた際に、牛が激しく動いた場合、移植器先端が腟粘膜に触れる危険性があります．これを防止するためには、移植時に腟鏡を使用して目視下で注入器先端を子宮外口に挿入することが強く薦められます．熟練した技術者では腟鏡を使うことを好まない方がいらっしゃいますが、受胎率、また意図しない子宮内汚染による子宮内膜炎発症を100%回避するために腟鏡を利用することをお薦めします．その他のメリットとしては、容易に尿腟の牛を発見できることです.

三　レシピエント牛を選定する際の基準は、ホルモン剤で発情を誘起することも当然あると思いますが、基本は発情兆候が明瞭であること、その発情がきっちりと周期性（21日±3日）をもって発現していることが重要です．ホルモン処置をするにしても上記の2点を満たした牛を使用するべきです．移植時の黄体の大きさや形態を重視する方もいらっしゃると思いますが、基本は上記2点を満たしていたら黄体があれば移植すると言うことで大きな問題はないと考えます．また、黄体側子宮角に移植するのが原則ですが、黄体側子宮角に入れにくい場合（今ではYTガンなどの深部注入器が使われることが多いので、こういう事態は起こりにくくなっていると思いますが）、無理して深部に注入器を進める過程で子宮内膜の出血を招くとかえって受胎率を低くしてしまいますので、そのような場合は非黄体側に入れることをお薦めします.

四　レシピエント牛の飼養管理、栄養管理（代謝プロファイルテスト実施による食餌内容の改善）ならびにストレス管理は、移植前から少なくとも60日前後の受胎確認までは確実に行うことが高受胎率に結び付きます．このことはドナー牛にも言えることです.

※凍結融解受精卵（ダイレクトトランスファーが基本）の場合は融解後から移植までの時間（できる限り短くする）、新鮮受精卵の場合はラボから移植現場までの温度管理、紫外線遮光などに気を付ける必要があります.

弊社製ストローの包装



写真の説明：
上記の包材に封入した状態でお届けいたします.
黄色透明の包材（写真上部）に入っているのがiStraw®で、
無色透明の包材に入っているのがエムビジブルストロー®です.
どちらの包材も電子線滅菌状態を保持します.
（最適な保管状態では3年、iStrawは1年）
いずれも個包装5本入りを示しています.
白色ラベルは、電子線滅菌実施日を記入しています.
各包材とも写真右側の切り口 ▼ から開封してストロー綿栓
部を把持して取り出せるようになっています.

iStraw®の包材（iStaw®を収容している黄色の袋）は、PET*12μm/UV500*印刷／LLDPE*40μmから成っているため、移植前の胚が吸引されたストローを紫外線＆可視光線から防護することができます.

iStraw®を取り出した後も捨てずに上記用途でご使用ください.

※PET：ポリエチレンテレフタレート

※UV500：紫外線に加え550nmまでの可視光線を98%以上カットする機能を有しています.

※LLDPE：リニア低密度ポリエチレン

iSeeding の強味！

①弊社が製造販売するストローは Made in Japan

供給不足の懸念なし、外国為替変動の影響を受けにくい

①製造開発元の直接販売

ユーザーの声を迅速に製品改良に反映させることができる.

”たかがストロー、されどストロー“

①移植直前まで受精卵が入っている容器である

②凍結保存用の容器として新しい価値を付与する

③残留ガスのリスクがまったくない電子線滅菌採用

④個包装（1/3/5本）による無駄が出ない滅菌済みストロー

⑤ストローの外観検査によるひび割れ等のチェック

⑥凍結保存用ストローに関わる技術情報提供

※内側綿栓とゲル化剤が湿った段階で液吸引中止

（外側綿栓を濡らすと融解時に綿栓が外れる危険性大）

iSeedは下記用途に利用できる可能性を秘めています！

Expanding Potential Application of iSeed (AgI aliginate droplet)

iSeed（固定化ヨウ化銀－アルギン酸ドロップレット）の用途

特許関係：

iSeedに関する過去の特許登録番号は1400030（昭和62年9月28日）と1617201（平成3年9月12日）です．前者が「胚の凍結保存におけるヨウ化銀による植氷の方法」、後者が「固定化されたヨウ化銀による植氷の方法」です．いずれも農水省畜試時代の特許です．現在、特許切れの状態です．また、ヨウ化銀は昔から人工降雨（技術資料集の14、15頁）に利用されていることは周知の事実です．

iStraw®に関しては、「ストロー管、ストロー、並びに凍結保存方法」で、特許出願済み（特願2022-169263）令和4年10月21日、さらに、PCT国際出願済み（PCT/JP2023/37832）

iSeedの特徴：

① 純水中、零下4°Cの温度環境で氷晶発生が起る．

② ウシ受精卵の凍結保存法のひとつ、緩慢凍結法での必須作業である植氷＊が自動で実施可能（零下7°C；1.5M前後の耐凍剤を含む溶液の場合）．
→弊社製品（有限会社iSeeding製の**iStraw®**）
＊植氷：細胞外液に氷晶を形成させることによって細胞外液を濃縮させ、受精卵の細胞質から細胞内自由水を排出させるきっかけとなる操作．通常は、液体窒素で冷却した金属棒やピンセットで受精卵を収容しているプラスチックストローの液相部分に触れて、強制的に氷晶を形成させている．

③ 高圧蒸気滅菌（121°C、20分）後も氷晶形成能力は維持される．

④ バイオリアクター的な利用が可能（回収可能）．

⑤ 単回使用

考えられる用途：

① 省エネ冷凍装置、蓄冷装置、保冷装置

② さまざまな液体類、食品飲料の凍結濃縮

③ 寒締め野菜

④ 食品等の高い温度での冷凍

⑤ 氷スラリーの製造

⑥ 凍結を利用した特定物質の水溶液からの分離

⑦ 廃棄物の処理装置

⑧ 凍結インジケーター、凍結警報装置

⑨ 凍結防止装置

⑩ 液体窒素が使えない環境下での植氷

iSeedを牛体外受精卵と一緒に培養（共培養co-culture）した場合、牛体外受精卵の発育を阻害しないことから、生物に対する有害性はないと判断でき、さらに今まで**iSeed**や**iStraw**を用いて凍結保存した牛受精卵、豚受精卵、家兎受精卵から正常な産子が得られています（7頁、8頁、27頁＆28頁 参照）.

上記に示した **iSeed** の応用に関してご興味のある企業様からのお問い合わせをお待ちしております！

最新情報！神奈川工科大学 健康医療科学部 管理栄養学科 食品衛生学研究室の澤井 淳教授が開発されたヨウ化銀シリコン膜製造技術を用いて氷晶形成誘起シートを応用することができるようになりました！

【参考資料】

受胎率は関わる人全員の注意深さと努力の結晶

“人事を尽くして天命を待つ”

小島敏之
MSDアニマルヘルス主催の学術セミナー
（旧コンセラールセミナー）で使用
（札幌、鹿児島、東京で開催；2022年11月）
MSDアニマルヘルスの許可済み

受胎率を決める17の要因

① 凍結精液／凍結受精卵の管理（液体窒素補充間隔は2週間に1回が理想）

② 融解方法（融解時、融解しないｽﾄﾛｰの温度感作に注意；キャニスターの底を塞ぐ、温度計とストップウォッチ）

③ 融解後の温度衝撃（特に冬場の低温ショック；精液／胚を扱う環境に注意）

④ 融解してから授精／移植完了までの所要時間（AI対象牛／受胚牛の保定、除糞等は融解前に済ませる）

⑤ 子宮灌流液（滅菌、適度な濃度の抗菌薬、高分子成分、保温、無菌的灌流回収方式）

⑥ 回収液の物理的刺激からの防護（温度15℃～25℃；＜15℃は禁忌、紫外線；実験室内照明はLEDに）

⑦ 胚の評価（新鮮胚移植／凍結保存／廃棄の振り分け／タイムラプス撮影／新知見：染色体分離異常の出現）

⑧ 移植／凍結開始までの所要時間（回収液から速やかに胚検索に移す；凍結開始まで2時間以内、保温時の注意）

⑨ 凍結保存技術（平衡時間、植氷の成否、 PFの温度精度、冷却プログラム、液体窒素への投入、冷媒の管理）

受胎率を決める17の要因-2

⑩ 衛生的／無菌的取り扱いと操作（滅菌済器具を使用する；EO滅菌後のｴｱﾚｰｼｮﾝ期間に注意→電子線滅菌が安心、膣鏡使用の薦め）

⑪ 移植テクニック（深部注入器でも頸管は通過させなければならない；所要時間、出血の有無）

⑫ 発情牛／受胚牛の選定（難産の有無、分娩後日数、栄養状態、発情兆候；観察頻度、発情周期、授精適期／同期化程度）

⑬ 受胚牛の評価（黄体の存在、7日目に体外受精胚を移植→15日目に子宮洗浄して回収→伸長胚が採取できた牛）

⑭ 授精前後／移植前後の牛の管理（ストレスのない状態）

⑮ 代謝プロファイルテスト／飼料給与量を量る・記録する

⑯ 人工授精翌日の触診による排卵確認は回避するのが無難（下記参照）

⑰ 人工授精時の卵巣触診はできるだけ回避するのが無難（下記参照）

⑯人工授精翌日の触診による排卵確認は回避するのが無難

- 粗暴な触診による排卵確認（通常，人工授精実施24時間後）を執拗に行なって顆粒細胞を剥がしてしまうと、その後の黄体機能が悪くなり、不妊の原因になる可能性が懸念される.
  - 引用文献：奥田潔 「直腸検査の問題点とその背景」 家畜人工授精, 239, 20-30 (2007).

⑰人工授精時の卵巣触診はできるだけ回避するのが無難

- 成熟卵胞を破裂させてしまう危険性がある.
- 卵管采を卵巣からはがしてしまい、排卵卵子が卵管に取り込まれるのを阻害する危険性がある.