

いは、出
つ) 出
に書す提
出約ま回
提誓し1
の③いに
」、願所。
書項お箇ん
約事を1せ
誓意出かま
「注提れり
るののずあ
かて書いは
かつ約校要
にた誓学必
止あ、大る
防には産す
正等合水出
不約場、提
の契た一再
費のつタは
究となンで
研構とセ約
的機方査契
公育手調の
①教相発降
(・約開以
類究契、回
書研、所次
係産で究の
関水の研内
止人す、構
防法ま部機
正発し本當
不開付の、
の究添構ば
費研に機れ
究立書当け
研国明、だ
的②説おた
公、札ない
て入て

業務仕様書

1. 件名 カツオ卵巢組織切片作成、成熟度判定および卵母細胞のマーキング業務
2. 業務目的 本業務は、ホルマリン及び冷凍保存されたカツオの生殖腺標本において卵巢組織切片を作成し、卵母細胞のマーキングによる成熟度判定の実施、また、一部、同一個体から得られたホルマリン及び冷凍保存については卵母細胞のマーキングを実施し、保存方法による成熟度判定への影響を調べることを目的とする。
3. 予定数量 240 検体
〔 検体数内訳 〕
◎組織切片作成と成熟度判定：
240 検体（ホルマリン標本 160 検体、冷凍標本 80 検体）
◎卵母細胞マーキング：
120 検体（240 検体中）（ホルマリン標本 90 検体、冷凍標本 30 検体）
なお、今年度のカツオの漁獲状況によっては、ホルマリンと冷凍標本の数が変わる可能性がある。
4. 業務場所 契約締結業者指定場所
5. 業務期限 令和 4 年 2 月 28 日
6. 業務内容 本業務は、カツオ生殖腺 240 検体において下記の【分析内容】の通り行うこと。なお、分析作業は組織切片の作成から成熟度判定に精通した者が行うこと。

【分析内容】

- (1) 標本の送付
水産資源研究所まぐろ第 2 グループ（以下「当所」という。）が引き渡すカツオの卵巢標本（240 検体）と生殖腺保管用のホルマリン標本瓶（冷凍標本 80 検体分を返却するための容器）、標本一覧表を業務実施者に送付する。なお送付にかかる運送費は当所が負担する。また、標本は漁獲状況に応じて、複数回に分けて送付し、2021 年 10 月には全検体の標本を送る予定である
- (2) 標本の確認
業務実施者は標本を受領後、標本一覧表との照合、状態確認を行い、当所へ受領した旨の連絡を行うこと。なお、標本と標本一覧表との不一致や輸送中の事故があった場合は、速やかに当所と取扱いについて協議する。
- (3) 組織切片標本の作成
10%ホルマリン及び冷凍で保存された生殖腺について以下の要領にて組織切片を作成する。冷凍で保存された生殖腺は、解凍後ホルマリンに固定する。固定した生殖腺の中心部を採取し、常法によりパラフィン包埋する。パラフィン置換には人為的なバイアスを避けるため、可能な限りパラフィン置換自動装置（サクラファインテック社）を用いること。パラフィン標本を厚さ 6 μm （大きさ 1.5 cm \times 1.0 cm）に薄切後、Mayer のヘマトキシリン-エオシンの二重染色法で組織切片を作成する。連続切片は 5 枚程度とし、1 枚のスライドグラスに封入する。なお染色にはサクラファインテック社などの自動プログラム染色装置を用いること。切片標本のスライドグラスには標本番号を記録する。

(4) 組織切片の観察・撮影及び成熟度判定

(ア) 光学顕微鏡下で、組織切片を観察し、排卵後濾胞の有無を確認

<排卵後濾胞が確認できた場合>

排卵後濾胞が明瞭に観察できる倍率において、視野内に排卵後濾胞が含まれるように撮影する(図1左上)。

<排卵後濾胞が確認できなかった場合>

卵母細胞が明瞭に観察できる倍率において、視野内に周辺仁期以降の様々な発達段階の卵母細胞が視野内に含まれるように撮影する(図1左上)。撮影の際、組織切片内に観察されるすべての段階(不明瞭な卵母細胞も含む)の卵母細胞を含むように撮影する。

(イ) 1切片(1検体)当たり、撮影枚数は最大で20枚とし、対象の卵母細胞が50個程度観察できる倍率で撮影し、成熟度を判定する。可能であれば画像のファイル形式はpngが望ましい。

(5) 各発達段階の卵母細胞のマーキング

撮影画像の内、成熟過程が産卵段階まで進行している卵母細胞(核移動期、成熟期、β閉鎖濾胞、α閉鎖濾胞、排卵後濾胞)を含む画像についてはマーキングする(図1右上)。マーキングする検体数は120(ホルマリン90検体、冷凍30検体)検体とし、卵母細胞やどの保管方法(ホルマリン・冷凍)の検体を選択するかの内訳については、(4)の作業終了後、担当者と相談の上決定する。マーキングの基準については、表1を参照。発達段階が不明瞭(途中の発達段階)な卵母細胞についても、それが分かるようにマークする。例えば卵黄球期と胚胎移動期の間の卵母細胞であれば、それぞれで決めたマークを2つ付ける(図1左下)。なお、各発達段階の卵母細胞の特徴について、下記文献を参照すること。

芦田ら(2007) 卵巣の組織学的観察による中西部熱帯太平洋におけるカツオの成熟と産卵生態の推定、Nippon Suisan Gakkai, 73(3), 437-442

7. 納入成果物の提出および提出先

業務完了後は、以下の成果物を速やかに送付・納入すること

- ・撮影した画像ファイル(マーキング無し)
- ・各発達段階の卵母細胞にマーキングした画像ファイル
- ・生殖腺標本(240検体)
- ・組織切片標本(240検体)

画像ファイルは、記録媒体(CD等)に記録し、2部を提出する。なお、発送にかかる費用は業務実施者が負担し、送付後速やかにその旨を担当職員に連絡すること。冷凍の生殖腺標本については、返却用のホルマリンサンプル瓶にて固定すること。

納入成果物の提出先

〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦2丁目12-4

国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産資源研究所 広域性資源部 まぐろ第2グループ

8. その他

・公的研究機関をはじめとする外部機関から受注した生殖腺組織切片作成業務及び成熟度判定の実績について、実績報告書を作成し提出すること。(実績は直近3年間など最近のものが望ましいが、これに限るわけではない。)なお、実績報告書の様式は任意のものとし、実績に係る実施年度、業務名、発注者を記載すること。

・冷凍保存された生殖腺の解凍方法について、分析開始前後に一度打ち合わせ(電話・メール・ウェブ上のいずれかにおいて)、急速解凍(氷水解凍)と緩慢解凍(10°Cの冷蔵庫)でどちらの解凍方法が組織劣化を抑えられるかをホルマリン標本と事前に比較・確認し、打ち合わせ内容を報告書にまとめて提出すること。

9. 特記事項
- 1) 作業中に疑義が生じた場合は、当所担当研究者と適宜打ち合わせを行い、合意を得たうえで作業を進行すること。
 - 2) 業務に必要となる資材、運搬等は全て契約締結業者が手配すること。
 - 3) 分析終了後、当所にて分析サンプルおよびデータの確認を行い、不備が発覚したときは全面やり直しを命ずる場合がある。
 - 4) 詳細については担当研究者の指示に従うものとする。
 - 5) 分析標本数が半分程度完了した段階で、中間報告をするものとする。

参考資料

表 1. 各発達段階の卵母細胞マーク方法

発達段階	マーキングカラー	マーク形状
卵黄胞期	紺	○
第 1 次～3 次卵黄球期	黄	○
胚胞（核）移動期	黄緑	○
前～成熟期(吸水卵)	赤	○
α 閉鎖濾胞	茶	○
β 閉鎖濾胞	水色	○
排卵後濾胞	黒	○

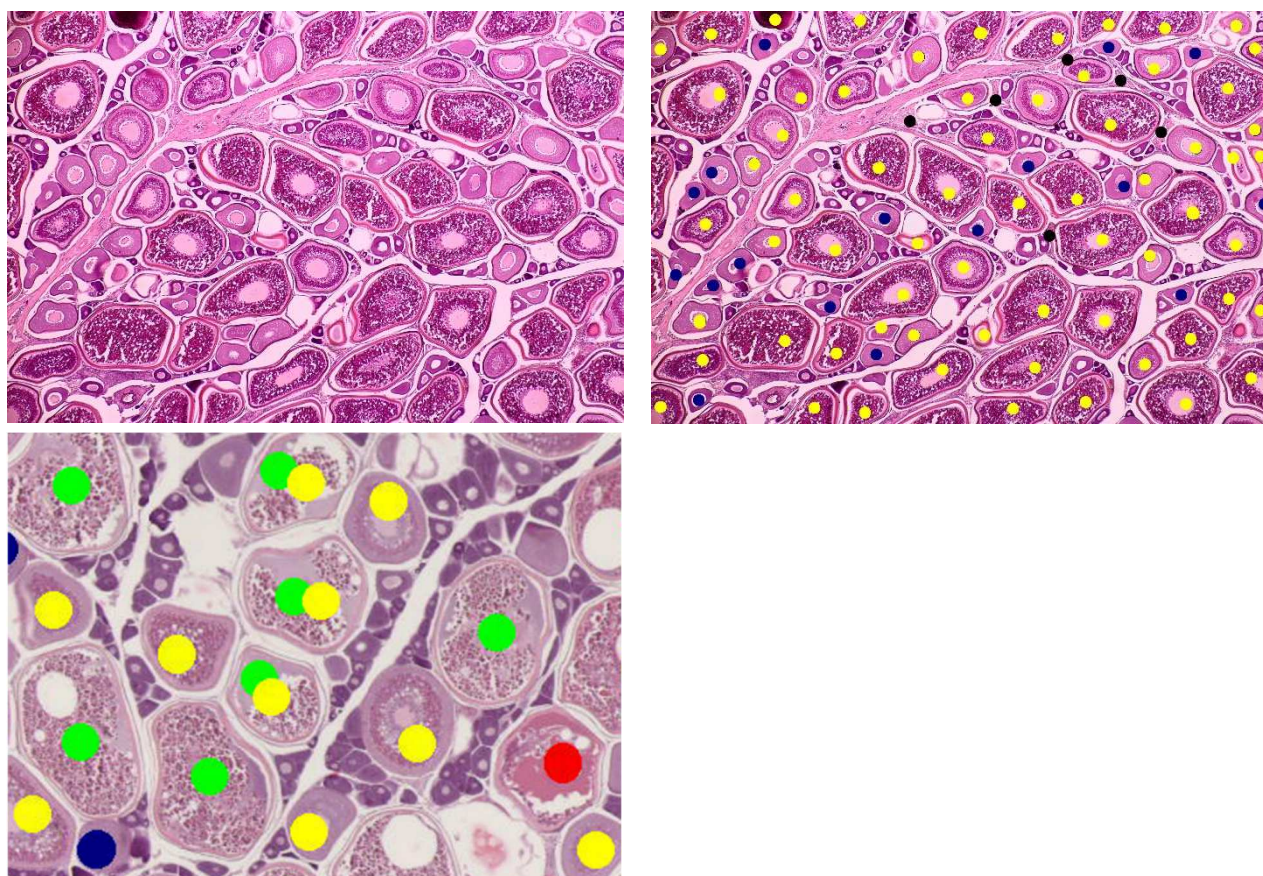


図 1 組織切片撮影画像例 (左上) マーク無し、(右上) マーク有、(左下) 複数マーク有