

第2節 動物の生殖細胞

【目的】 哺乳類の生殖細胞としてマウスの精子と卵子を取り上げ、体外受精と受精卵子（胚）の培養技術を習得する。

2.1 マウス体外受精

【動物】 JcL-ICR 系雄マウス（3～6 ヶ月齢），同系雌マウス（3～8 週齢）

【試薬】 TYH 培養液（表-1），ミネラルオイル，妊馬血清性腺刺激ホルモン(eCG)，ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)，ヒアルロニダーゼ溶液（ヒアルロニダーゼを 0.1%の濃度になるように TYH 培養液で溶解し，濾過滅菌する），ワセリン，パラフィン，10%中性緩衝ホルマリン溶液，45%酢酸溶液，エタノール，0.25%ラクモイド染色液，45%酢酸グリセロール液，マニキュア

【器具】 メスフラスコ，濾過滅菌フィルター(0.22 μ m)，培養ディッシュ(35mm あるいは 60mm)，時計皿，メランジュール（赤血球用，白血球用），血球計算盤，ピペットマン(200 μ l 用，20 μ l 用)，ピペットマンチップ，ピンセット，眼科用ピンセット，ハサミ，注射筒(1ml，10ml)，注射針（27G），スライドグラス，カバーグラス，モイスチャーチャンバー

【培養液の作製】 マウス体外受精で汎用されている TYH 培養液の組成を表-1 に示す。表中の最初の 5 種類の無機塩類については，あらかじめ 10 倍濃度の保存液を作製しておく。保存液は濾過滅菌後冷蔵庫で保存する。100ml の TYH 培養液を次の方法で調製する。グルコース，ピルビン酸ナトリウム，ペニシリンおよびストレプトマイシンを秤量し，100ml のメスフラスコに入れ，適量の超純水で溶かす。次に，それぞれの保存液 10ml，1%フェノールレッド溶液 20 μ l を添加し，炭酸水素ナトリウムを秤量して加える。溶解後，超純水で 100ml までメスアップする。よく混和したら，濾過滅菌後冷蔵庫に保存する。ウシ血清アルブミン(BSA)は必要量だけ秤量し，調製した培地を加えて溶かす。濾過滅菌後，実験に使用する。

【精子の採取と前培養】 精子の採取前に，TYH 培養滴の入った培養ディッシュを炭酸ガス培養器内（5%CO₂，95%空気，37°C，湿度 95～97%）に静置することによって培養滴の気相と温度を平衡化させておく。培養滴は，400 μ l の TYH 培養液を培養ディッシュの底面にドロップ状に滴下し，それをミネラルオイルで覆って作製する。3～6 ヶ月齢の雄マウスから精巣と精巣上体を摘出し，滅菌濾紙の上に置く。精巣上体から尾部を摘出する(図-1A)。精巣上体尾部をその外縁部分が露出するように親指と人差し指ではさみ，すこし圧迫する(図-1B)。注射針で露出させた部分の精巣上体管を突き破り，中の粘性の強い精子塊を出す。その塊を注射針の切り口の上に乗せてすばやく取りさらう。直ちに，精子塊のついた注射針

をあらかじめ準備した培養滴内に導入する。急激な精子濃度の低下を防ぐために、導入した注射針を揺すらず、しばらくの間保持する。精子塊がゆるみ、ほぼ同心円上に広がり、精子が活発に泳ぎ始めたら注射針を培地から外す。培養ディッシュを炭酸ガス培養器内に戻し、約1時間培養する。この培養期間に精子は受精能獲得現象を起こす。この精子の培養を前培養と呼ぶ。

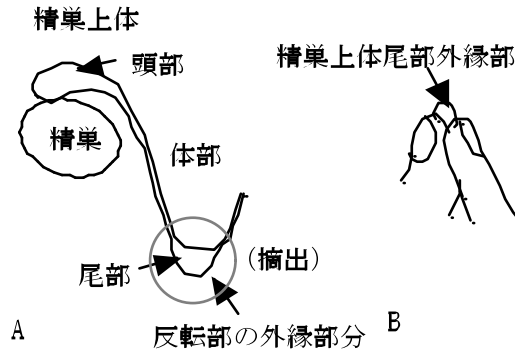


図-1 精巣上部尾部からの精子塊の採取

【精子濃度の測定】 前培養30分後に精子濃度を測定する。まず、精子の活力と濃度および均一度などを実体顕微鏡下で観察し、調製した精子が体外受精に使用できるものかを判定する。次に、実際の精子濃度を血球計算盤を用いて計測する(図-2)。

前培養精子浮遊液の1部を採取し、それを10倍あるいは100倍にメランジュール(ピペット)で希釈する。希釈液は通常3~4%食塩水を用いる。これによって精子は死滅する。ピペットで所要量目盛りまで精子浮遊液を正確に吸引し、次いで希釈液を吸って膨らみのすぐ上の目盛り(11:白血球用、101:赤血球用)まで正確に吸引する。ピペットの両端を押さえて激しく振とうし、精子を均一に懸濁させ、ピペットの毛細管部(精子は含まれていない)の液を2~3滴捨てる。計算盤上にあらかじめニュートンリングが生ずるように圧着しておいたカバーガラスと計算盤上のA部との間(厚さは0.1mm)に精子希釈懸濁液を吹き込む。計算盤上に刻まれた区画(1mm×1mmの四方内に16区画ある)内の精子数を数取器を使って計数する。精子頭部の位置が画線内に入ったもの、線上のものは区画の2線(例えば上と右)についてのみに数える。1試料について3回算定し、近似した2回の数値の平均値から算出する。

精子濃度の算出(全区画の1/2[8区画]を数えた場合)

$$\frac{\text{数えた精子数} \times \text{希釈倍率} \times 2 \times 10 \text{ (計算室の厚さは0.1mm)} \times 1000}{\text{全区画の精子数}}$$

全区画の精子数

精子浮遊液1cm³中の精子数

【受精用培養滴への精子浮遊液の添加】 培養ディッシュ内に200μlのTYH培養液をドロップ状に置き、その上をミネラルオイルで覆う(受精用培養滴)。媒精約10分前に、前培

養精子浮遊液の中でも活力の良い精子が存在する中層から上層の一部を静かにピペット

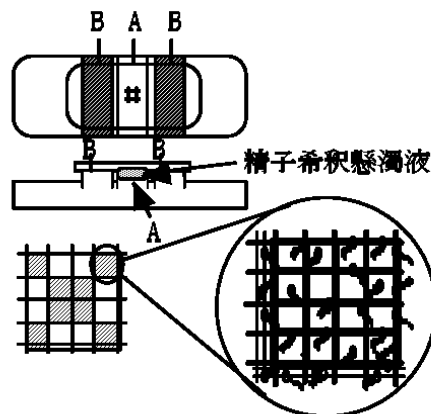


図-2 血球計算盤による精子数のカウント

マンのチップで取り出し、受精用培養滴の底に静かに排出する。前培養精子浮遊液中の精子濃度から、受精用培養滴内の精子濃度を 200,000 精子/ml になるよう調製する。精子添加後、直ちに炭酸ガス培養器内に戻す。

【卵子の採取と媒精】 3 週齢以上の雌マウスに、性周期とは無関係に妊馬血清性腺刺激ホルモン (eCG), 5IU) を腹腔内注射する。48 時間後に、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG, 5IU) を腹腔内注射する。hCG 注射後 12 時間に排卵がおこる。

hCG 注射後 15 時間に、マウスを屠殺し開腹する。腸を横にずらして背側に位置する生殖器を確認する。図-3 に示すように、子宮角をピンセットでつまみ上げ、子宮体部よりのところを切断する。子宮角の切断部とは反対の先にある卵管と卵巣は、卵巣周辺の脂肪組織に付着して固定されている。従って、子宮角を手前に少し引っ張ることによって卵巣と卵管の間(図-3A)に隙間を作ることができる。そこにハサミをいれて、卵巣と卵管を覆っている卵巣囊とともに切断し子宮と卵管を取り出す。次に、卵管と子宮の接合部(図-3B)を切断し卵管を摘出する。受精用培養ディッシュを炭酸ガス培養器から出し、そのミネラルオイル中に摘出した卵管を入れる。実体顕微鏡下で排卵卵子と卵丘細胞の塊が存在している卵管膨大部を確認する。眼科用ピンセットで卵管を保定し、27G の注射針で膨大部壁の一部を切り裂く。膨大部の切開とともに卵子を含んでいる粘性のある卵丘細胞塊がミネラルオイル内に押し出されてくる。その塊を注射針で引っかけて静かに受精用培養滴内に導入する。このような精子と卵子を受精用培養滴に入れる操作を媒精と呼ぶ。媒精後、直ちに炭酸ガス培養器内に戻し培養を行う。

【受精の判定】 卵子への精子侵入は、媒精後 1 時間以内に完了し、4~6 時間には前核が形成される。さらに受精卵子を培養すると、媒精後 20 時間には最初の分割 (第 1 分割分裂) が起こり、2 細胞期へと発生する。未受精卵子は正常な核分裂を起こさないことから、割球分割を起こさないものや、いくつもの不均等な大きさの卵細胞質に分割する (不均等分割)。受精過程の観察は、以下に述べる卵子のホールマウント標本を作製して行う。

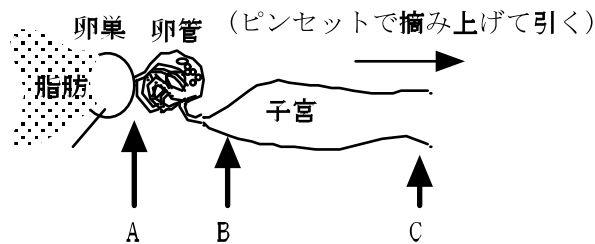


図-3 卵管あるいは卵管と子宮の摘出
 卵管：AとBで切断
 卵管と子宮：AとCで切断

(I) ホールマウント標本の作製

媒精後 1~6 時間の卵子を用いる。卵子が卵丘細胞に取り囲まれている場合、卵子をヒアルロニダーゼ溶液に移し、卵丘細胞を離散させる。このように裸化した卵子を時計皿に入れた TYH 培地で 3 回洗浄する。図-4 に示すように、前もってカバーガラスの四隅に対応する位置に、ワセリン (9 容) とパラフィン (1 容) を混合して溶解した小滴 (ワックススポット) を点状に付けたスライドガラスを準備する。4ヶ所のワックススポットで囲まれたところの中央に、少量の液とともに卵子をのせる。カバーガラスをワックススポットの上へのせ、カバーガラスを緩く圧して徐々にワックススポットを扁平にしていく。カバーガラスを水平に保ちながら圧してゆくことによって、卵子はカバーガラスとスライドガラスの間に挟まれ動かなくなる。この操作は実体顕微鏡下で卵子の状態を観察しながら行う。次にスライドガラスとカバーガラスの間に固定液 (10%中性緩衝ホルマリン溶液) を注入し、それをモイスチャーチャンバー内に入れて卵子を 1 時間固定する。固定終了後、カバーガラスの一辺に蒸留水を置き、反対側の一辺に濾紙片をあてて固定液を吸い取りながら蒸留水を通す。同様にして 45%酢酸溶液あるいはエタノールを通し、続いて 0.25%ラクモイド染色液を通して卵子を染色する。エタノールを通す場合、卵子は脱水して委縮するので、卵子の押さえ方が不十分な場合、卵子は流されて失うことになるので注意を要する。約 5 分間の染色の後、脱色液 (45%酢酸グリセロール液) を通して染色液を除去する。カバーガラス周囲の余分な液を拭き取って、その周囲にマニキュアを塗って封じる (図-4)。

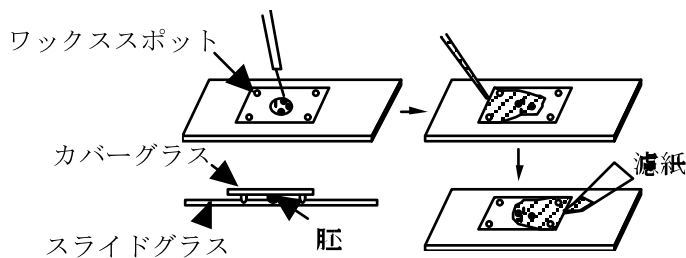


図-4 卵子のホールマウント標本

(II) 顕微鏡観察

作製した染色標本を顕微鏡で観察し、図-5 に示すような受精の過程を確認する。媒精 1 時間の卵子では、卵子の第 2 成熟分裂後期から終期の染色体と卵細胞質内で膨化した精子頭部と精子尾部が観察される。媒精後 4 時間では、第 2 極体の放出と雌性前核そして精子尾部を伴った雄性前核が卵子細胞質内に観察される。雌性前核は放出された第 2 極体の近

傍に形成され、しかも雄性前核よりも小さいことで判定できる。また雄性前核は、その近傍に精子尾部を伴っていることでも判定できる。このような受精過程にある卵子は受精途上卵子と判定する。それ以降、受精卵子に形成された雌雄両前核は卵細胞質中央に移動し、融合することによって受精を完了する。排卵直後の未受精卵子では、第2成熟分裂中期の染色体と紡錘体が観察できる。

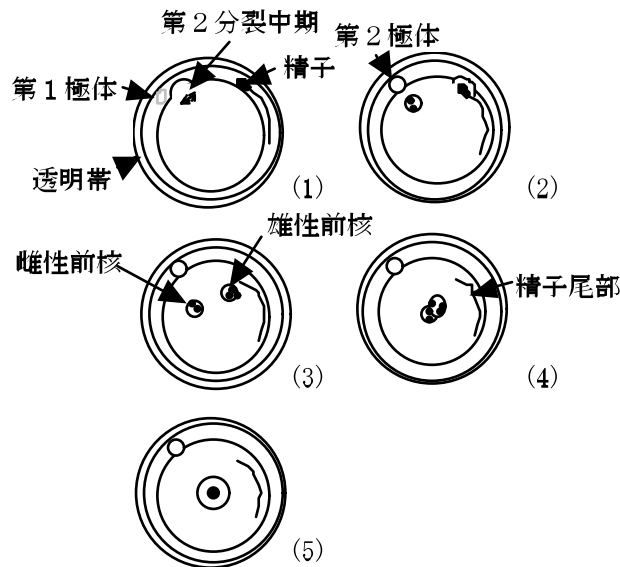


図-5 マウス卵子の受精過程

2.2 マウス胚の培養

【目的】 受精卵子(胚)は、受精後決まった速度で卵管から子宮へ浮遊した状態で下降移動しながら発生する。子宮に到達した胚盤胞期の胚は、透明帯から脱出し子宮内膜に着床した後に、胎盤を形成して胎児として発育する。ここでは、前核期卵子から着床前の胚盤胞期までの胚の培養法を習得する。

【動物】 ICR/Jc1 系雄マウス(3~6ヶ月齢)、同系雌マウス(3~8週齢)

【試薬】 KSOM 培養液(表-1)、ヒアルロニダーゼ溶液(ヒアルロニダーゼを0.1%の濃度になるようにKSOM培養液で溶解し、濾過滅菌する。)、1%フェノールレッド溶液、ミネラルオイル、妊馬血清性腺刺激ホルモン(eCG)、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)、ワックス、10%中性緩衝ホルマリン溶液、ギムザ染色液、マニキュア

【器具】 メスフラスコ、濾過滅菌フィルター(0.22 μ m)、培養ディッシュ(35mmあるいは60mm)、時計皿、ピペットマン(200 μ l用、20 μ l用)、ピペットマンチップ、ピンセット、眼科用ピンセット、ハサミ、注射筒(1ml、10ml)、注射針(27G)、還流針、パスツールピペット、ガスバーナー、マウスピース、スライドガラス、カバーガラス、濾紙、モイスチ

ヤーチャンバー

【培養液の調製】 KSOM 培地の組成を表-1 に示す。表に示す最初の 5 種類の無機塩類については、あらかじめ 10 倍濃度の保存液を作製しておく。保存液は濾過滅菌後冷蔵庫で保存する。100ml の KSOM 培養液を次のとおり調製する。グルコース、ピルビン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム (60%シロップ)、グルタミン、EDTA、ペニシリンおよびストレプトマイシンを秤量し、100ml のメスフラスコに入れ、適量の超純水で溶かす。次に、それぞれの保存液 10ml、1%フェノールレッド溶液 20 μ l、を添加し、炭酸水素ナトリウムを秤量して加える。溶解後、超純水で 100ml までメスアップする。よく混和したら、濾過滅菌後冷蔵庫に保存する。約 1 週間使用できる。BSA は必要量だけ秤量し、調製した培養液を加えて溶かす。濾過滅菌後、実験に使用する。

【培養用培養滴の準備】 調製した培養液 100 μ l を培養用ディッシュ上にドロップ状に置き、その培養滴をミネラルオイルで覆う。使用 1 日前に炭酸ガス培養器内に入れて培養滴の温度とガスを平衡化させておく。

【過剰排卵誘起】 過剰排卵誘起法は 2. 1 で述べた方法に準じて行う。hCG を投与した後に雄と一晩同居させ交配させる。

【交配の確認】 交配を翌朝、膣栓の有無によって確認する。交配している場合には白黄色の凝固した塊 (膣栓) が膣内に確認できる。あるいは、生理的食塩水で膣内を洗浄し、その洗浄液内に精子を確認する方法もある。

【胚の採取】 胚の発生段階と局在部位は、hCG 投与後の経過時間で決まっている。従って、胚の採取方法と採取時間は、採取する胚の発生段階によって異なる。

(I) 前核期卵子

前核期卵子は、hCG 投与後 20 時間から 30 時間に卵管から回収される。前核期初期では卵子は多層からなる卵丘細胞によって囲まれているが、時間経過と共に卵丘細胞は離散し、後期では卵子に付着している卵丘細胞の数はかなり少なくなっている。初期前核期卵子の採取; 摘出した卵管をヒアルロニダーゼ溶液内に入れ、実体顕微鏡下で、卵子卵丘細胞塊で膨らんでいる卵管膨大部を確認し、その卵管壁を注射針で切り裂いてその塊を回収する。しばらくの間室温でインキュベートすると、ヒアルロニダーゼによって卵子の周りのほとんどの卵丘細胞は離散する。直ちに卵子を培養液の入った時計皿に移し洗浄する。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、卵子を培養用の培養滴内に入れて炭酸培養器内で培養する。後期前核期卵子の採取; ヒアルロニダーゼ溶液の入った時計皿に摘出卵管を入れ、実体顕微鏡下で卵管采を確認する。次に、卵管を軽くピンセットで押さえ、約 0.3ml のヒアルロニダーゼ溶液が入った注射筒の先に付けた還流針 (27~30G のカット針) を卵管采の中に静かに導入する。このとき卵管采を破損しないように気をつける。卵管采に入った還流針を卵管采とともにピンセットではさみ固定し、注射筒の内筒を押してヒアルロニダーゼ溶液を卵管内に静かに入れて還流する (図-6)。時計皿に回収された卵子の周囲には卵丘細胞はほとんど付着していないが、卵丘細胞が付着している場合には、それが完全に離散するまで室温でインキュベートする。続いて、卵子を培養液で 3 回洗浄した後、卵子を培養用の

培養滴に移して，炭酸ガス培養器内で培養する．

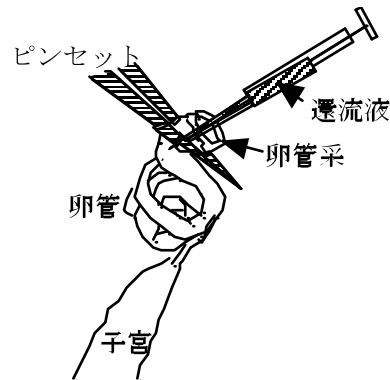


図-6 卵管及び子宮還流

(II) 2細胞期から4細胞期胚の採取

hCG注射後38～50時間に2細胞期から4細胞期に発生し，卵管狭部に移動する．従って，この時期の胚は，卵管内を培養液で還流することによって採取する．実体顕微鏡下で，摘出した卵管を図-6の様に培養液で還流し，卵管内容物を時計皿の培養液内に回収する．均等に分割した2細胞期あるいは4細胞期胚を実体顕微鏡下で探し，胚を培養液で洗浄した後，培養用の培養滴内に移し，炭酸ガス培養器内で培養する．

(III) 8細胞期胚の採取

hCG注射後，60～72時間に8細胞期胚は卵管狭部から子宮角上端部に達する．この時期の胚を採取するには，先ず卵管を子宮の上部半分をつけて摘出し，培養液の入った時計皿に入れる．上述の還流法で卵管采から子宮までを培養液で還流して内容物を回収する．実体顕微鏡下で，均等に8分割した胚を回収し，洗浄後培養用の培養滴内に入れて培養する．

(IV) 桑実胚および胚盤胞の採取

hCG注射後，72～84時間に桑実胚，そしてhCG注射後90～114時間に胚盤胞を子宮から採取できる．それぞれの胚の採取は子宮還流法によって行われる．

摘出した子宮の上端から還流液を含む注射筒に付けた27Gの注射針を挿入し，挿入した注射針をピンセットで子宮と共に挟んで固定する．注射筒の内筒を押して還流液(0.5ml)を静かに子宮内に流し入れ，子宮腔内を還流する．還流液を時計皿に回収する．胚を洗浄した後，培養用培養滴内に入れて培養する．

【体外培養胚の観察】 ここでは，1日間の培養で発生する胚の発生段階と形態を示す(図-7)．前核期卵子は2細胞期へ発生する．2細胞期胚は透明帯の中に大きさが均等な2個の割球と，それに比べて非常に小さな極体が存在し，卵子と透明帯の間に囲卵腔が明瞭に観察できる．2細胞期胚は，4～8細胞期へと発生する．8細胞期胚は，桑実期あるいは初期胚盤胞期へと発生する．8細胞期後期以降に，胚は分割をしながら，割球同士の接着面を強固に結合し，全体が緊縮する現象(コンパクトン)を起こす．このような状態になった胚を桑実胚と呼ぶ．その後，16～32細胞からなる桑実胚は，胚の一部に胞胚腔を形成するようになる．このような胚を胚盤胞と呼ぶ．桑実胚の培養では，胚盤胞へ発生し，その胞胚腔は非常に発達し，胚全体が拡張するようになる．この時期になると図-7に示すように

機能の異なる栄養膜細胞（胎盤形成に関与）と内部細胞塊（主に胎児形成に関与）とを明瞭に区別することができる。胚盤胞はその後、透明帯から脱出し、培養ディッシュの底面に接着するようになる（体外での着床現象）。透明帯から脱出した胚盤胞を脱出胚盤胞と呼ぶ。

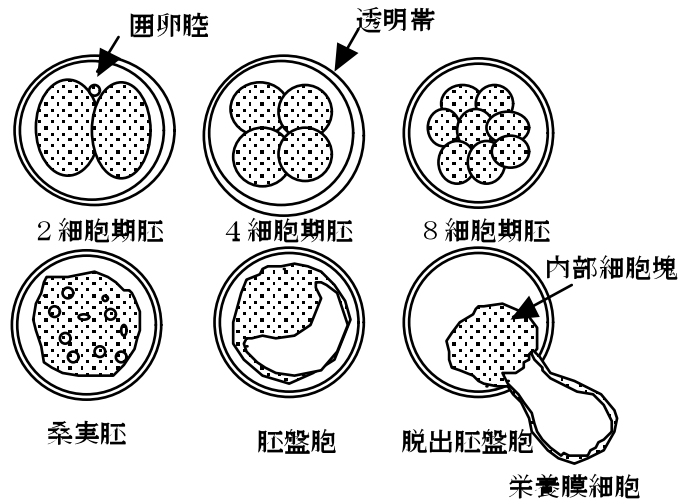


図-7 胚発生過程

【培養密度】 体外培養における胚の発生は、培養液量と胚の個数とによって決まる胚の密度に影響される。100 μ l の培養滴に胚を1個だけ入れて培養する単個培養での発生は、複数入れて培養する場合に比べて発生する胚の割合は低く、しかも発生速度も遅くなる傾向にある。従って、一般には100 μ l の培養滴内に20~30個入れて培養する。

【パストゥールピペットによる胚操作】 卵子や胚の採取、洗浄そして、それらを培養滴内に移したりするなどの胚操作をパストゥールピペットで行う。その基本操作は、パストゥールピペットによる胚の吸引や排出によって行う。内径6mmのガラス管をガスバーナー上で細長く伸ばし、径が0.2~0.5mmくらいのところで切る。ピペットの径は、扱う胚よりも一回り太めのものがよい。パストゥールピペット内へ胚を吸引する場合、あらかじめ培養液を少し吸引しておき、その後胚をできるだけ少量の液とともに吸引するとよい。そうすることによって、吸引した液を全て出すことなく、極少量の液と共に胚を排出できる。このようにすることによって、培養滴中に空気を排出して気泡が発生するのを防止できる。

【胚の固定・染色】 2.1で述べたように胚のホルマウント標本を作製する。固定液には10%中性緩衝ホルマリン溶液そして染色液にはギムザ染色液を使用する。染色後、胚標本を顕微鏡で観察する。分割期胚では割球数と各々の割球中に核が存在するかを観察し、その胚が正常かあるいは退行分割かを判定する。胚盤胞では栄養膜細胞、内部細胞塊そして胞胚腔を観察し、それぞれの細胞群の分化と機能を確認する。

2.3 生殖細胞の保存

【目的】 ウシ射出精子の凍結保存法を習得する。

【試薬】 修正タイロード液(表-1) , 卵黄クエン酸ソーダ液(表-2), グリセリン, , 1%水溶性エオシン溶液

【器具】 試験管, 遠心管, メスフラスコ, 三角フラスコ, ガラスピペット, ピペットマン(200 μ l 用, 20 μ l 用), ピペットマンチップ, マグネチックスターラー, プラスチックストロー(0.5ml), 注射筒, 発泡スチロール容器, スライドグラス, カバーグラス, 精液性状検査盤, 血球計算盤

【精液の希釈】 人工膾法で採取したウシ精液を, 25~30 $^{\circ}$ C下で卵黄クエン酸ソーダ液(表-2)で2~5倍に希釈する(一次希釈)。一次希釈精液を90分かけてゆっくりと4 $^{\circ}$ Cまで冷却し, 等量の14%グリセリン添加卵黄クエン酸ソーダ液(4 $^{\circ}$ C, 二次希釈液, 表-2)を3~5回に分けて10分間隔でゆっくりと添加し希釈する。4 $^{\circ}$ C下で, 最終希釈精液を図-8に示す0.5mlのプラスチックストロー(一方の末端は綿栓されている)内に分注する。ストローの封入は, 1cmの空気層を設けて末端にストローパウダーを詰め, 水に濡して固化させることにより行う。分注後2~3時間4 $^{\circ}$ C下で静置する(グリセリン平衡)。

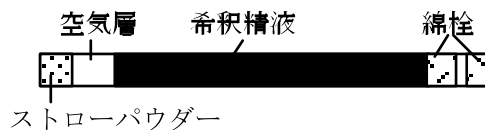


図-8 精子凍結用ストロー

【精子の凍結】 一般には液体窒素簡易急速凍結器やプログラムフリーザーを使用する。ここでは, 簡易法として発泡スチロール容器を用いて凍結する。発泡スチロール容器の底から5~10cmのところまで液体窒素(-196 $^{\circ}$ C)を入れる。その液面から2~4cmの高さのところ台を設け, その上にストローを並べ, 5分間放置して凍結する。凍結したストローを保管器の中の液体窒素中に入れて保存する。

【凍結精液の融解】 液体窒素保管器からストローを出し, 直ちに温湯(37 $^{\circ}$ C)中に浸漬し, 急速に融解する。融解後, 人工授精によって雌ウシの子宮内に直接融解精液を注入する。あるいは, 精子を遠心洗浄(凍結用希釈液の除去)後, 修正タイロード液(表-1)に懸濁して体外受精に使用する。

【融解精子の検査】 遠心洗浄によって凍結用希釈液を除去し, 修正タイロード液に懸濁した精子の性状を以下の項目について検査する。

(I) 精子濃度

2.1で述べたように精子懸濁液を0.3~0.4%NaCl溶液で希釈し, 血球検査盤で精子濃度を測定する。

(II) 精子活力

精液性状検査盤を用いて精子の活力と生存率を出す。図-9 に示す検査盤の中央の A 部に精子懸濁液を 1, 2 滴置く。その上にカバーガラスをかけて加温盤上で顕鏡する。全視野中の運動精子の活力を 4 段階 (+++, ++, +, ±) に分けて、それぞれの活力を示す精子の全精子に対する割合から算定する。例えば、+++が 60%, ++が 10%ならば生存率は 70%である。

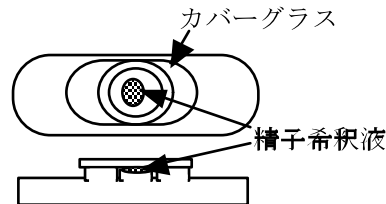


図-9 精液性状検査盤

(III) エオシン染色による精子生存率の算定

精子頭部後方がエオシンで赤あるいは赤紫に染まったものは死滅精子で、染色されないものは生存精子と判定される。

精子懸濁液 1 滴 (約 20 μ l) をスライドガラス上に置き、その中に等量の 1%水溶性エオシン溶液を入れて混和する。次にスライドガラス上に広く一層に成るように塗抹し、速やかに乾燥させる。顕微鏡下で 500 個の精子について検査して不染精子の割合から精子生存率を求めることができる。

表-1 培養液組成

	TYH mg/100ml (mM)	KSOM mg/100ml (mM)	修正タイロード mg/100ml (mM)
NaCl	697.6 (119.37)	555.2 (95.00)	666.2 (114.00)
KCl	35.6 (4.78)	18.6 (2.50)	35.6 (4.78)
KH ₂ PO ₄	16.2 (1.19)	4.8 (0.35)	16.2 (1.19)
CaCl ₂ ·H ₂ O	25.1 (1.71)	25.1 (1.71)	25.1 (1.71)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	29.3 (1.19)	29.3 (1.19)	29.3 (1.19)
NaHCO ₃	210.6 (25.07)	210.0 (25.00)	210.0 (25.00)
glucose	100.0 (5.56)	3.6 (0.20)	61.3 (3.40)
Na-pyruvate	11.0 (1.00)	2.2 (0.20)	4.1 (0.37)
Na-lactate(60% syrup)	-	140 μ l (10.00)	70 μ l (4.79)
Glutamine	-	14.6 (1.00)	-
EDTA·2Na	-	0.4 (0.01)	-
BSA	4.0 mg/ml	1.0 mg/ml	4.0 mg/ml

表-2 ウシ精液凍結用希釈液

	一次希釈液(100 ml)	二次希釈液 (100 ml)
クエン酸ナトリウム	1.45 g	1.21 g
第 2 リン酸ナトリウム	0.17 g	0.14 g
グルコース	0.70 g	1.42 g
乳糖	0.26 g	0.21 g
鶏卵黄	15.00 ml	15.00 ml
グリセリン	0.00 ml	14.00 ml
TPD	1.5~3.0 mg	1.5~3.0 mg

