

# *Vitrification Protocol*

卵子 / 胚の凍結保存

**KITAZATO®**

## ガラス化保存の流れ



## PART 1 必要な機器・消耗品

1. Vitrification Media (製品コード：VT525)
  - No.0 BS(Basic Solution)1.5mL ×1<sup>\*1</sup>
  - No.1 ES(Equilibration Solution)1.5mL ×1
  - No.2 VS(Vitrification Solution)1.5mL ×2
  - ※溶液は使用前に室温に平衡させます
2. Shrinkage Solution (製品コード：VT525-4)<sup>\*2</sup>
3. Cryotop (Cryotop1本につき最大3個の卵子/胚を凍結保存できます)
4. Oocyte Cryo Plate (卵子凍結用) / Repro Plate (胚凍結用)
5. 卵子/胚操作用ピペット
6. カウントアップ機能付タイマー
7. 冷却用液体窒素
8. 液体窒素容器 (製品コード：Cooling Rack)
9. 液体窒素用ピンセット
10. マイクロピペット・チップ：20 μL用 (卵子凍結用)、300μL用
11. 保存備品類 (ケーン等)
12. 実体顕微鏡 (加温プレートは全工程OFF)

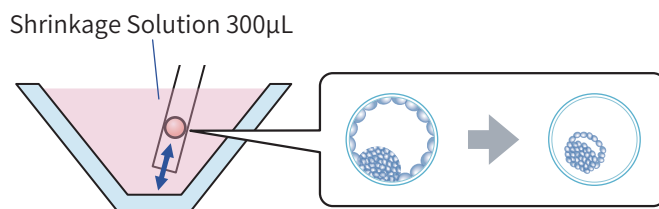
- \*1 卵子凍結用
- \*2 胚盤胞凍結 前処理用

### POINT

- 操作性を高めるため、ピペットの内径は卵子または胚の大きさに合わせてご使用ください (卵子：約140μm、胚：140-250μm)。
- ガラス化の操作はすべて室温で行います。

## PART2 胚盤胞凍結 前処理

拡張胚盤胞以降(ガードナー分類のグレード4以上)では、水分と凍結保護物質の置換が不十分になる可能性が高まることから、ES平衡開始前に収縮用 Shrinkage Solution(VT525-4)を用いた人工収縮の実施をお勧めします。



### 準備

Shrinkage Solution を室温にもどし、Repro Plate に 300µL 分注し使用するまで蓋をして静置します。収縮が確認された時点で ES 平衡を開始するため、P.5 の ES 平衡の準備も同時に行います。(Repro Plate に ES を 1 ウェル分、VS を 2 ウェル分、各 300µL 分注)

### STEP1

#### 胚の移動と収縮の確認

Shrinkage Solution に胚を移動させ、ピペッティングを行い収縮を促します。

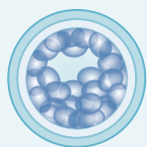
胚の収縮を確認後、P.5 の ES 平衡に進みます。

※2分間で胚の収縮が確認できなかった場合も、そのまま P.5 の ES 平衡に進みます。

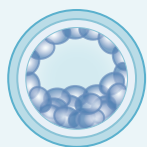
### Information

#### Shrinkage Solution 適応目安

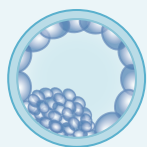
##### 胚盤胞の発育ステージ



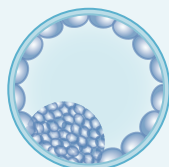
Grade 1  
Early blastocyst  
初期胚盤胞



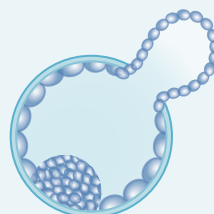
Grade 2  
blastocyst  
胚盤胞



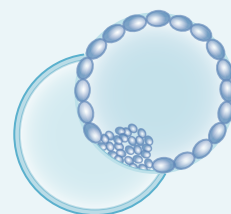
Grade 3  
Full blastocyst  
完全胚盤胞



Grade 4  
Expanded blastocyst  
拡張胚盤胞



Grade 5  
Hatching blastocyst  
孵化中胚盤胞



Grade 6  
Hatched blastocyst  
孵化後胚盤胞

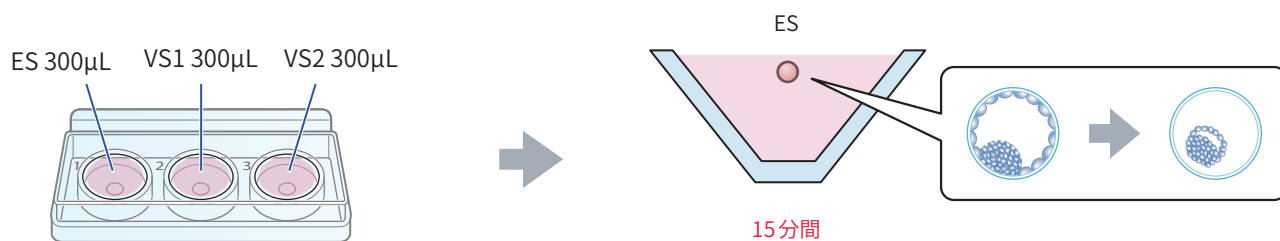
Shrinkage Solution (VT525-4) による収縮の実施を推奨します

拡張期胚盤胞

## PART3 ES平衡

胚と卵子とではES平衡の手順が異なりますので、胚は本ページ、卵子はP.6をご参照ください。  
(VS平衡以降は共通です。)

### 胚ES平衡



### 準備

Vitrification Media (VT525)を準備します。

Repro Plate にESを1ウェル分、VSを2ウェル分、各300μL、分注し蓋をして使用するまで静置します。

### STEP1

#### 胚の移動

胚を培養液の持ち込みが最少になるようにピペット先端に吸引し(図1)、胚をESウェル表面の中心に静かにのせます。

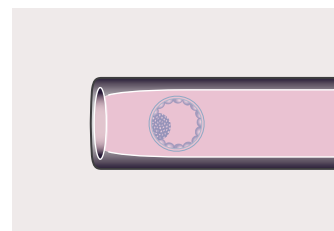


図1

### STEP2

#### ES平衡

タイマーのカウントアップを始め、15分静置します。

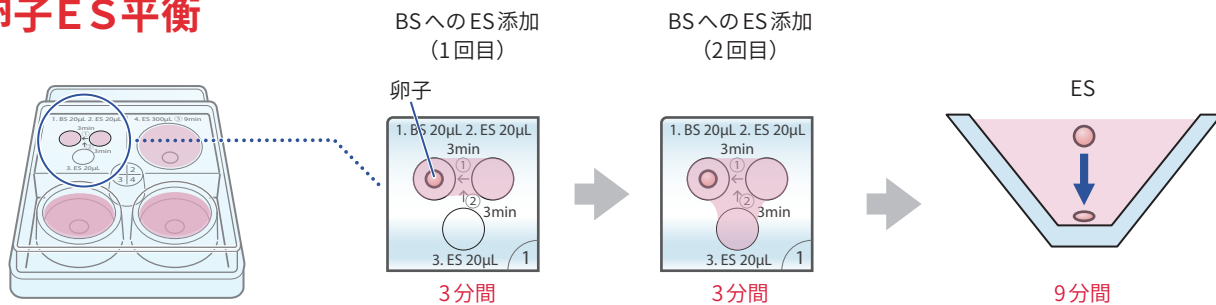
ES表面に置かれた胚が30秒程度で沈降しながら収縮していくのが観察できます。

P.7へ ➡

# ガラス化プロトコール

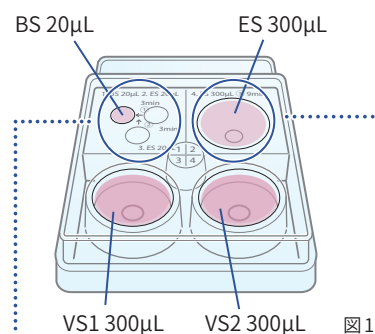
卵子と胚とではES平衡の手順が異なりますので、卵子は本ページ、胚はP.5をご参照ください。  
(VS平衡以降は共通です。)

## 卵子ES平衡



### 準備

Vitrification Media (VT525)を準備します。  
Oocyte Cryo Plate上の①のエリアにBSを20µL、②のエリアにESを300µL、③④の両エリアにVSを300µL分注し使用するまで蓋をして静置します(図1)。



### STEP1

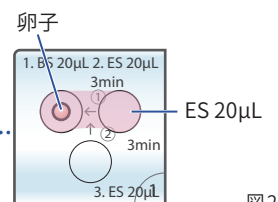
#### 卵子の移動

卵子を培養液からBSドロップ(20µL)へ移します。

### STEP2

#### ESの添加(1回目)

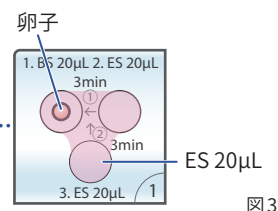
BSドロップの右隣にESを20µL分注し、分注したチップの先端を使用して、BSドロップとESドロップをつなげて3分間静置します(図2)。



### STEP3

#### ESの添加(2回目)

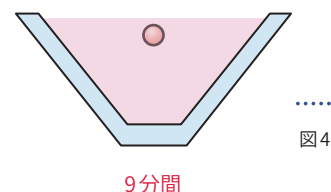
STEP2のドロップの下にESを20µL分注し、分注したチップの先端を使用して、上のドロップとつなげて3分間静置します(図3)。



### STEP4

#### ESウェルへの卵子の移動

Oocyte Cryo Plateの②エリアに分注したES (300µL)表面に、卵子を移動させ9分間静置します(図4)。

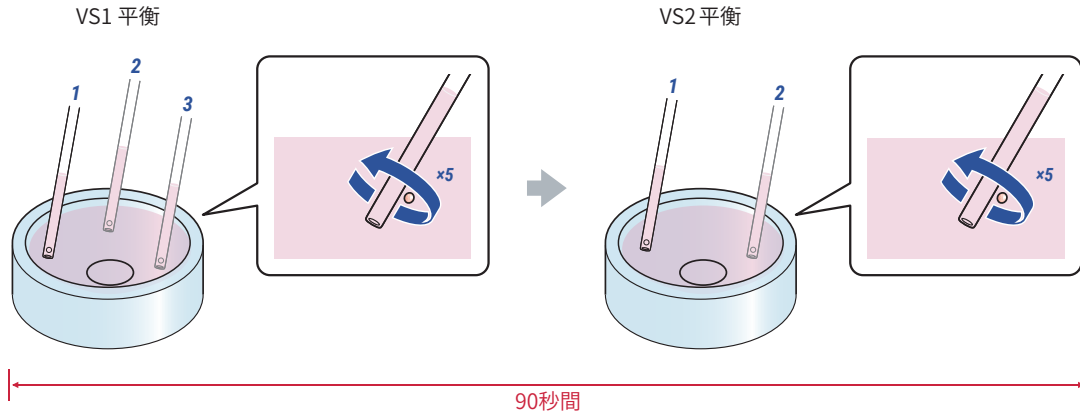


### POINT

- 卵子は観察する角度によって回復の確認が困難な場合がありますが、その場合も9分間でSTEP4は終了します。
- ドロップをつなげることで浸透圧変化が穏やかになりますので、卵子には触れずに静置させておきます。

## PART4 VS 平衡

このページ以降は卵子と胚で共通の操作です。  
冷却用の液体窒素と Cryotop を作業前に準備します。



### STEP1

#### 卵子/胚の移動

ES 平衡が完了した卵子/胚を、ES の持込みが最少になるようにピペット先端に吸引します (図1)。

吸引した卵子/胚を VS1 ウェルの表面に移しタイマーのカウントアップを始めます。

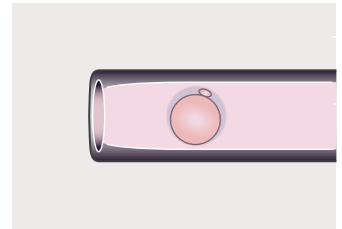


図1

### STEP2

#### ピペットの洗浄

ピペット内の ES を全てウェル外へ排出し、VS を十分量 吸引・排出することでピペット内を洗います (図2、3)。

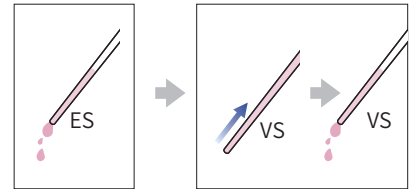


図2

図3

### STEP3

#### VS1 平衡

卵子/胚を吸引し、VS1 のウェル内の3カ所で①②の操作を行います。

- ① 卵子/胚をピペットから VS 内に排出します。
  - ② 卵子/胚周辺を5秒かけて穏やかに5回かき混ぜます。
- ①②の操作を場所を変えて合計3回行うことで卵子/胚を VS に平衡させ脱水します。

### STEP4

#### VS2 平衡

VS2 で STEP2 と同様にピペットの洗浄を行います (図3)。

STEP3 の①②の操作を VS2 ウェル内で場所を変えて2回行います。

VS 平衡が完了していることが下記2点で確認できたら、卵子/胚を Cryotop にのせます。

- 卵子/胚が収縮している。
- 卵子/胚が浮き上がってこない(卵子/胚に合わせたピントがずれない)。

上記の2点が確認できない場合は、①②の操作を慌てずに再度行い確認します。

### POINT

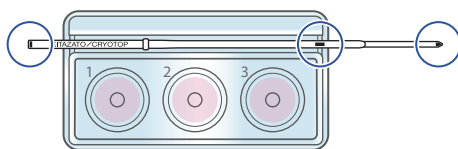
- ピペット内を VS1 でしっかり洗浄することで VS 平衡を効率的に行います。
- 脱水が不十分にならないように、VS1 平衡と VS2 平衡の操作時間は合わせて90秒を目安に行います。

## PART5 ガラス化・保存

### 準備

Cryotopを黒マークを上向きにして置きます。

液体窒素を液体窒素容器になるべく上限まで入れ、冷却時に素早くCryotopを投入できるよう準備します。



### STEP1

#### 卵子/胚の移動

Cryotopの先端黒マークにピペットを合わせ(図1)、黒マークの近くにVSを横に伸ばすように排出して、卵子/胚を置きます(図2)。

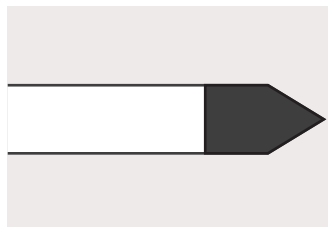


図1

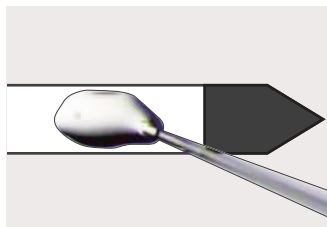


図2

### STEP2

#### 余分なガラス化液の吸引除去

Cryotop上にある余分な液を、横に伸ばしたドロップの端(なるべく卵子や胚から離れたところ)からピペットで吸引します(図3)。ドロップから影が無くなる程度が最適な液量です(図4)。

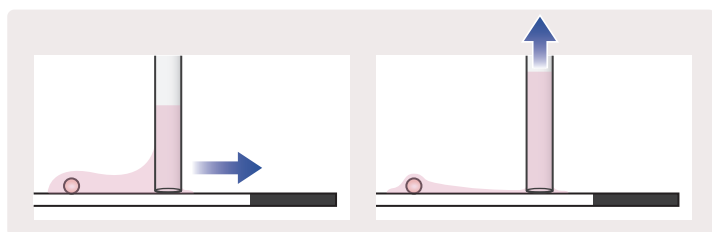


図3

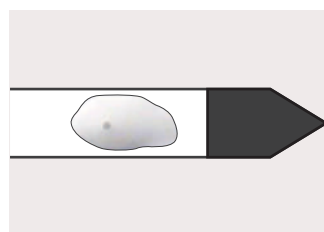


図4

### POINT

- 卵子/胚をピペット先端に吸引します。
- VSを横に伸ばすようにCryotopにドロップを作ることで、余分な液を吸引する際に、卵子/胚を吸引してしまう可能性が低くなります。

### STEP3

#### 卵子/胚の確認

ピペットをCryotopから離し、卵子/胚がCryotopにのっていることを確認します。



## STEP4

### 急速冷却

Cryotopを液体窒素中に1秒以内に投入しガラス化します。

## STEP5

### ストローキャップの装着

液体窒素中で、Cryotopシート先端部を確認しながら、ピンセットでストローキャップをつかみ、差し込みます(図1)。

空気中でストローキャップ上部を指でつかみ、Cryotopをねじりながらしっかりと差し込みます(図2、3)。作業中には、Cryotop先端が空気中に出ないように十分に注意してください。

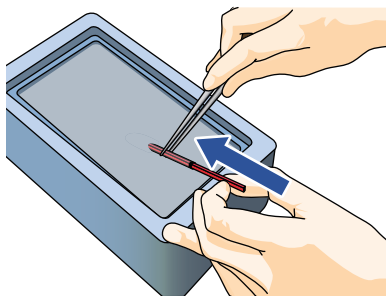


図1

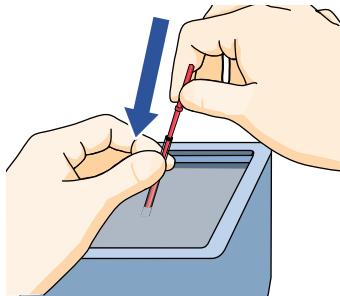


図2

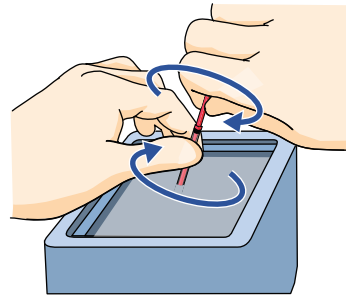


図3

## STEP6

Cryotopにストローキャップが確実に固定されていることを確認し、ケーンに移して液体窒素タンク内に保管します。

### POINT

室温から急速に冷却させるため、液体窒素は容器になるべく満杯に入れておきます。

### Information

#### Cryotop 1本あたりの卵子/胚数

卵子 Cryotop1本で保存する卵子数は3個までを推奨します。

胚 Cryotop1本にのせる胚の数は加温後の使用個数にあわせてます。

例：1胚移植の場合は、1本に1個の胚を保存します。

## 加温の流れ



## PART1 必要な機器・消耗品

1. Thawing Media (製品コード：VT526)
  - No.1 TS(Thawing Solution) 3.8mL ×1
  - No.2 DS(Diluent Solution) 1.5mL ×1
  - No.3 WS(Washing Solution) 1.5mL ×2
2. 35mm ディッシュ  
※使用前にTSと35mmディッシュは37°Cに、DSとWSは室温に平衡させます。
3. Repro Plate
4. 卵子/胚操作用ピペット
5. カウントアップ機能付タイマー
6. 冷却用液体窒素
7. 液体窒素容器(製品コード：Cooling Rack)
8. 液体窒素用ピンセット
9. マイクロピペット・チップ：300μL用
10. 実体顕微鏡(加温プレートは全工程OFF)

### POINT

- 操作性を高めるため、ピペットの内径は卵子または胚の大きさに合わせてご使用ください(卵子：約140μm、胚：140-250μm)。
- 加温の操作はTS平衡以外すべて室温で行います。

## PART2 準備

### STEP1

#### TSの加温

Thawing Media (VT526)を準備します。

加温する患者数分のTSチューブをキャップをしたまま、35mm ディッシュとともに37°Cに加温しておきます。  
※TSの加温時間(目安)：インキュベーターでは30分以上、ウォーターバス(40°C)では5分以上を目安に温めてください。加温は品質を保つため8時間を超えないようにしてください。

## STEP2

### Cryotopの移動

Cryotopを保管タンクから取り出し、液体窒素を満たした容器に素早く移します。

Cryotop先端が液体窒素から出ないように十分注意してストローキャップを外し、Cryotopを顕微鏡側に立てかけておきます(図1、2)。

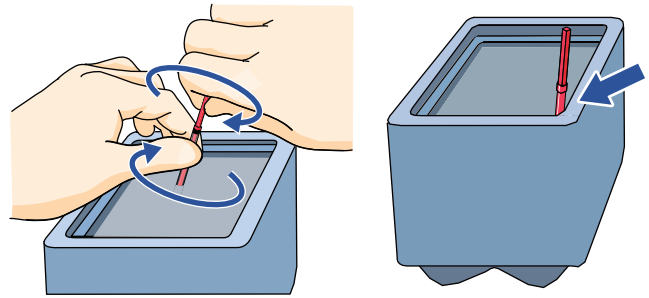


図1

## POINT

液体窒素容器には液体窒素をなるべく上限までいれ、加温時に短距離で素早く Cryotop を TS に投入できるように準備します。

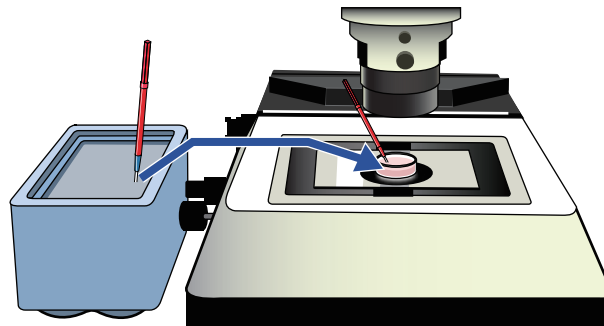


図2

## STEP3

### ディッシュの作製

Repro Plate に DS を 1 ウェル、WS を 2 ウェル分、各 300 $\mu$ L 分注し蓋をします。

DS、WS を準備した後、インキュベーター等から加温した TS チューブと 35 mm ディッシュを取り出し、全量をディッシュに空けます(図3)。

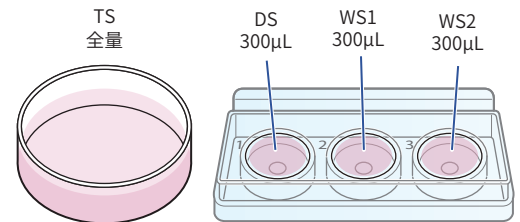


図3

## POINT

TS液は凍結保護物質が高濃度に含まれるため、使用前に必ず5回転倒混和させ、全量をディッシュに空けます。

## STEP4

### 顕微鏡セッティング

予めTSの中心部にパストツールを使用してフォーカスを合わせ(図4)、顕微鏡の倍率を最小(視野を広く)にしておきます。

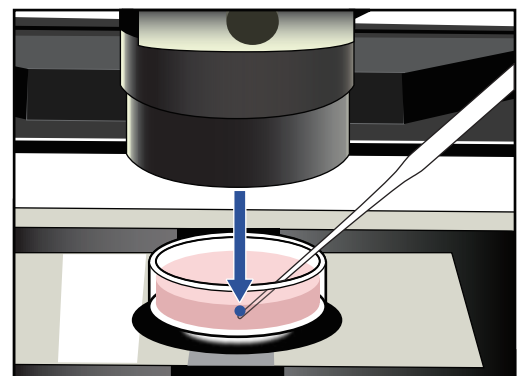
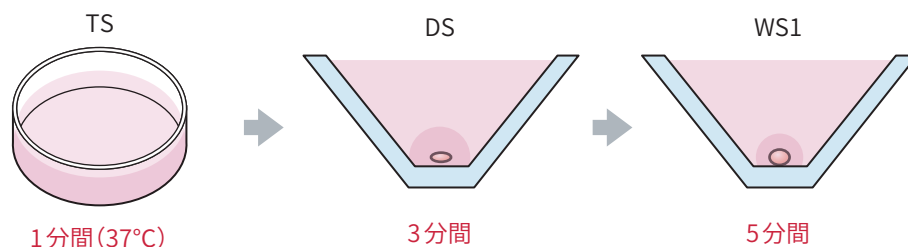


図4

## PART3 TS・DS・WS平衡



### STEP1

#### TS平衡

タイマーをスタートします(カウントアップで表示すると時間経過が分かりやすいです)。Cryotopのシート部分を、すばやく1秒以内に液体窒素からTSに投入して加温します。シート先端にフォーカスを合わせ、卵子/胚を確認します。卵子/胚がシートから自然に離れても観察を続け、1分間なるべく触らずに待ちます。

### POINT

卵子/胚がシート部に付着したままの場合は、TS平衡開始から1分後にピペットで液を吹きかけてはがすか、ピペットでシート先端を静かに触れて振動を与えてはがします。いずれの方法においてもTS平衡開始からの経過時間は気にせず、卵子/胚を傷つけないように慎重に行います。

### STEP2

#### DS平衡

TS平衡終了後、卵子/胚をピペットで吸い上げ、さらにピペット先端に約2mmのTSを余分に吸います(図1)。そのままDSウェル底面の中央にピペット先端を置き、卵子/胚を静かに排出させ3分間静置します(図2)。

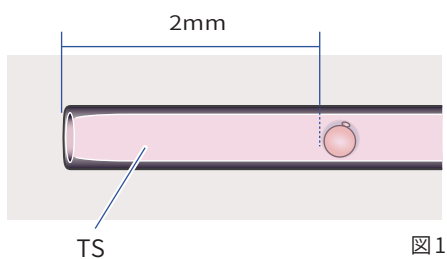


図1

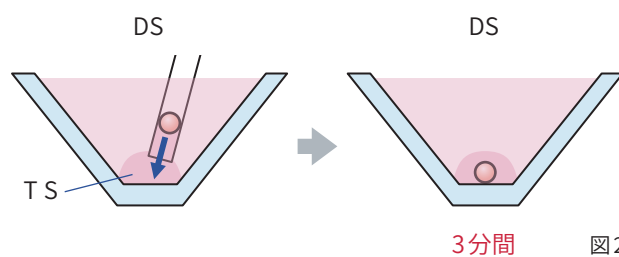


図2

## STEP3

### WS平衡

ピペットをDSで洗浄します。

卵子/胚をピペットに吸引した後にDSを2mmピペット先端に吸引し、STEP2と同様にWS1ウェルの底面に排出させ、5分間静置します。

### POINT

- 希釈の工程は、卵子 / 胚の周囲の液が徐々に混ざり、浸透圧変化が緩やかになることが重要です。
- ピペット先端の2mmはおおよそで構いませんが、前工程の試薬を次工程の試薬に持ち込むことが目的です。2mmの見当を付ける際は、Cryotopの先端が1mm幅であることや卵子 / 胚の直径を目安に行ってください。

## PART4 洗浄

### STEP1

#### WS2 洗浄

ピペットをWS2で洗浄します。

卵子/胚をWS1の持込みが最少になるようにピペットの先端に吸引し(図1)、WS2の表面に移します。

卵子/胚が底面まで沈んだら、再度ピペットで吸引しWS2の表面に移し、底面まで沈むのを待ちます(図2)。

各操作時間の計測は不要です。

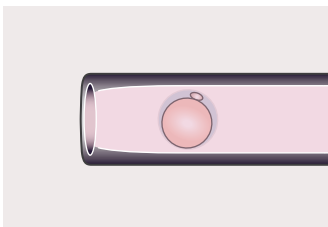
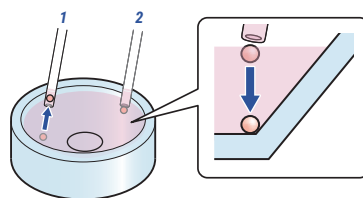


図1



WS2

図2

### STEP2

#### 回復培養

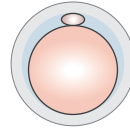
卵子/胚は洗浄完了後に回復培養を行います。

回復培養時間の目安は、卵子：2～3時間、胚：30分～2時間です。

胚の回復培養は生存確認のために行います。生存が確認されたら時間に関わらず次の工程に移します。

卵子はスピンドルの回復に約2～3時間要しますので、ICSIなど次の工程はスピンドルの回復が確認できた後、あるいは回復培養を2～3時間行った後に実施します。

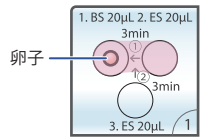
# 卵子プロトコール



## ガラス化

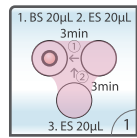
### ES step

BS (20 $\mu$ L) + ES (20 $\mu$ L)  
(1回目)



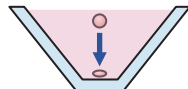
3分間

+ ES (20 $\mu$ L)  
(2回目)



3分間

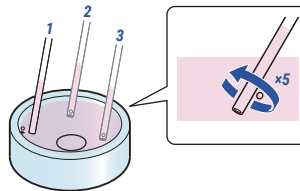
ES (300 $\mu$ L)



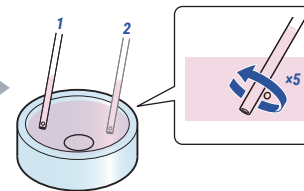
9分間

### VS step

VS1 (300 $\mu$ L)



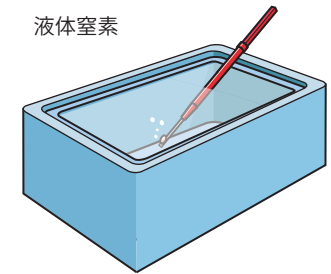
VS2 (300 $\mu$ L)



90秒間

### ガラス化 保存

液体窒素

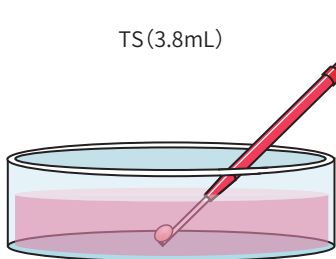


室温

## 加温

### TS step

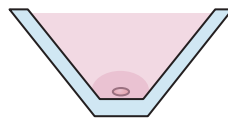
TS (3.8mL)



1分間 37°C

### DS step

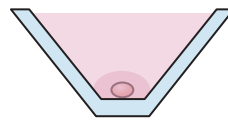
DS (300 $\mu$ L)



3分間

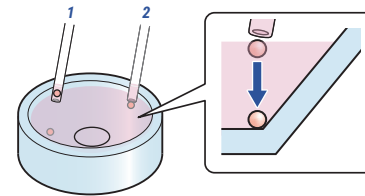
### WS step

WS1 (300 $\mu$ L)



5分間

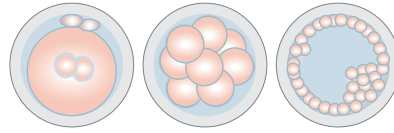
WS2 (300 $\mu$ L)



37°C

室温

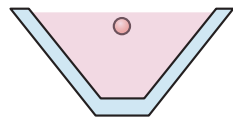
# 胚プロトコール



## ガラス化

ES step

ES (300 $\mu$ L)

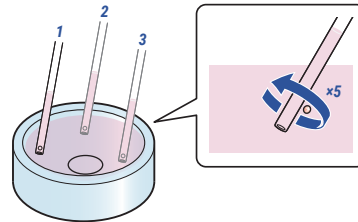


15分間

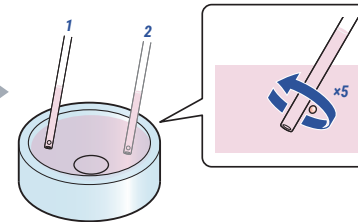


VS step

VS1 (300 $\mu$ L)



VS2 (300 $\mu$ L)

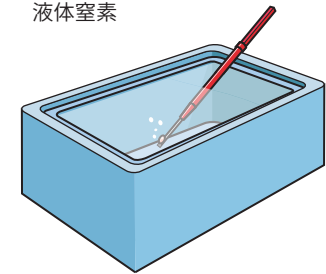


90秒間



ガラス化 保存

液体窒素

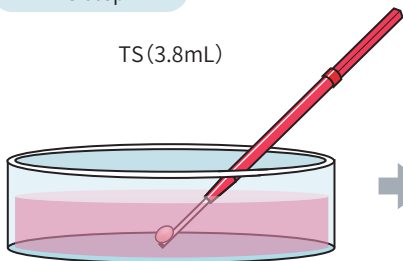


室温

## 加温

TS step

TS (3.8mL)

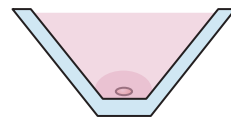


1分間 37°C



DS step

DS (300 $\mu$ L)

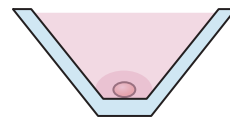


3分間



WS step

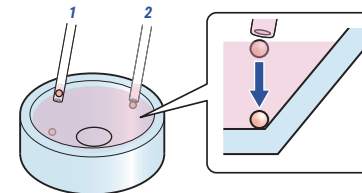
WS1 (300 $\mu$ L)



5分間



WS2 (300 $\mu$ L)



室温

37°C

*Happiness, for the Next Generations*