

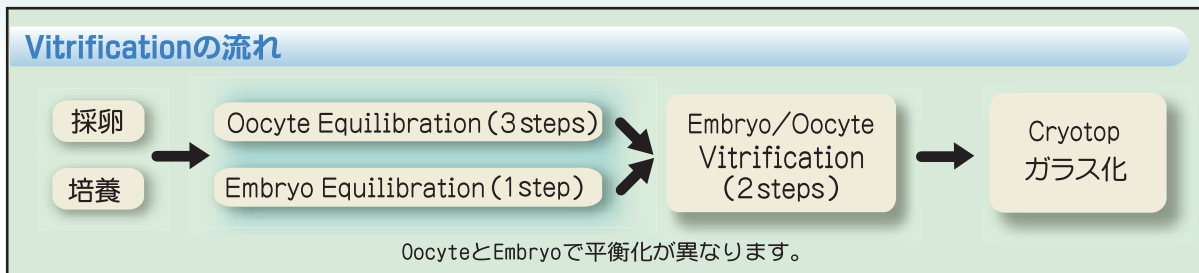
CRYOTOP SAFETY KIT

Protocol

Cryotop 取扱説明書
凍結・融解プロトコール

KITAZATO®

凍結プロトコル



PART 1

用意するもの

1. Cryotop Safety Kit - Vitrification

No.0 基礎培地 (BS: Basic Solution) 卵子凍結時のみ使用。

No.1 平衡液 (ES: Equilibration Solution)

No.2 ガラス化液 (VS: Vitrification Solution)

使用前に、室温 (25～27℃) に温めておきます。

Cryotop 必要な本数分：1本のCryotop当り3個までの卵子・胚の凍結保存を推奨しております。

リプロプレート (6穴ディッシュ)

2. 液体窒素容器 (Ref. VT-CLB)

3. パスツールピペット (Ref. MT-P150)

4. 実体顕微鏡 (加温プレートは全工程OFF)

5. カウントアップ機能付タイマー

6. 冷却用液体窒素 (テフロン製メンブランフィルターで濾過滅菌が可能です。) Filter Teflon Millipore

7. ピンセット

8. マイクロピペット 2種類 (2～20 μ l用、100～1000 μ l用)

9. 凍結保存用容器、備品類 ケーン、ゴブレット、タンク等



重要

融解後の高い生存率を得るために、ガラス化液 (VS) の容量を最小化できるよう、必ずパスツールピペットの口径 (内径) を卵子及び胚の大きさ (卵子外径=140 μ m、胚外径=140-200 μ m) に合わせてご使用ください。

VITRIFICATION KIT

PART 2

準備

Cryotopの滅菌パックを開封し、情報（凍結日、氏名、卵子・胚の状態）をCryotopの持ち手に油性マジックで記入、もしくはストローラベラーに記載し貼っておきます。



記入例

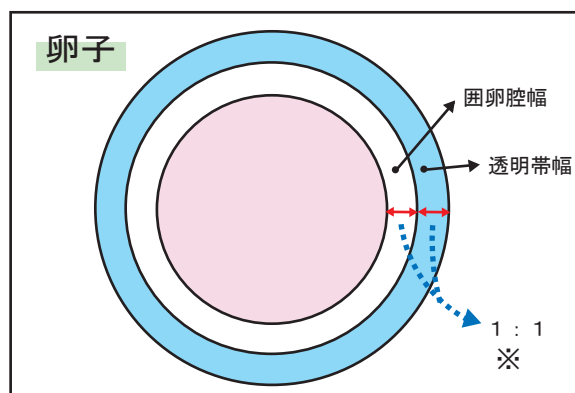
準備 1

冷却用の液体窒素の準備をします。液体窒素を付属の容器に9割程度量、入れておきます。

※卵子凍結を行う場合は、卵丘細胞を裸化しておきます。

準備 2

パストツールピペットを用いて卵子・胚の形態を観察し、スケッチを取ります。



※…平均的な卵卵腔の幅を透明帯厚と比較して、ES投入前のその比を記録しておきます（ex. 卵卵腔幅：透明帯厚＝1：1）

このことによって、ESへの投入後、平衡の完了の目安ができ、容易に判定できます

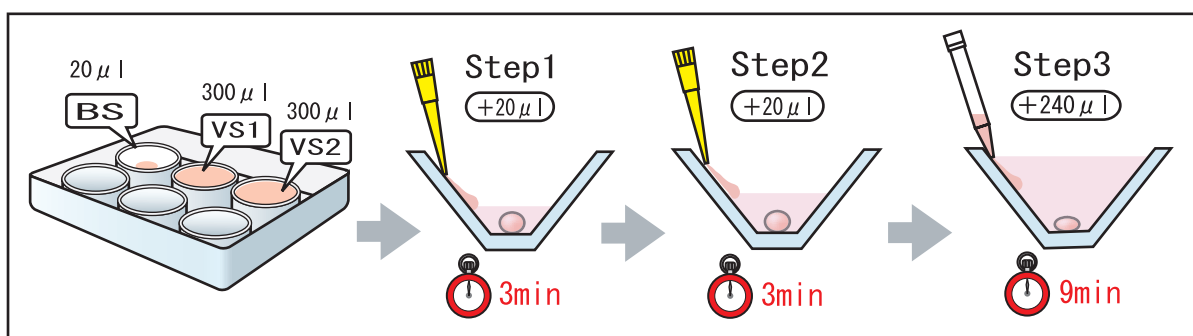
凍結プロトコール

PART 3

ES 平衡

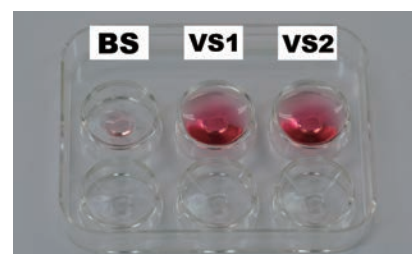
卵子と胚はES 平衡の手順が異なります。ご注意ください。(VS 平衡以降は共通です。)

卵子 ES 平衡



ウェル準備

ピペット操作により、リプロプレートのウェル1にBSを20 μ l、VSをウェル2, 3に300 μ lずつ分注し、使用するまでフタをします。



卵子の投入

卵子を培養液のドロップからBSドロップ (20 μ l) の底面へ投入します。



平衡化 Step1 - 3分間

タイマーをセット (カウントアップ) します。以下の作業は、時間経過を確認しながらの操作になります。
卵子の入ったBS端の表面へ、チップをスライドさせながら、(①→②) ESを20 μ l ゆっくりと加え、3分間静置します。

Step2 - 3分間

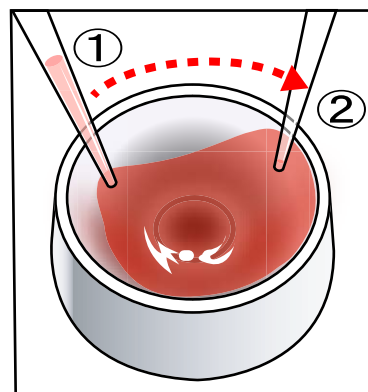
同様に、混合液の表面へマイクロピペットをスライドさせながら、ESを20 μ l ゆっくりと加え、3分間静置します。

Step3 - 9分間

さらに混合液の表面へマイクロピペットをスライドさせながら、ESを240 μ l ゆっくりと加え、9分間静置します。

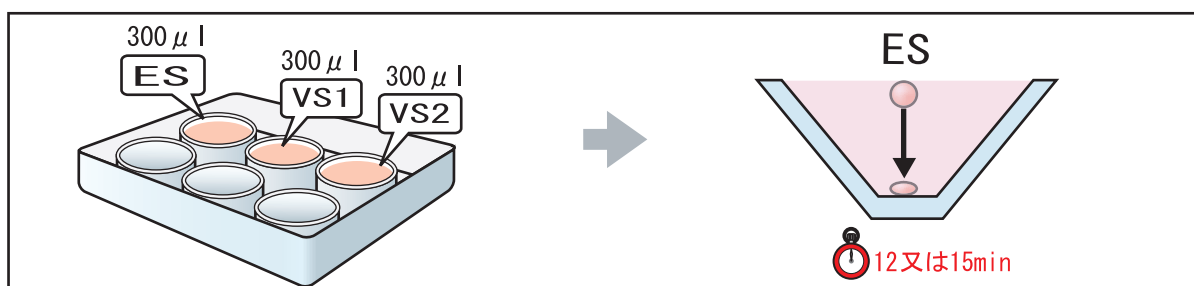
収縮した卵子の体積が**完全に回復**するのを待ちます。
囲卵腔の幅が、ESへ入れる前の幅に戻れば平衡完了です。

ピペット操作



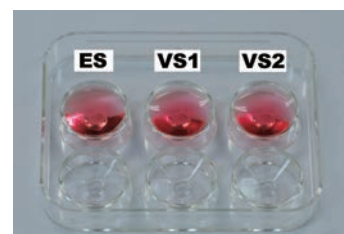
VITRIFICATION KIT

胚ES平衡



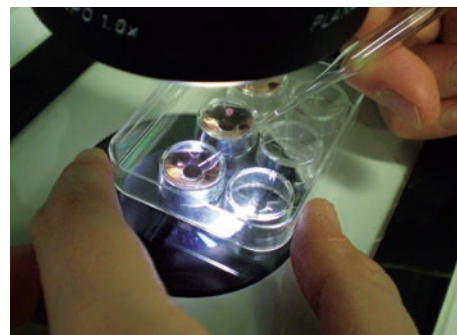
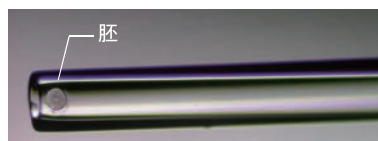
ウェル準備

ES、VSをピペット操作によりリブプレートにそれぞれ300 μ lずつ1ウェル (ES)、2ウェル (VS) に分注し、使用するまでフタをします。



胚投入

ピペットの先端部分に胚を吸い取ります。持ち込むメディウムの量を少なくして、胚をES液面中央部の表面に静かにのせます。



ES平衡 -12または15分間

タイマーをカウントアップします。

ES表面に置かれた胚が30秒以内に沈降しながら収縮していくのが観察できます。一度大きく収縮した胚の体積が完全に回復するのを待ちます。(胚盤胞では囲卵腔がなくなるのを待ちます。)



POINT

胚盤胞では、胚の直径が140～180 μ mに達したときがガラス化のベストタイミングです。140 μ m以上になれば一刻も早く凍結しましょう。胚の体積が大きくなる程、ガラス化が困難になります。

胚の平衡所要時間は、胚の大きさおよびグレードにより異なります。小さい胚あるいはグレードの高い胚ほど、短時間で平衡が完了します。

例えば、良好胚の体積が8分間で完全に回復したら、その時点でこの処理は完了、とします。

また、観察しても胚の体積回復がはっきりと確認できなかった場合などは、前核期胚、分割期胚は12分、桑実胚および胚盤胞胚は15分間で平衡処理を終了して下さい。この時間で胚の平衡は十分に完了します。次の操作へ移して下さい。

凍結プロトコール

PART 4

VS 平衡及びガラス化

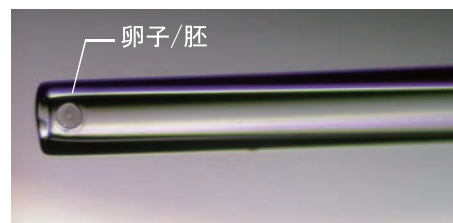
卵子及び胚に共通の操作です。

卵子・胚の導入から LN₂ 投入までは 60 秒以上 90 秒間以内で完了することを目標に操作して下さい。

卵子/胚の VS 投入

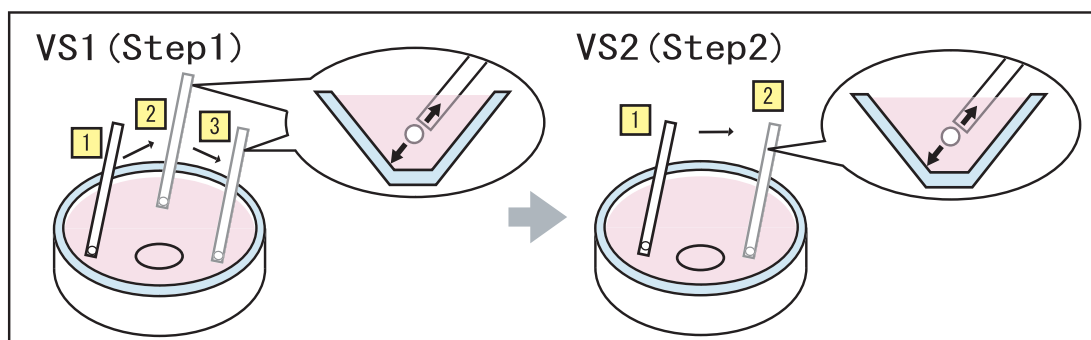
ES 平衡が完了した卵子・胚をピペット内の先端へ吸引し、ES 液の持ちこみを最小に抑えて VS 1 表面の中央部に置きます。胚のみを排出するようにし、余分な ES は VS ウェル内へ出さないように気をつけます。ただちにパストツール内を VS 1 で共洗いします。

すなわち、パストツール内の ES をウェル外へ排出、廃棄し、V1 ウェルの淵側から新鮮な VS を ES 吸引量以上に吸ってからウェル外へ排出、廃棄します。さらにもう一度新鮮な VS をピペット内へ吸引します。



VS 平衡 Step1 - 1 分間以内

VS 1 中で 3 箇所ほど場所を変えながら十分なピペッティング（胚をピペットから VS 内に勢いよく排出し、胚周辺をすばやく 5 回かき混ぜる。新鮮な VS をピペット内に吸引してから胚を吸い、場所を移して排出、かき混ぜを行うこと（3 度繰り返す）により、卵子・胚を洗浄します。ES によるかげろうが見えなくなるまで卵子・胚の細胞外液を完全に VS 1 に置換してください。かげろうが見えなくなったら、Step1 での洗浄は完了です。

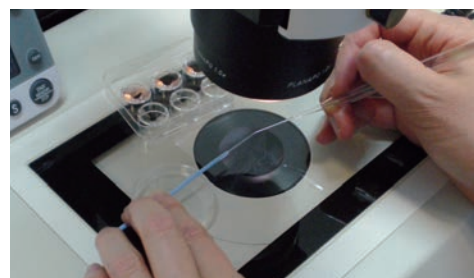


VS 平衡 Step2 - 0.5 分間

パストツール内の VS をいったんウェル外へ排出、廃棄し、VS2 ウェルの新鮮な VS をパストツールへ吸引します。ES 液の持ちこみを最小に抑えて VS2 へ卵子・胚を投入します。同様に 2 箇所ほど大きく場所を変えながら卵子・胚を排出、かき混ぜ、洗浄します。卵子・胚外部の液置換が完全に行われ、脱水により卵子・胚が扁平に収縮するのが確認できれば完了です。

Cryotop への導入 Step1（準備）

Cryotop を実体顕微鏡ステージに上向き（ロゴ面を上）置き、ハンドル部に上から手を添えて固定します。顕微鏡フォーカスを Cryotop シート部の黒いマーカーに合わせます。



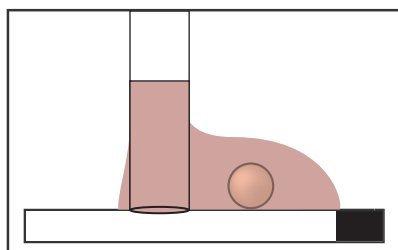
Step2

VS 2 中のシュリンクした卵子・胚をピペット内の最先端に吸引し、最小限の VS 液（ $0.1 \mu\text{l}$ 以下）とともに Cryotop シート部マーカーのすぐ隣へ置きます。2 個以上の場合は、順に 1 個 1 個別のドロップへ置いていきます。

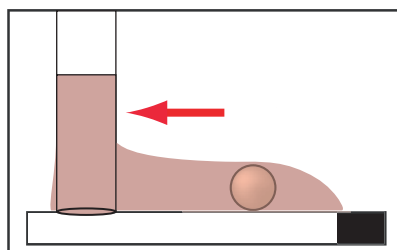


余分なガラス化液の吸引除去

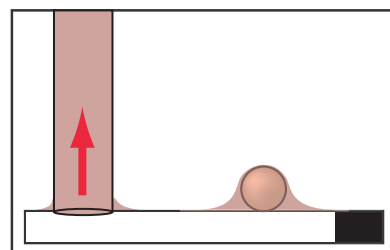
クライオトップ上に余分な液をのせてしまった場合には、ピペットをドロップへ入れ、シートをスライドさせて、液を引き伸ばし、卵・胚を吸い込まないように液のみを吸引する。



ドロップの端にピペットを入れる

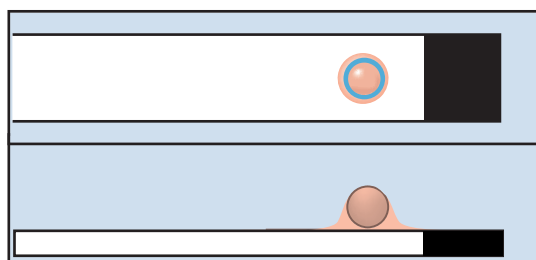


スライドさせドロップを引き伸ばす



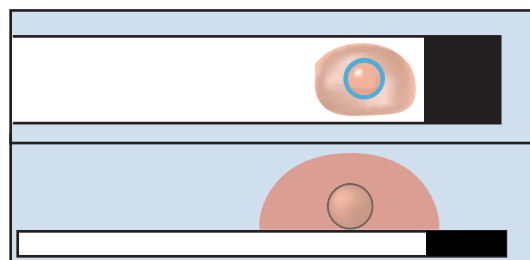
卵子を吸い込まないように液のみを吸引する

良い例



Cryotop 先端部にドロップを平面的に作成する

悪い例



VS の量が多すぎます

卵子/胚の確認

実体顕微鏡下で卵子が最小量の VS とシート部の正しい位置にのっていることを確認します。

ガラス化 Step1（ LN_2 投入による急速冷却）

液体窒素中に（躊躇せずに）一気に投入します。



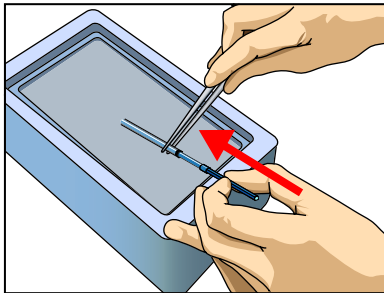
POINT

これから先、保管タンクに移すまでは Cryotop シート部は常に液体窒素中に保持してください。

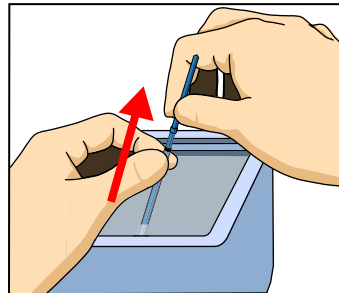
凍結プロトコール

Step2（ストローキャップの装着）

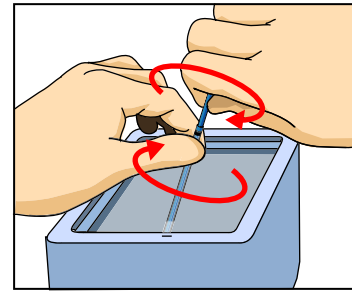
液体窒素中で、Cryotopシート先端部を確認しながら、ピンセットでストローキャップをつかみ、差し込みます。さらに最終的に空気中でストローキャップ上部を指でつかみ、Cryotopをねじりながらしっかりと差し込みます。



ピンセットでストローキャップをつかみ
Cryotopに軽く差し込む



指でストローキャップを持ちCryotopを
最後まで差し込む



ねじりながらしっかり差し込む

Step3（保管）

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存します。



POINT

卵子及び胚を封入したCryotopは融解時まで液体窒素の中で保管してください。
別の液体窒素タンクに移す場合は、CryotopをLN₂を満たしたコブレット内に入れたまま移しかえを行ってください。

補足説明

1. Cryotop 1 本あたりの凍結可能卵子 / 胚数について

Cryotop 1 本で凍結する卵子・胚数は最高で3個までを推奨します。

技術者の熟練度により、VSに投入後、液体窒素投入までの60～90秒以内にガラス化できる卵子・胚数だけ1本のCryotopで凍結が可能です。

臨床における正しい卵子・胚の凍結個数は融解後に使用する個数となります。

(たとえば1胚盤胞移植の施設では、1本に1個の胚を凍結保存します)

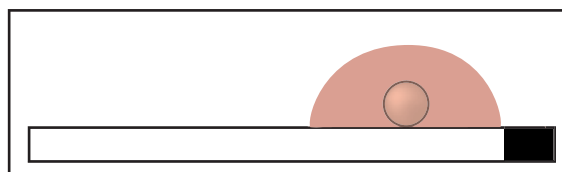
2. 正しい Cryotop 上のガラス化液量

良い例



Cryotop 先端部にドロップを最少量のVS液量で平面的に作成する (<0.1 μ l)

悪い例



VSの量が多すぎます

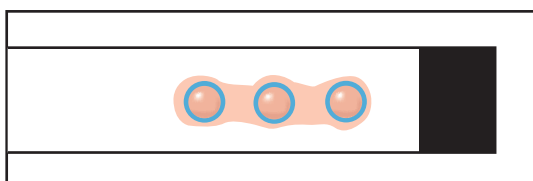
3. 多数の卵子・胚を一度に凍結する場合の平衡

一度に最大9個までの卵子・胚をES平衡可能です。ES中で形態変化を観察し、ES平衡の完了した卵子・胚から順にVSへ移動させ、ガラス化保存して行きます。

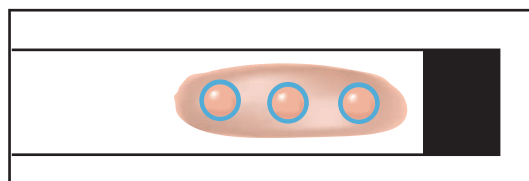
◎最終卵子・胚のガラス化終了が、ES投入後20分程度になるようにガラス化保存できる数だけ、一度に卵子・胚のES平衡が可能なのです。

卵子・胚を3個のせる場合は3つの最小量のドロップを作成し、それぞれ1個ずつ卵子もしくは胚を導入します。(各ドロップへの個数を1とします)

良い例



悪い例



融解プロトコール

PART 1

用意するもの

1. Cryotop Safety Kit - Thawing
No.1 融解液 (TS: Thawing Solution)
No.2 希釈液 (DS: Diluent Solution)
No.3 洗浄液 (WS: Washing Solution)
使用前に、No.1 融解液 (TS) は37℃に温めておきます。
35mm ディッシュ (使用前に、No.1 融解液 (TS) は37℃に温めておきます。)
リプロプレート (6穴ディッシュ)
2. 液体窒素容器 (Ref. VT-CLB)
3. パスツールピペット (Ref. MT-P150)
4. 実体顕微鏡 (加温プレートは全工程OFF)
5. カウントアップ機能付タイマー
6. 冷却用液体窒素 (テフロン製メンブランフィルターで濾過滅菌が可能です。)
Filter Teflon Millipore
7. ピンセット
8. 凍結保存用容器、備品類 ケーン、ゴブレット、タンク等

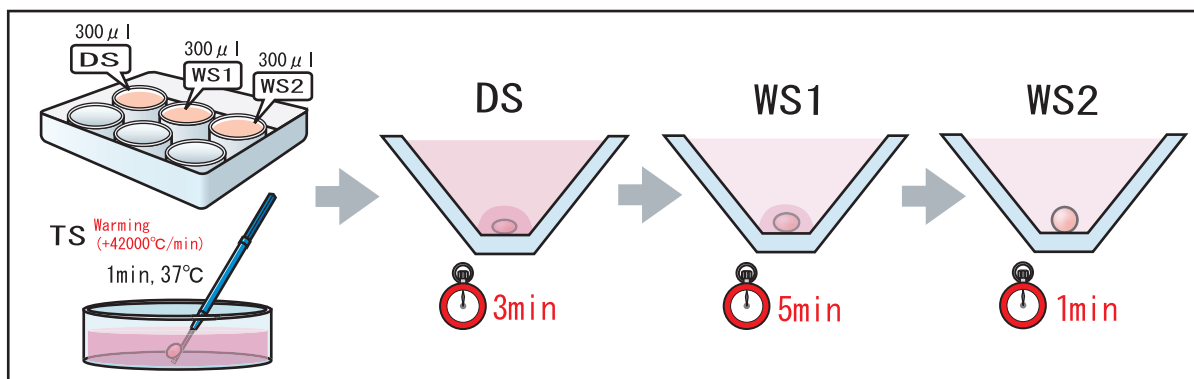


重要

CPA 希釈のコンディションを最適化し、高い生存率を得るために、必ずパスツールピペットの口径 (内径) を卵子及び胚の大きさ (卵子外径=140 μ m、胚外径=140-200 μ m) に合わせてご使用ください。

VITRIFICATION KIT

PART 2 準備



POINT

液体窒素容器は実体顕微鏡のすぐ脇に置いておくことが重要です。

準備 1

融解する検体人数分のTSチューブ（キャップをしたまま）、35mmディッシュ（底面にTSと記載する）を37℃に加熱しておきます。 ※融解液の加熱時間はインキュベーター：1時間30分、ホットバス（40℃）：15分以上。

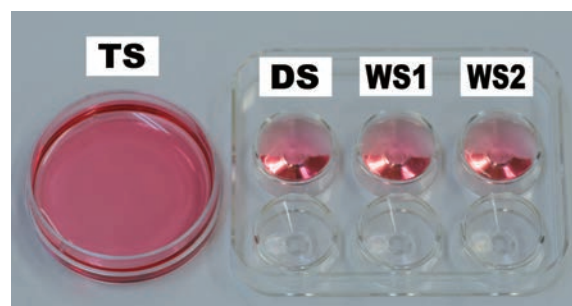
準備 2

Cryotopを保管してあるケーンを取り出し、未使用の液体窒素を満たした容器にすばやく移します。容器内でCryotopをケーンから取り出して、融解の準備をします。

準備 3

リブプロートのウェル1, 2, 3にそれぞれ300 μlずつDSを1ウェル、WSを2ウェル分注し、実体顕微鏡ステージに乗せ、ただちにフタをします。

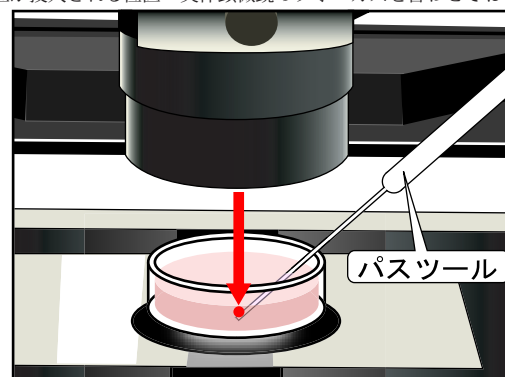
インキュベーターからTSチューブと35mmディッシュを取り出し、実体顕微鏡ステージ上に置きます。TSチューブを2回ゆっくり転倒混和させた後、全量を35mmディッシュにあけます。



卵・胚が投入される位置へ実体顕微鏡のフォーカスを合わせておく

準備 4

予め顕微鏡の倍率を最小にし、パストツールの先端を目印にしてディッシュ内のTS液の中心部の辺りでフォーカスを合わせておきます。



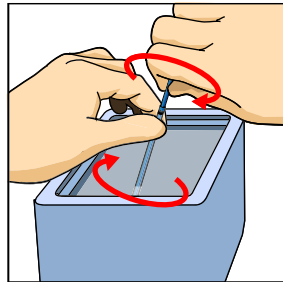
融解プロトコール

PART 3

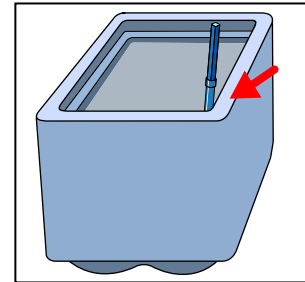
卵子及び胚の融解と希釈

準備 1

液体窒素中でCryotopストローキャップをねじりながらCryotopをストローキャップから引き抜きCryotopのみを顕微鏡側のコーナーに立てかけておきます。



ねじりながら引き抜く



顕微鏡側の角に立てかける

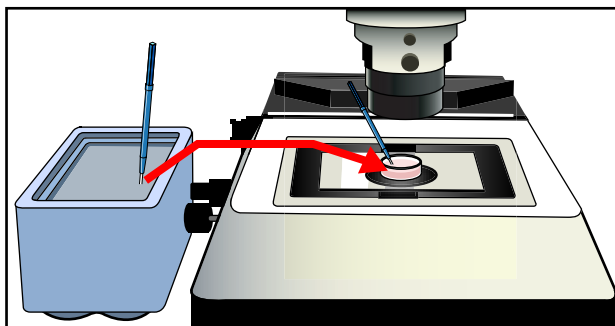
準備 2

Cryotopは液体窒素中に保持したままで、マウスピースを口にくわえパストツールピペットの準備をしておきます。ストップウォッチをスタート（カウントアップ）します。以下の作業は、時間を確認しながらの操作になります。

融解（1 分間）

Cryotopのシート部のみを LN_2 につけた状態から、一気に（1秒以内）に実体顕微鏡ステージ上のディッシュ内TS液中に投入して融解します。マーク部をフォーカス部へあわせ、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分間待ちます。卵子・胚がシート部に付着したままの場合は1分後、パストツールピペットの先で静かに吸い上げます。



Cryotopを直線的に最短距離で、一気に投入する。

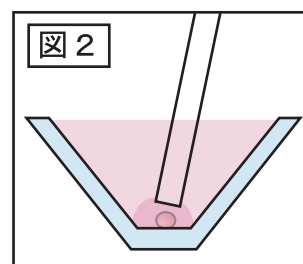
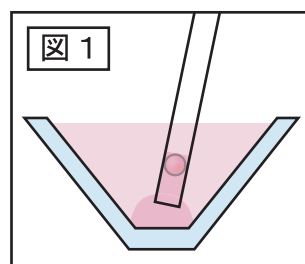
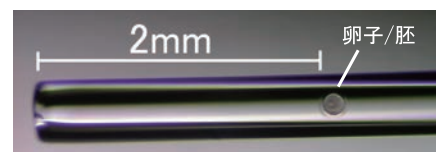


希釈 1（約3分間）

TS投入1分後、卵子・胚をゆっくりとパストツールピペットで吸い上げさらに卵子・胚の先へ2mmのTSを吸い取ります。

DSドロップ底面の中央部にパストツールの先端を導入し、この2mmのTS液の小さな山を作り（図1）、その底に卵子・胚を静かに置きます。（図2）

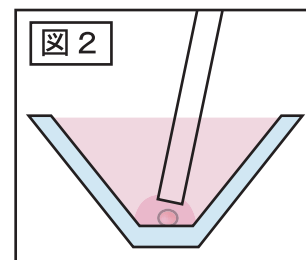
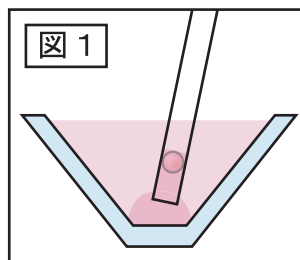
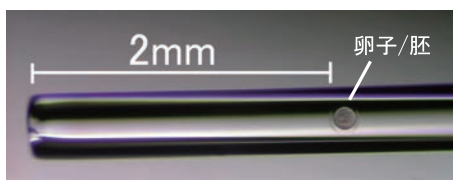
3分間静置します。



VITRIFICATION KIT

希釈 2（5 分間）

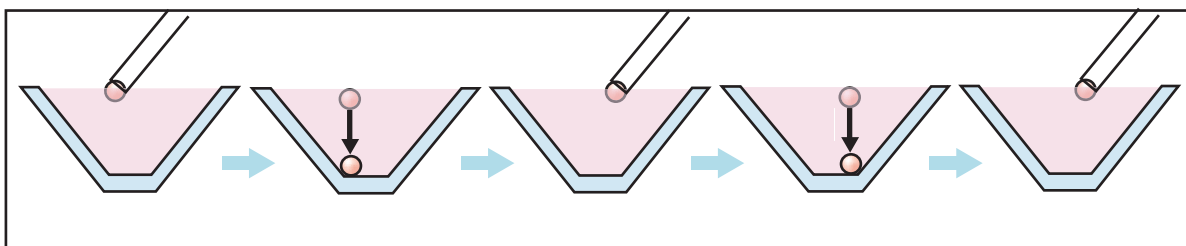
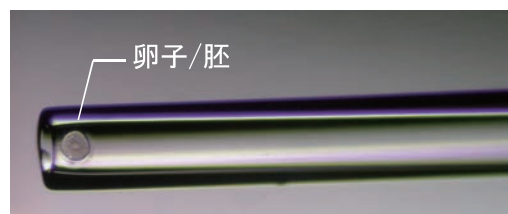
3 分後、同様の要領で卵子・胚をパスツールピペットで DS ドロップから吸い上げ、WS 1 ドロップ底面のパスツールに吸った 2 mm の DS 液の小さな山を作り（図 1）、その底面に置きます。これも卵子・胚が徐々に DS から WS 1 へと馴染むようにするためです。**5 分間静置します。**



洗 浄（1 分間）

5 分後、卵子・胚を最小限の溶液とともにパスツールピペットで取り、WS 2 ドロップ表面中央部へゆっくりとのせします。

卵子・胚はドロップ底面へ沈んだら、同様の方法で洗浄をもう 1 回繰り返します。同一ウェル中で計 2 回洗浄を行うことになります。



POINT

TS→DS、DS→WS 1 の時、卵子・胚を必ずシャーレの底面の中央に前液で作った小さな山の底に置いてください。

卵子・胚の洗浄完了後は、それぞれのステージに合った培養液（各施設でお使いの培養液）を用いて回復培養をおこないます。

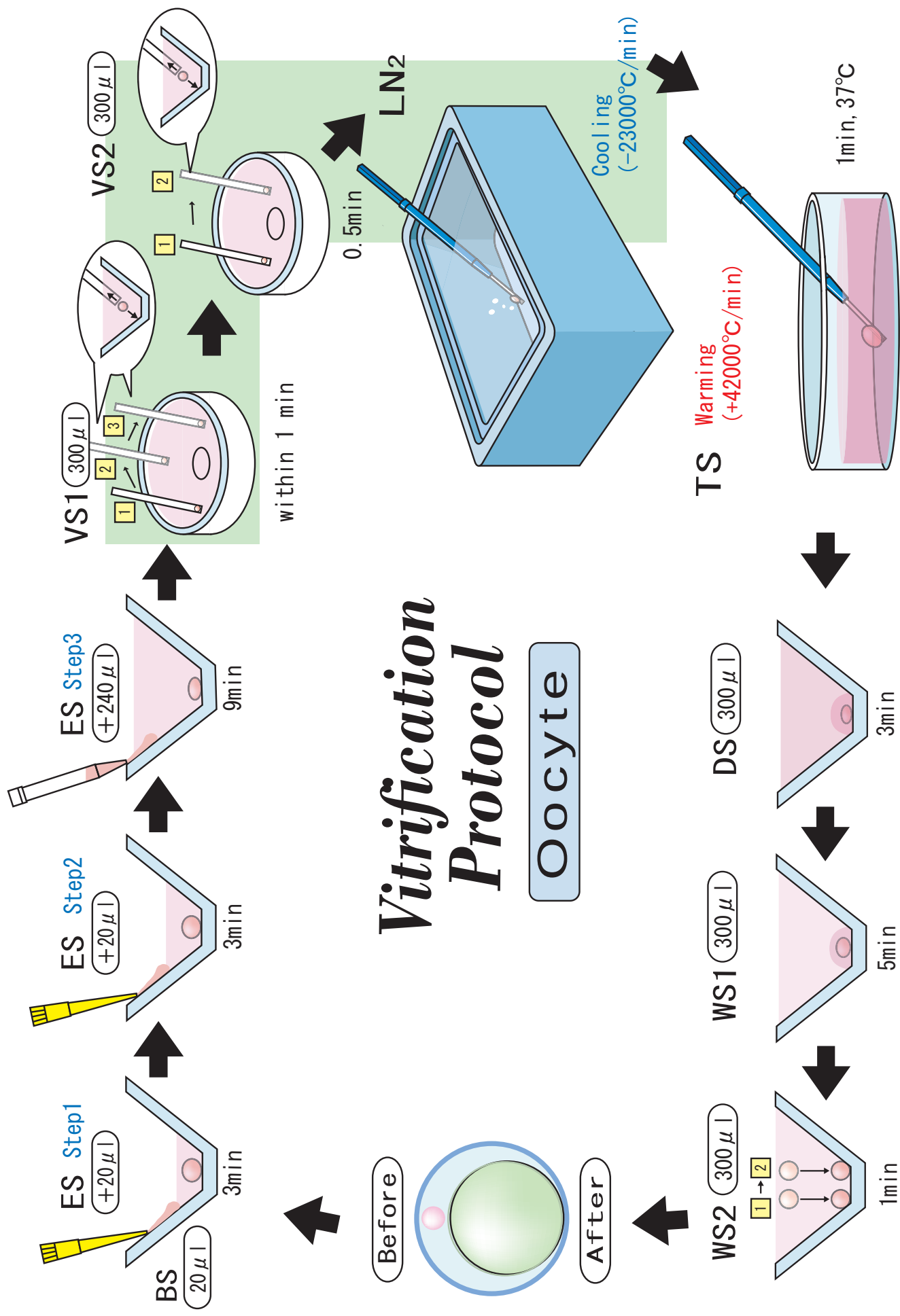
回復培養の最低必要時間

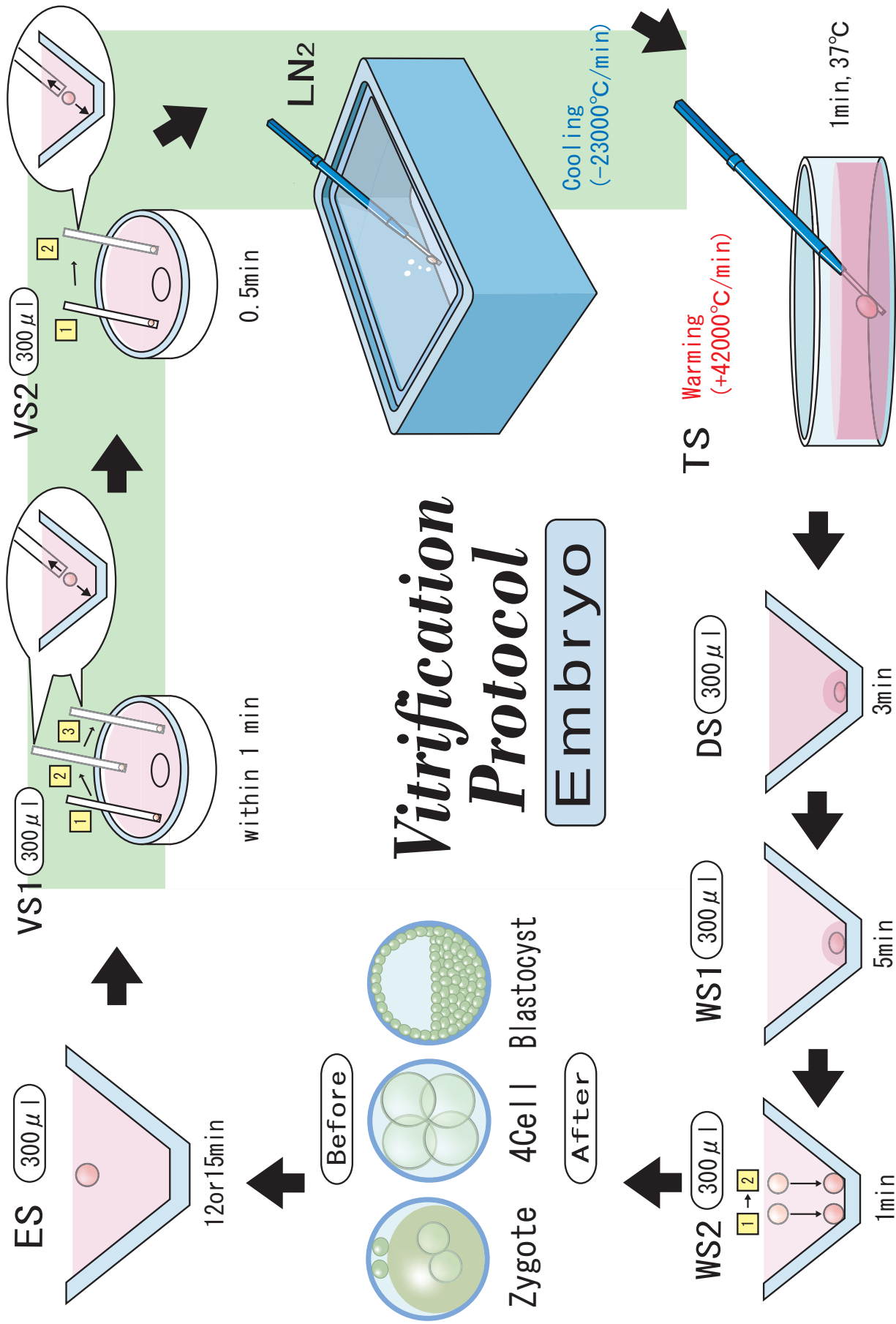
- ・ 卵子：2 時間
- ・ 胚盤胞：3 時間

ご質問またはご意見に関しましては…

FAX：0545-60-5772 もしくは E-MAIL：sales@kitazato-biopharma.com

までお願いします。





KITAZATO®