

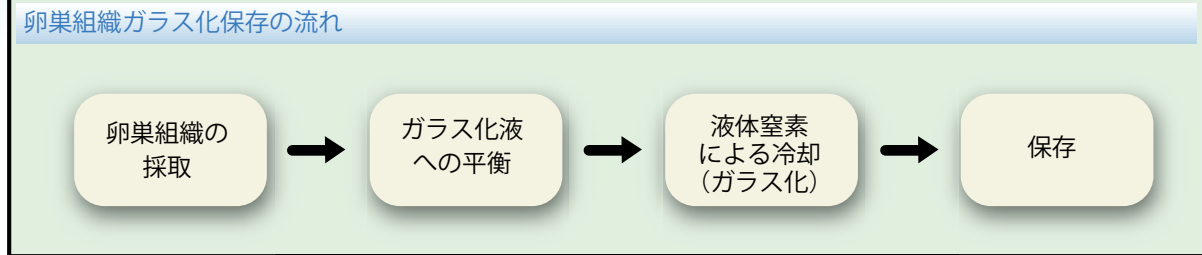
# CRYOTISSUE KIT

**Protocol**

Cryotissue 取扱説明書

**KITAZATO®**

## 凍結プロトコール



## 用意するもの

1. Cryotissue Vitrification Kit (Ref. VT 301- CT)
  - Cryotissue
  - スクエアメジャー
  - Vitrification media
    - No.1 平衡液 (ES: Equilibration Solution)
    - No.2 ガラス化液 (VS: Vitrification Solution)
2. 液体窒素容器
3. 液体窒素
4. カウントアップ機能付タイマー
5. ピンセット 組織採取用、冷却用 各1個
6. ケーン
7. メス (替刃: No.11)
8. ミクロトーム替刃 (S35, フェザー)
9. トリミングナイフハンドル (F-80 ミニ, フェザー)
10. 60mm ディッシュ

# 凍結プロトコール

## STEP 1 準備

- Cryotissueの滅菌パックを開封し、情報（凍結日、氏名、組織の状態や数、等）をCryotissue持ち手に油性マジックで記入します。
- ES、VS液を室温に温めます。



記入例

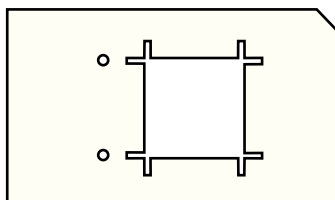


### 重要

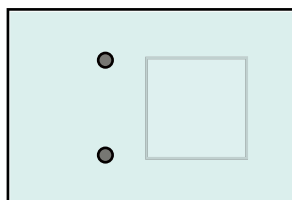
融解後の高い生存率を得るために、凍結保護物質（ES、VS液）への平衡が確実に  
行えるよう、液は室温（15～30℃）に保ってご使用ください。15～30℃に保てない  
場合にはSTEP3をP.6の《室温が低い場合》のプロトコールで進めてください。

## STEP 2 卵巣組織の採取

スクエアメジャーは卵巣組織を切り取るためのデバイスです。2つのパート、AとBで構成されます。



スクエアメジャーA



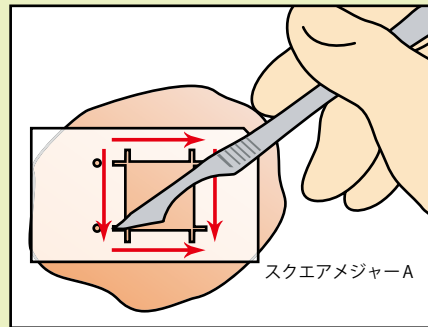
スクエアメジャーB

1. 卵巣表面の余分な水分を滅菌ガーゼで拭き取り、スクエアメジャーが滑らないようにします。
2. 卵巣表面にスクエアメジャーAの角の欠けが右上になるように乗せます。
3. スクエアメジャーAの内側に沿って切り目を入れていきます。

## 凍結プロトコール

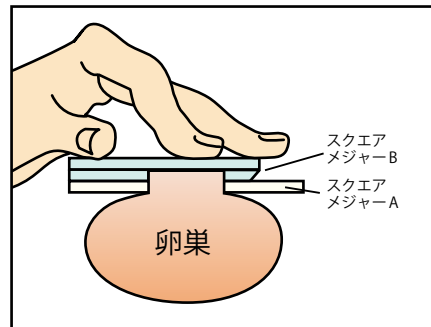


TIP

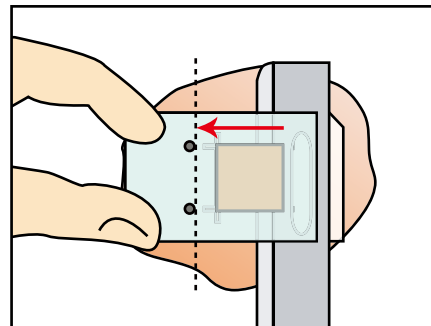


※ 必ず#の形に切り目を入れてください

4. スクエアメジャーBをスクエアメジャーAに取り付け、卵巢表面に押し付けます。マイクロトームの刃をスクエアメジャーAとBの間に挿入し、金属突起まで切り進めます。



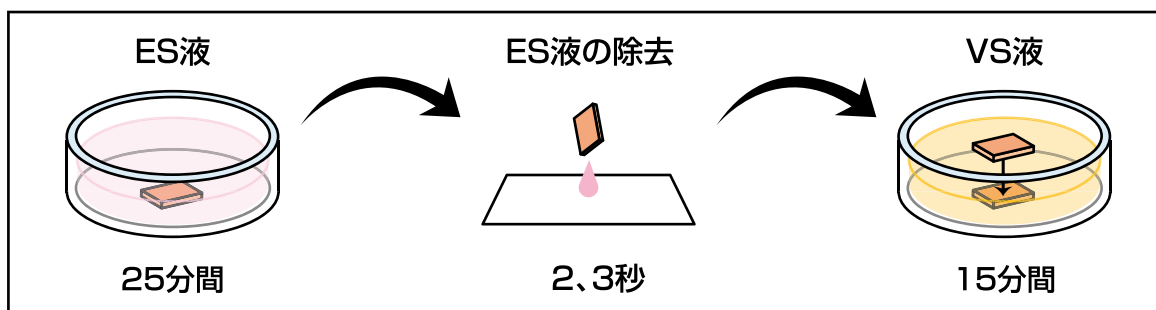
5. スクエアメジャーを外し、細切した卵巢皮質を mHTF に浸漬し、乾燥を防ぎます。



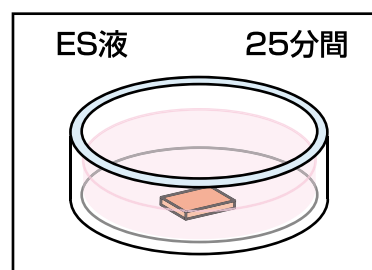
# 凍結プロトコール

## STEP 3 ガラス化液への平衡

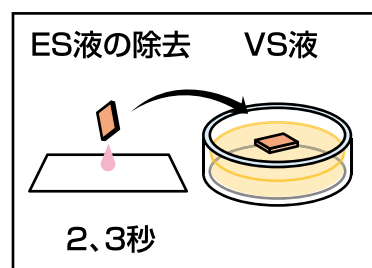
※室温が15～30℃に保てない場合にはSTEP3をP.6の《室温が低い場合》のプロトコールで進めてください。



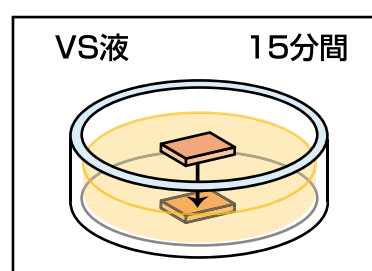
1. 60mm ディッシュにES液を全量15mlあけ、採取した卵巢組織をES液へ25分間浸漬します。



2. 60mm ディッシュにVS液を全量15mlあけます。ES液平衡を終えた卵巢組織をピンセットで回収し、余分なES液を除去後、VS液へ移します。



3. VS液に15分間浸漬し、VS液表面に浮遊していた卵巢組織が底に沈んだら、平衡完了です。



### 重要

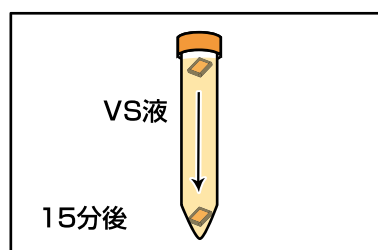
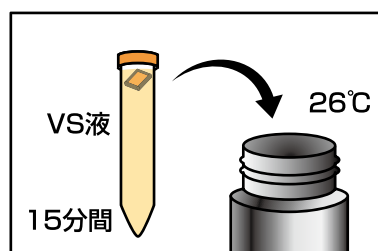
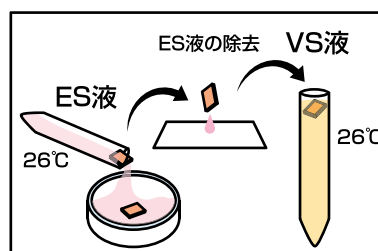
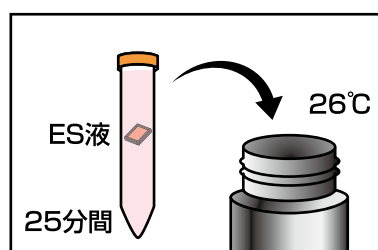
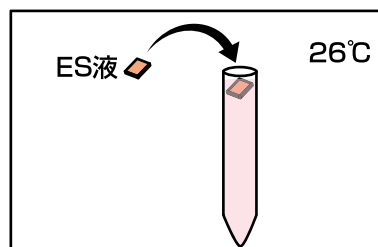
VS液へ15分間浸漬しても組織が沈まない場合は浸漬時間を沈むまで延長します。  
なお15分以内に沈んだ場合も、浸漬は15分間行ってください。

## 凍結プロトコール

### 《室温が低い場合のガラス化液の平衡》

ES、VS液への平衡は26℃に保温しながら行って下さい。

1. キット内のES液を26℃の水が入った魔法瓶で保温します。
2. 26℃に保温したES液に採取した卵巢組織を投入します。
3. キャップをしめ、再び26℃に保温しながら卵巢組織を25分間浸漬します。
4. VS液を魔法瓶で26℃に保温します。
5. 60mm ディッシュに卵巢組織の入ったES液を全量15mlあけます。ES液平衡を終えた卵巢組織をピンセットで回収し余分なES液を除去後、VS液へ移します。
6. キャップをしめ、再び26℃に保温しながら卵巢組織を15分間浸漬します。
7. 試験管の底に卵巢組織が沈んだら、平衡完了です。



### 重要

VS液へ15分間浸漬しても組織が沈まない場合は浸漬時間を沈むまで延長します。  
なお15分以内に沈んだ場合も、浸漬は15分間行ってください。

## STEP 4 液体窒素による冷却

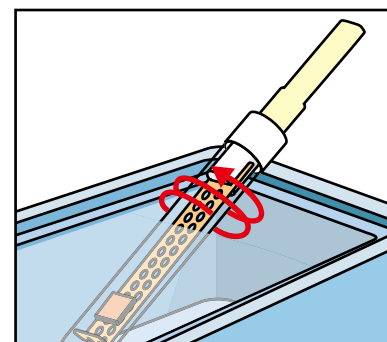
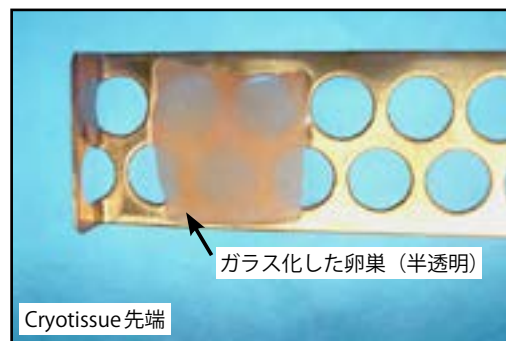
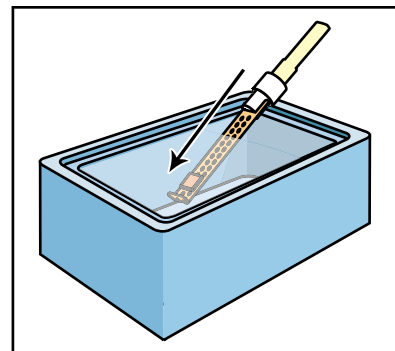
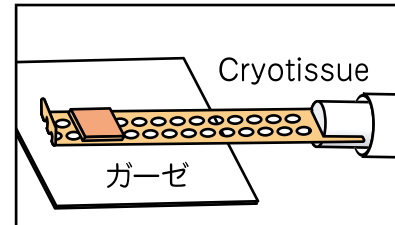
1. VS平衡が完了した卵巢組織をCryotissueの上へのせます。

2. 組織をのせた部分の裏側に滅菌ガーゼを当て、余分なVS液を吸いとらせます。

3. Cryotissueを、液体窒素へすばやく投入し超急速に冷却します。

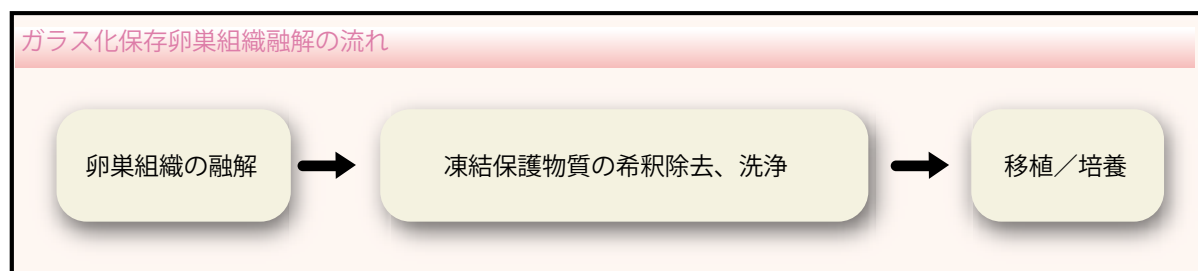
4. 卵巢組織が半透明である（ガラス化している）ことを肉眼で確認します。

5. 液体窒素中でキャップを装着し、最後までひねって密封後、保管。



## 融解プロトコール

### ガラス化保存卵巣組織融解の流れ



## 用意するもの

1. Cryotissue Thawing Kit (Ref. VT 302- CT)
  - Thawing media
    - No.1 融解液 (TS: Thawing Solution)
    - No.2 希釈液 (DS: Diluent Solution)
    - No.3 洗浄液1 (WS1: Washing Solution 1)
    - No.4 洗浄液2 (WS2: Washing Solution 2)
2. 液体窒素容器
3. 液体窒素
4. カウントアップ機能付タイマー
5. ピンセット
6. 60mm ディッシュ
7. 90mm ディッシュ



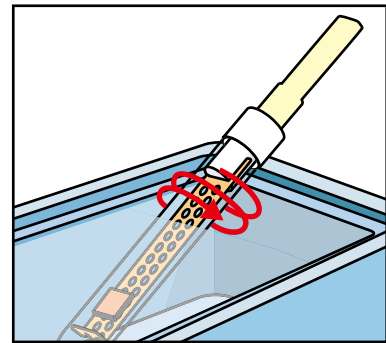
# 融解プロトコール

## STEP 1 準備

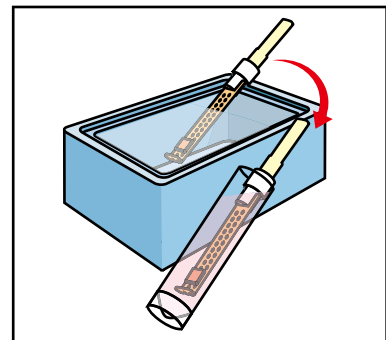
TS液は37℃に、DS、WS液は室温に温めておきます。

## STEP 2 融解

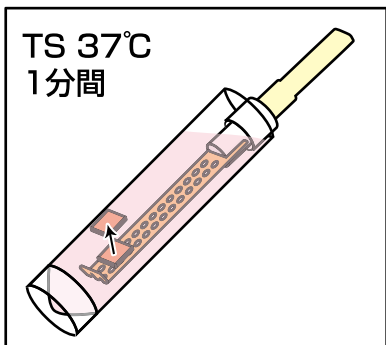
1. 液体窒素中でCryotissueのキャップをねじり、外します。



2. 液体窒素から、37℃に温めたTS液へCryotissue先端のメタル部分を1秒以内に投入し、超急速に加熱します。

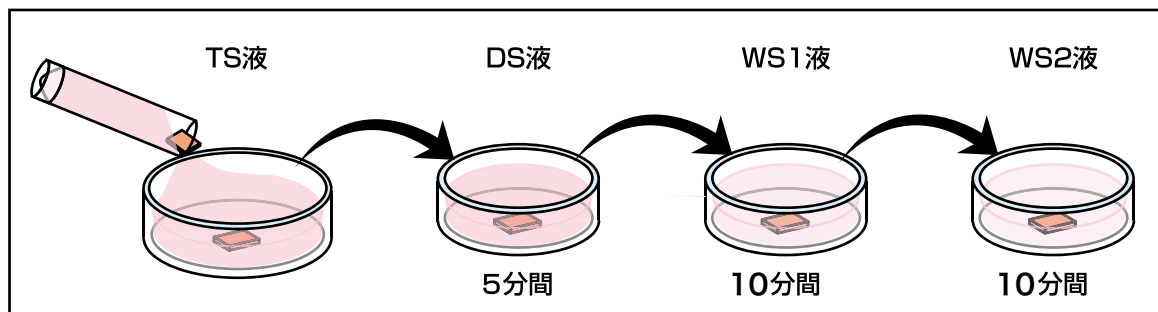


3. 投入から1分間卵巢組織をTS液へ浸漬し、投入中、卵巢組織がCryotissueから自然にはがれたらCryotissueを静かに抜きます。

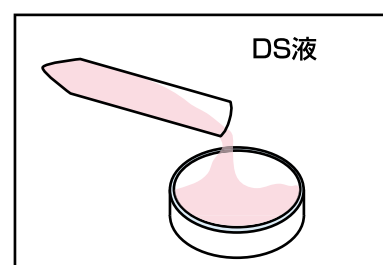


## STEP 3

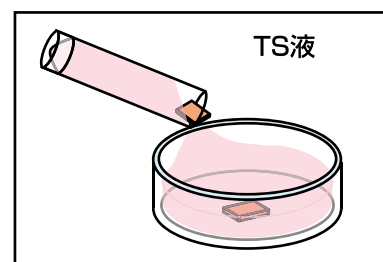
## 凍結保護物質の希釈、洗浄



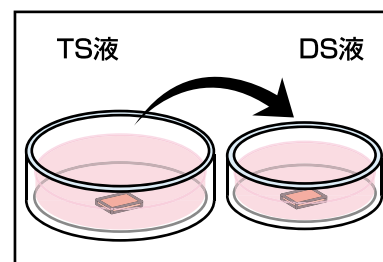
1. 60mm ディッシュにDS液を全量15mlあけ、希釈の準備をしておきます。



2. 融解した卵巣組織のはいたTS液を全量90mm ディッシュにあけます。



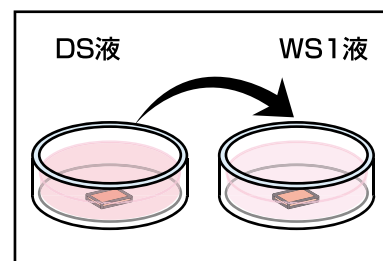
3. TS液から卵巣組織をピンセットで回収し、DS液へ移します。



4. DS液で5分間浸漬します。

5. 60mm ディッシュにWS1、2液をそれぞれ全量15mlあけ、洗浄の準備をしておきます。

6. DS液から卵巣組織を回収し、WS1液へ移します。

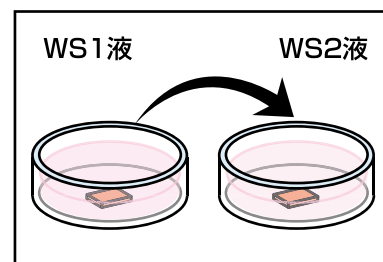


7. WS1液で10分間浸漬します。

## 融解プロトコール

8. WS1液から卵巢組織を回収し、さらにWS2液へ移します。

9. WS2液へ10分間浸漬します。



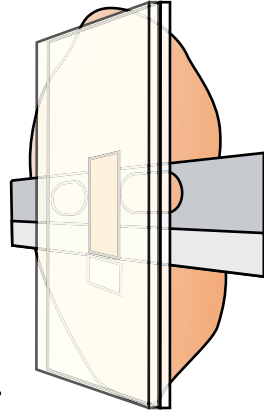
### STEP 4

### 移植・培養

洗浄完了後、速やかに移植・培養を行います。

お問い合わせ先  
FAX : 0545-65-7128  
E-MAIL : info@kitazato.co.jp

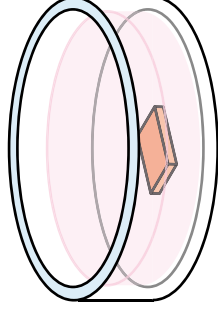
卵巣スライス



卵巣組織



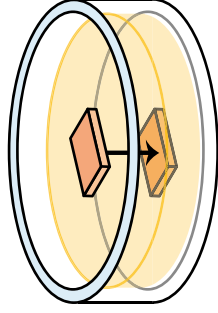
ES



25min



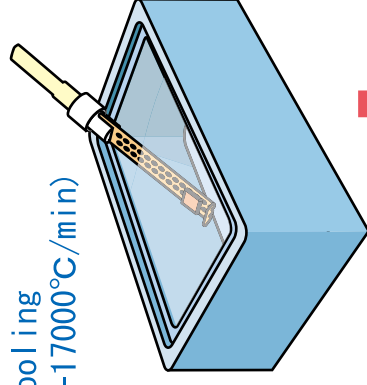
VS



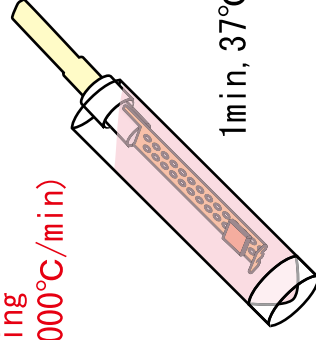
15min



LN<sub>2</sub> Cooling  
(-17000°C/min)



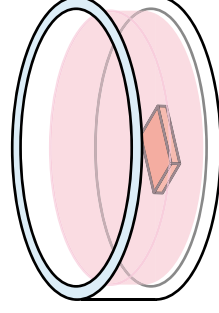
TS Warming  
(+32000°C/min)



1min, 37°C



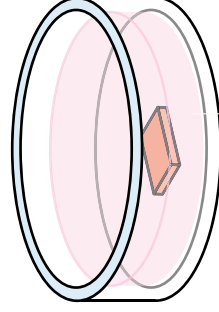
DS



5min



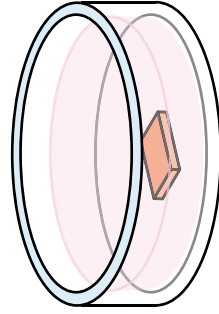
WS1



10min



WS2



10min



移植・培養



# Cryotissue kit Protocol

(for ovarian tissue vitrification)



**KITAZATO®**