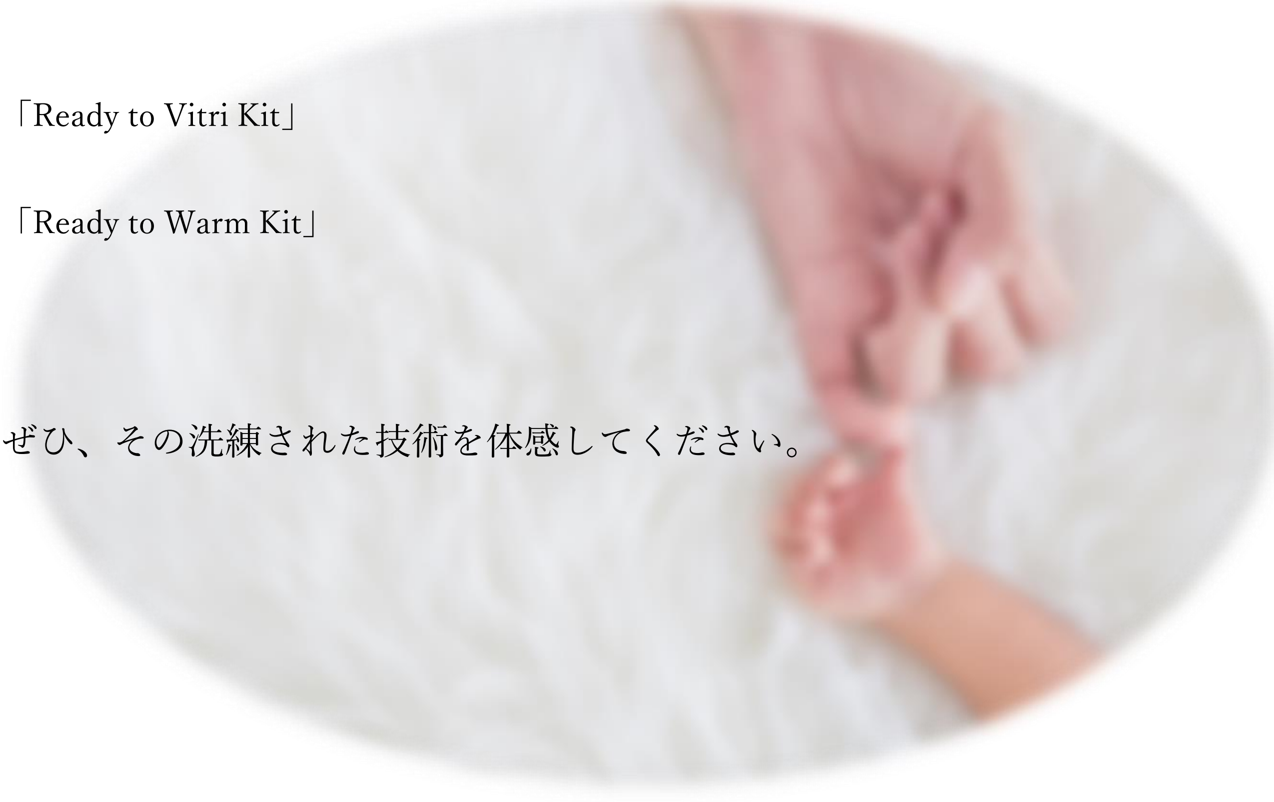
Ready to Use
クライオテック法

REPROLIFE®

日々患者様に寄り添う全ての皆様へ

ノンストレスで患者様と、患者様の大切な命と向き合いたい。
リプロライフはその想いにお応えします。



「Ready to Vitri Kit」

「Ready to Warm Kit」

ぜひ、その洗練された技術を体感してください。

目次

1. **基本操作** ・・・P. 4

実体顕微鏡の倍率 ・・・P. 4

ガラスピペット内に吸引する胚の位置 ・・・P. 4

2. **凍結プロトコル** ・・・P. 5

準備するもの ・・・P. 5

凍結前の準備 ・・・P. 5

【STEP 1】ES 平衡 ・・・P. 6

【STEP 2】VS 平衡 ・・・P. 9

【STEP 3】VS 収縮の確認 ・・・P. 11

【STEP 3】ローディング ・・・P. 12

【STEP 3】超急速冷却 ・・・P. 12

3. **融解プロトコル** ・・・P. 14

準備するもの ・・・P. 14

融解前の準備 ・・・P. 14

【STEP 4】TS による加温 ・・・P. 15

【STEP 5】DS による希釈 ・・・P. 17

【STEP 5】WS1 による希釈 ・・・P. 18

【STEP 6】WS2 による洗浄 ・・・P. 19

1. 基本操作

【実体顕微鏡の倍率】

クライオテック法で使用する実体顕微鏡の倍率は 2 種類のみである。

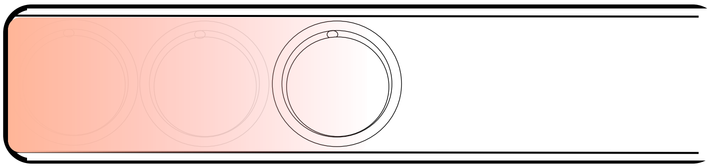
弱拡: 卵子/胚を操作、移動する際　（×12-15）
-プレートの円形ウェルが視野内に最大限に収まる倍率。

強拡: 卵子/胚を観察する際　（×45-55）
-お手持ちの顕微鏡の最大倍率。

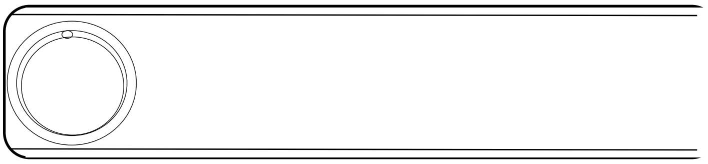
【ガラスピペット内に吸引する胚の位置】

クライオテック法で必要な胚操作は下記 3 種類のみである。

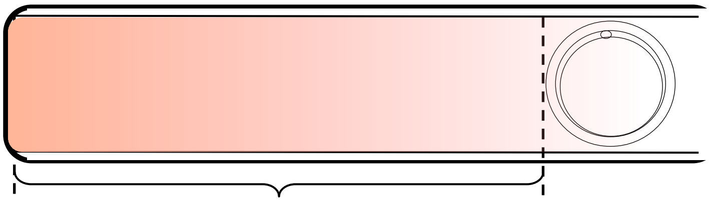
①卵子/胚のあとに卵子/胚 2 個分程度の微量なメディウムを吸引する。（基本位置）



②ピペット先端に卵子/胚を保持する。（ガラス化平衡時）

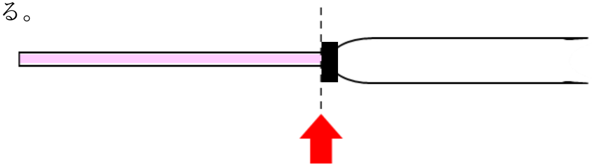


③卵子/胚のあとに 3mm 分のメディウムを吸引する。（希釈時）



要 Check!

卵子/胚の吸引前に、ガラスピペットに予め毛細管現象で吸い上げられる分のメディウム（1 気圧分）を吸引しておくことで、卵子/胚の動きが安定し、より簡便に操作することができる。必要であれば、このメディウムの基本ラインをマジックでピペット外壁にマークして使用する。



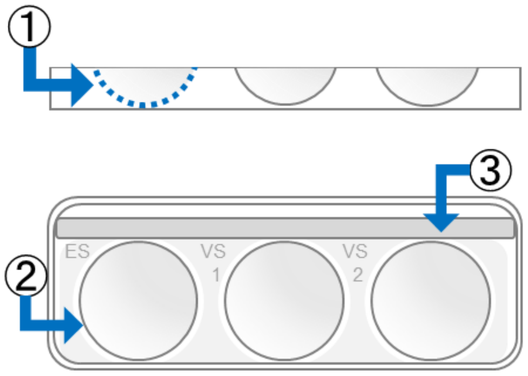
2. 凍結プロトコル

ガラス化凍結保存とは

ガラス化凍結保存によって卵子/胚の質が向上することはないが、低下することもない。
卵子/胚の質に関わらず、凍結前と同じ状態で保存可能な技術である。

【準備するもの】

・Ready to Vitri Kit
・凍結容器(クライオテック)
・実体顕微鏡（加温プレートの電源は切っておく）
・タイマー（カウントアップ機能があるもの）
・ピンセット
・ハサミ
・パスツールピペット（マウスピース使用の場合）
・クーリングラック



RtUガラス化プレートの特徴

RtUクライオテック法専用にデザインされた凍結プレートには、①半球状のウェル、②液を排出するためのスペース、③クライオテックを静置できる溝がある。ウェルの底が半球状になっていることで、顕微鏡下でも影による死角ができにくいため、卵子/胚を見失いにくい。また、球の特徴により顕微鏡で上から覗いた場合にウェルの中央がちょうど一番深い点となり、ウェルの底に卵子/胚を置く操作の際も容易に場所を定められる。

【凍結前の準備】

1. 作業を実施する環境を室温（26±1℃: 25-27℃）に設定しておく。
2. Ready to Vitri Kitは少なくとも1時間前に室温（26±1℃: 25-27℃）にしておく。
   要 Check！　使用前に必ずプレートに指で触れて目視し、色や温度に異常がないか確認する。
3. 最適な内径のパスツールピペットを準備する。
   - 卵子および分割期胚は内径<u>140-150μm</u>
   - 胚盤胞期胚はサイズに合わせ、内径<u>160-220μm</u>

【STEP 1】

ES 平衡（7-13 分間：室温下）

ES 平衡の目的は、細胞内に凍結保護物質（CPA）を浸透させることであり、細胞の体積の完全な回復を以てこれが完了したと判断する。

フィルムのめくり方一例

安定した状態でフィルムをめくるため、片方の手でしっかりとプレート本体を固定する。そのときにプレートの内側に手が触れないように気を付ける。途中でプレートやフィルムを持ち直してもよい。最後は少しずつ丁寧にはがす。

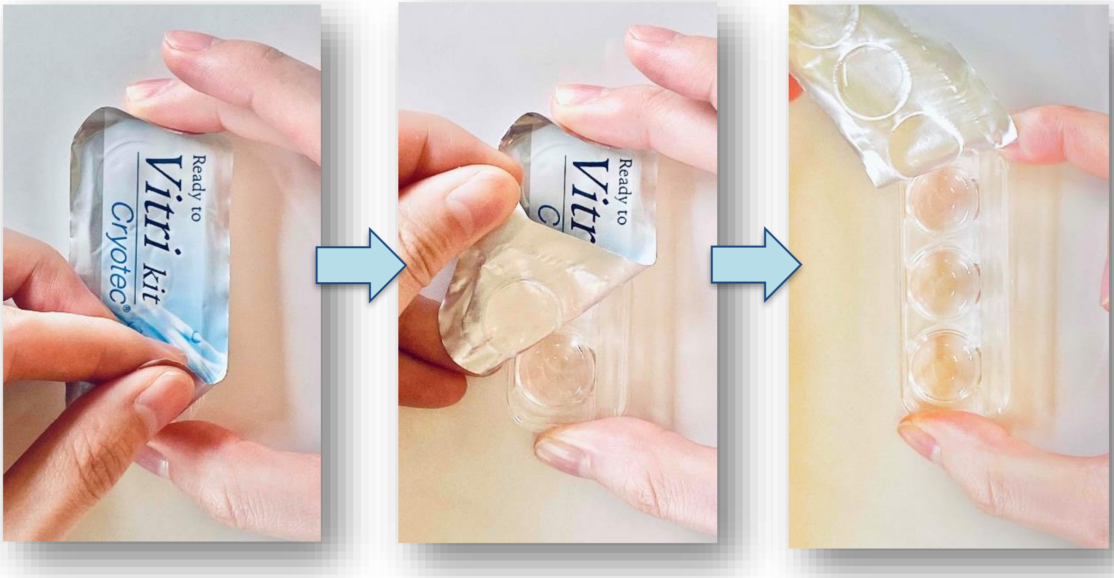
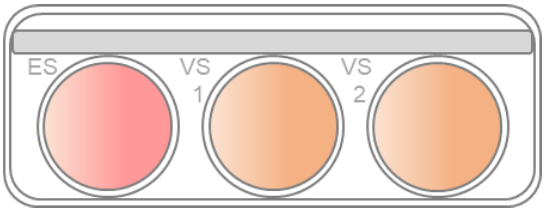
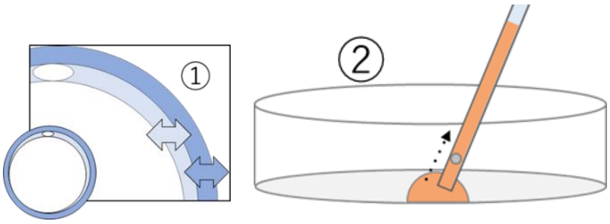
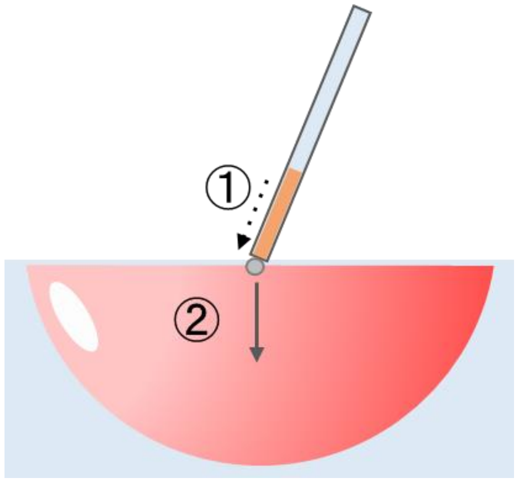


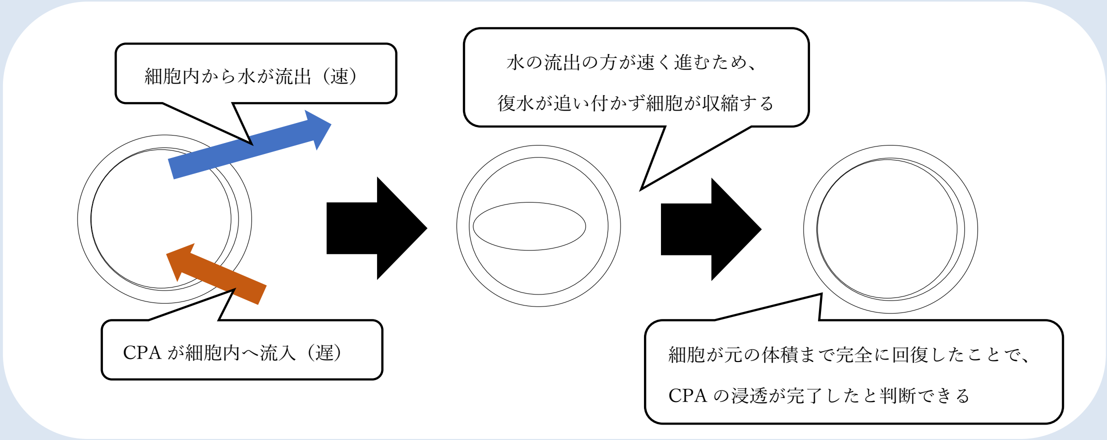
	図	手順
1		1. 室温に戻したガラス化プレート本体のフィルムを丁寧にはがす。
2	 培養ディッシュ	1. 卵子/胚の形態をよく確認し、ES で完全回復した形態を知るため囲卵腔と透明帯の幅の比を記録しておく。 2. パスツールピペットに卵子/胚を吸引後、卵子/胚 2 つ分の培養液と共に吸引する(②)。

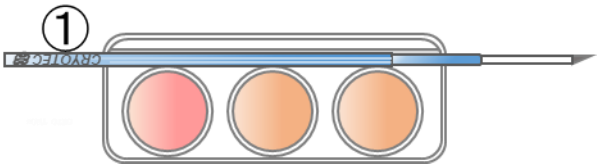
3	 ES	1. ES の表面中央部に STEP1-2 で吸引した培養液とともに卵子/胚を置く(①)。 2. タイマーでカウントを始める。 3. 卵子/胚は収縮しながらゆっくりと沈んでいく(②)。卵子/胚は 90 秒程度で最大限の収縮を確認する事が出来る。 4. 収縮から卵子/胚の体積が完全に回復するのを待つ。あるいは最大浸漬時間（卵子/胚盤胞：13 分、初期胚：10 分）経過後 VS へ移動する。

要 Check！　卵子/胚を ES に入れると、ただちに体積の収縮が始まる。

細胞が収縮し、回復するメカニズム

細胞内は培養液(浸透圧 300)、細胞外は ES(浸透圧 2400)であるので、浸透圧差によって細胞内の水が細胞外へ、CPA は細胞膜を透過するため細胞内へ流入する。細胞内外の浸透圧が均等になろうとしてこれらの反応は同時に生じるが、CPA が細胞内に入るよりも水が細胞外へ流出する速度の方が高いため、卵子/胚は一旦収縮し、そして CPA の流入によって再び元の体積にまで回復する。

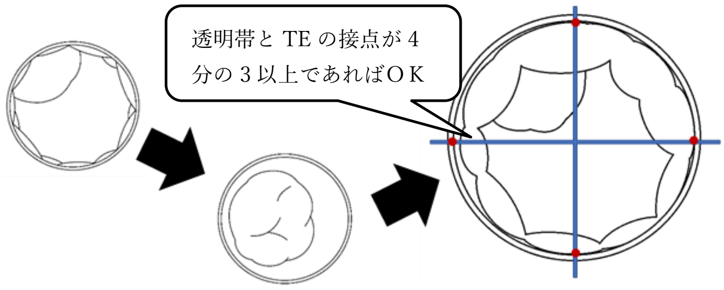


4		1. 回復待ち時間中にクライオテックをパッケージから取り出し、ガラス化プレートの溝にクライオテックのロゴを上面にしてセットする(①)。 ※クライオテックに情報を記載する場合、持ち手裏面（Logo 面とは反対の面）に卵子/胚の情報を記入 2. 冷却用液体窒素をクーリングラックに準備する。 3. 収縮した卵子/胚の体積が完全に回復した時点で ES 平衡完了とする。

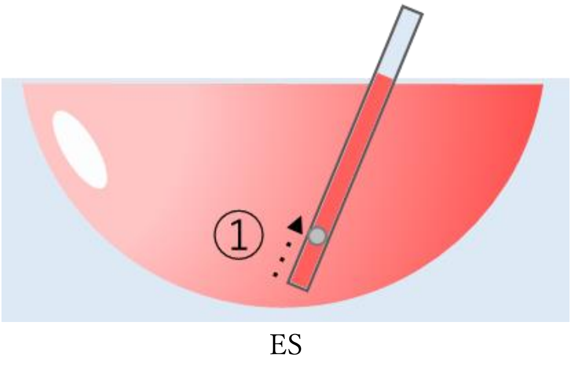
要 Check！：付属の蓋を使用する場合、クライオテックをセットしたままかぶせる。
要 Check！：折れたり破損したクライオテックは使用しないように事前にチェックする。

平衡完了の判断

体積の回復が確認できた時点、もしくは完全回復の判定に自信が持てない場合は、ES 平衡の完了時間（最大浸漬時間）を経過した時点で ES を終了し次のステップへ移る。これは、最大浸漬時間経過していれば十分平衡が完了したと判断可能なためである。



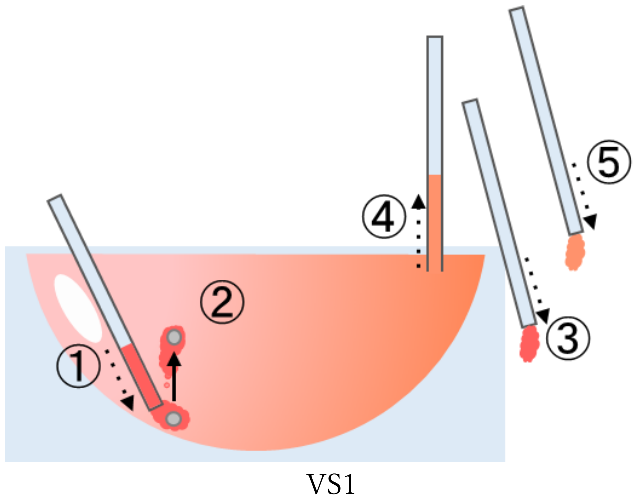
胚盤胞の体積が完全に回復したかどうかは、胞胚腔があるためにやや困難である。そのため胚盤胞については、TE と透明帯の接し方を上図のように観察し、その回復を判別する。胚盤胞を上から見て十字を重ね、囲卵腔と接する 4 点のうち 3 点以上において TE と透明帯が隙間なく接していれば回復したと判断する。

5		1. 卵子をパスツールピペットに吸引後、少量（卵子/胚 2 個分）の ES を吸引する(①)。

【STEP 2】

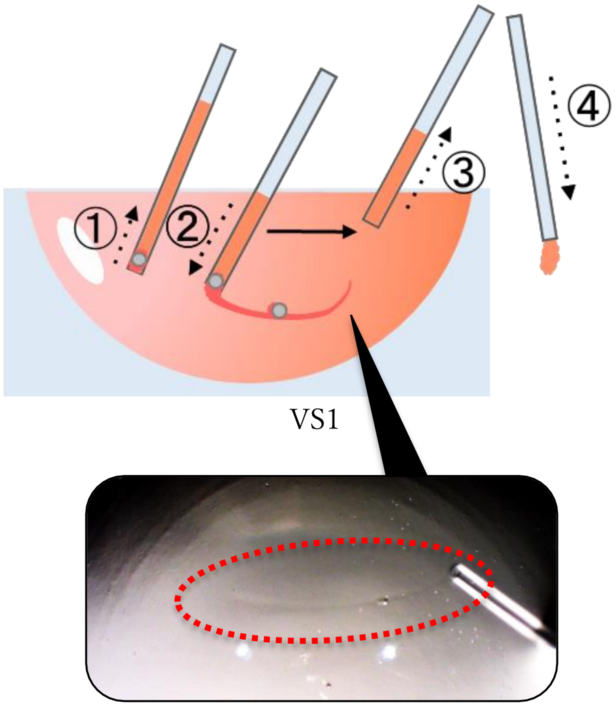
VS 平衡: VS1 (30-60 秒間)

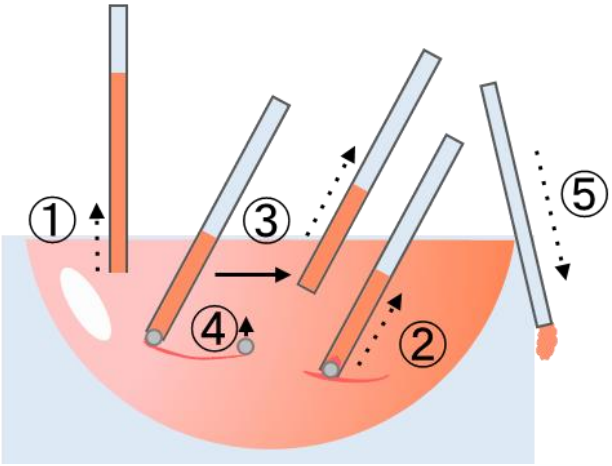
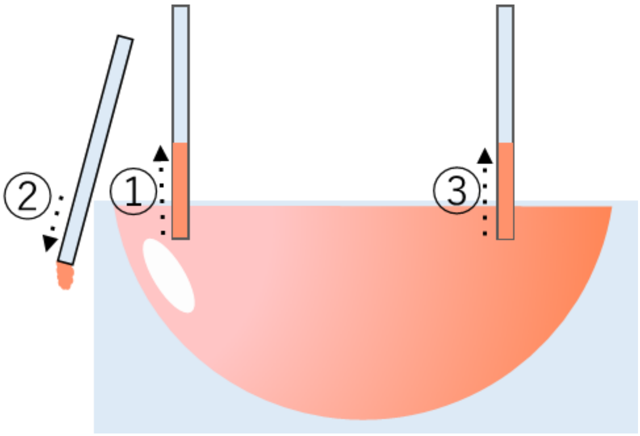
VS1 の目的は、細胞外の ES をすべて VS に置換することであり、縦横に移動させ、細胞と VS1 の重量の一致によってこれが完了したと判断する。

	図	手順
1		1. **VS1** ウェル底に卵子/胚を放出する(①)。卵子/胚が放出された時点で、ピペットをゆっくり抜く。 2. 卵子/胚は ES に囲まれているので ES とともにやや浮上する(②)。 3. 少しでも浮上を確認できたら、共洗いへと進む。 4. ピペット内部に残った ES を全量ウェル外液捨て溝に排出する(③)。 5. ウェルの端から新鮮な VS1 を吸引し(④)、それを速やかに排出する(⑤)。

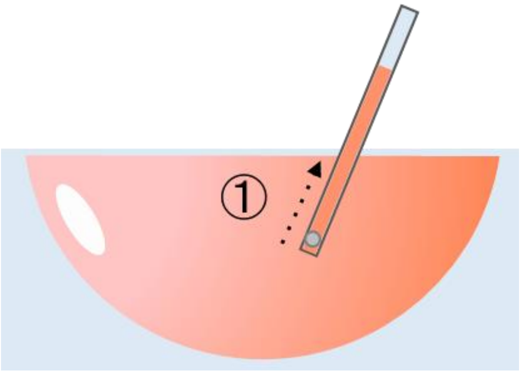
要 Check！

ES 液と VS 液の比重差を少なくしたため、胚が表面にすぐ浮上することはなく、見失いにくい。

2		1. ウェルの端から新鮮な VS1 を吸引後、ピペットの最先端に卵子/胚を吸引する(①)。 2. 残っている ES を除去していくため、ピペットを VS1 ウェル中央部まで入れ、ES を出しながら平行に移動し、卵子/胚を放出する。放出後も ES から卵子/胚を切り離すイメージで、ES を細く長く引くことで早い液置換を実現させることができる(②③、下図)。 3. ピペットの共洗い：ピペット内部に残っている VS1 を全量排出する(④)。

3	VS1	1. より脱水を促すためもう一度同じ工程を行う。ウェルの端から新鮮な VS1 を吸引後(①)、ピペットの最先端に卵子/胚を吸引する(②)。 2. 2-2 同様、残っている ES を完全に除去していくため、先ほどとは場所を変えて、ピペットを VS1 ウェル中央部まで入れ、ES を出しながら平行に移動し、移動途中で卵子/胚を放出する(③)。 3. 卵子/胚を最強拡で観察し、収縮および、同一フォーカス内に留まることをもって ES から VS への液置換を完了とする (④)。 4. ピペットの共洗い：ピペット内部に残っている VS1 を全量排出する(⑤)。
4	VS2	1. VS2 ウェルの端から新鮮な VS2 を吸引・排出する(①・②)。 2. 再度、VS2 ウェルの端から新鮮な VS2 を吸引する(③)。

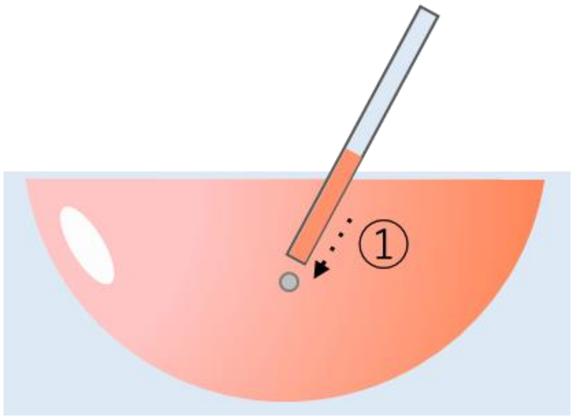
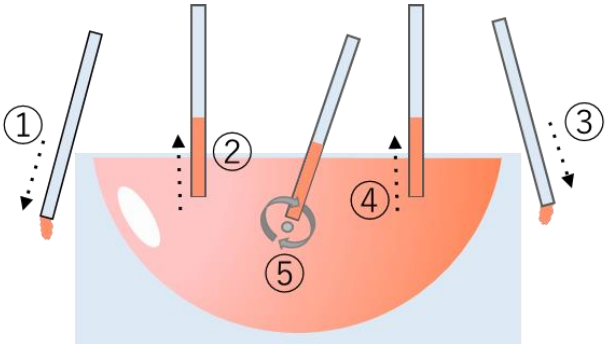
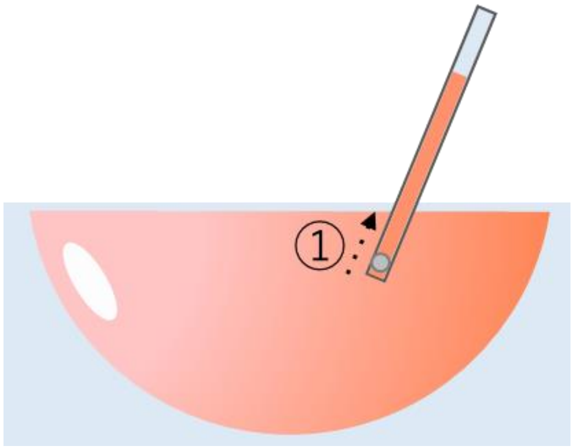
要 Check！
VS1 中の卵子/胚を吸引する前に新鮮な VS2 を吸引する目的は、VS1 を VS2 に持ち込むことを防ぐためである。

4	VS1	1. ピペットの最先端に VS1 の卵子/胚を吸引する(①)。

【STEP 3】

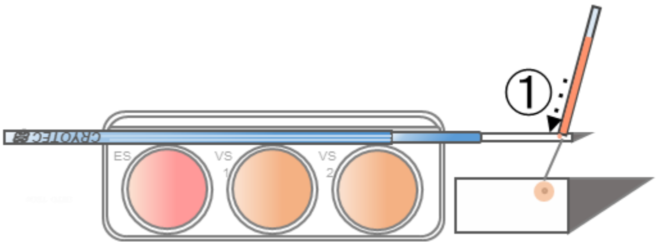
VS 収縮の確認：VS2(10-20 秒間)

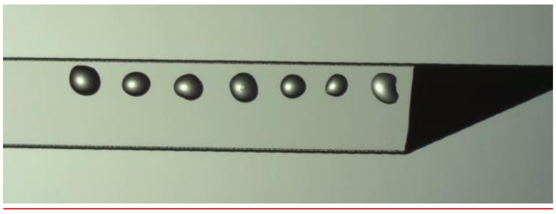
VS2 の目的は、ES が VS に完全に置換されたことを確認することであり、それは細胞が収縮していることで判断する。

	図	手順
1	 VS2	1. **VS2** の中深部に卵子/胚を放出する(①)。
2	 VS2	1. ピペットの共洗い: ピペット内部に残っている VS2 を全量液捨て溝へ排出し(①)、ウェルの端から新鮮な VS2 を吸引・排出する(②・③)。 2. 再び新鮮な VS2 を吸引する(④)。 3. 卵子/胚周辺を 5 回かき混ぜることにより、液をなじませ、卵子/胚を多方向から観察し、完全な収縮を確認する(⑤)。
3	 VS2	1. ピペットの最先端に卵子/胚を吸引する(①)。

ローディング

4





1. クライオテックのシート先端のマーカー(黒三角)の近くに微小量の VS2 ドロップとともに卵子/胚をのせる (①)。

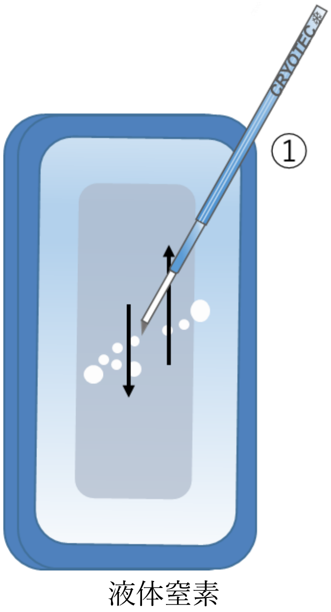
要 Check！　1 ドロップ当り 1 卵子/胚。ドロップの最小化は行わない。

ドロップの最小化は行わない

従来法では冷却速度を高めるためにドロップの最小化を行っていたが、本法の凍結試薬は従来法に比してガラス化能が高いため、ドロップを最小化する必要がない。ドロップを最小化してしまうと、卵子/胚に表面張力による圧力がかかりダメージとなる上、シート上に卵子/胚が張り付き、融解時に取れにくくなる。TS での所要時間が長くなり、これもまた卵子/胚のダメージを招く。本法ではドロップの最小化は行わず、ドロップが大きくなりすぎてしまったり、ひとつのドロップに卵子/胚が 2 個以上入ってしまったりした場合は、一度卵子/胚をピペットに吸いなおしてシートの違う場所にドロップを作成する。

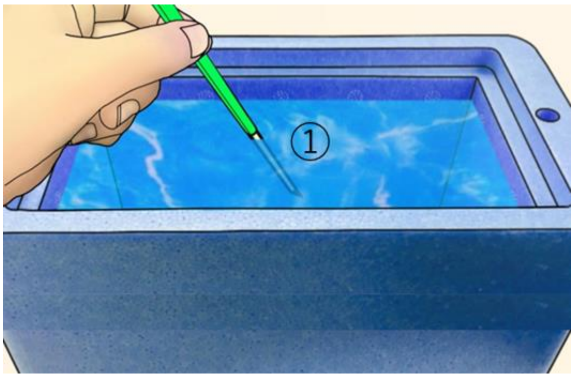
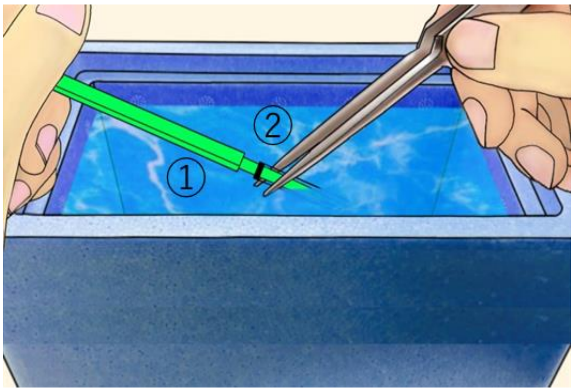
超急速冷却

5

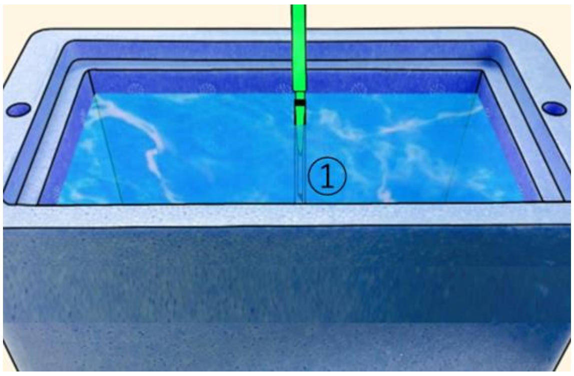
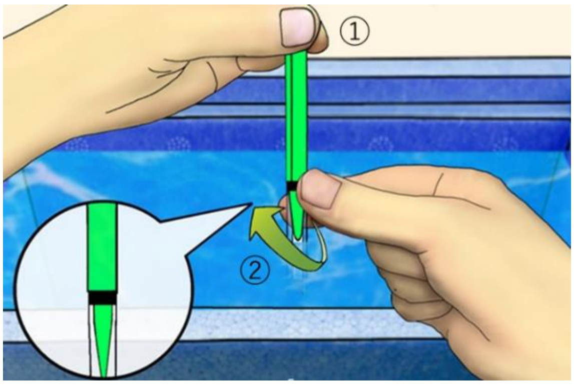


1. シート上のドロップ内に卵子/胚を確認した後、直ちにクライオテックを液体窒素中に投入し、冷却速度を上げるために気泡が発生しなくなるまで振る(超急速冷却)(①)。

カバーキャップの装着

	図	手順
1		1. シート先端は液体窒素内に保持する (①)。
2		1. 液体窒素にカバーキャップを投入し、泡が消失した後、液体窒素中(液面下すれすれ)でクライオテックにカバーキャップをする。 2. シート先端は液体窒素中に保持したまま(①)、ピンセットでカバーキャップの上部（黒いマーカー部分）付近 (②)を掴みキャップする。

要 Check！　カバーキャップの真ん中はピンセットで掴まない。ピンセットでカバーキャップを強く掴んで閉めようとするとカバーキャップが破損する恐れがあるので注意する。また、折れたり、破損したカバーキャップおよびクライオテックは使用しないようにする。

3		1. ピンセットでカバーキャップ後、クライオテックを垂直に立てる(①).
4		1. シート先端は液体窒素内に保持したまま(①)、キャップのクライオテック側部分を空中に出し、指でキャップをしっかりと持ち上げて締める(②)。

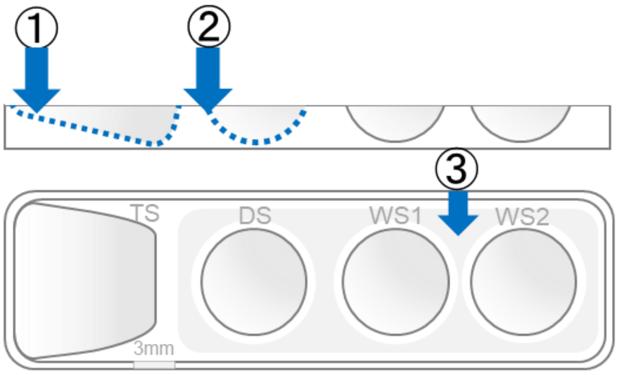
3. 融解プロトコル

氷晶形成の危険がある温度領域

凍結-融解で最も氷晶形成が起きやすいのは、融解時である。どれほど冷却速度を上げて凍結しても、加温速度が低ければ氷晶を形成させる。氷晶形成が生じる-80℃から-20℃をいかに素早く通過するかが重要となる。

【準備するもの】

・Ready to Warm Kit
・実体顕微鏡（加温プレートの電源は切っておく）
・ストップウォッチ(カウントアップ機能があるもの)
・ピンセット
・パスツールピペット(マウスピース使用の場合)
・クーリングラック



RtU融解プレートの特徴

RtUクライオテック法専用にデザインされたRtU融解プレートには、RtU凍結プレート同様、①TS専用の傾斜のついた台形のウェル、RtU凍結プレート同様の②半球状のウェル、③液を排出するためのスペースがある。TSウェルの傾斜は、クライオテックを安定して挿入できるよう設計されている。また、TS部分の淵を厚くしたため、温度低下がやや緩やかに起こるよう工夫されている。半球状のウェルは、希釈時にメディウムの液溜まりを作りやすく、最も緩やかな浸透圧の置き換わりを可能としている。

【融解前の準備】

1. 融解開始の 2 時間以上前に融解プレートを 37℃のインキュベーター内で温めておく(オーバーナイト加温可)。
2. クーリングラック(液体窒素容器)に液体窒素を準備する。
3. 液体窒素タンクよりクライオテックを取り出し、クーリングラックの液体窒素中でカバーキャップを外し、実施者に一番近い内壁に立てかけておく。

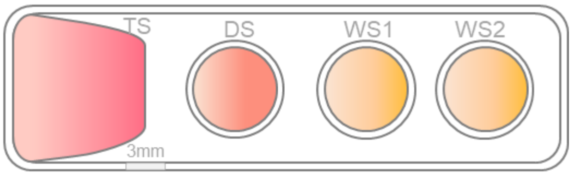
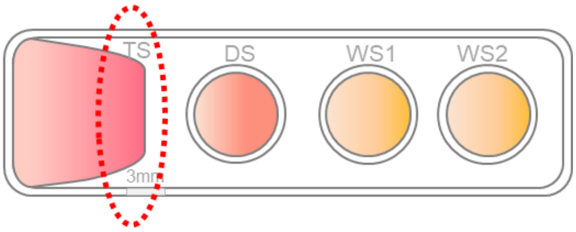
要 Check！　カバーキャップを外す際、ピンセットでカバーキャップを強く掴んで外そうとするとカバーキャップおよびクライオテックシートが破損する恐れがあるので注意する。

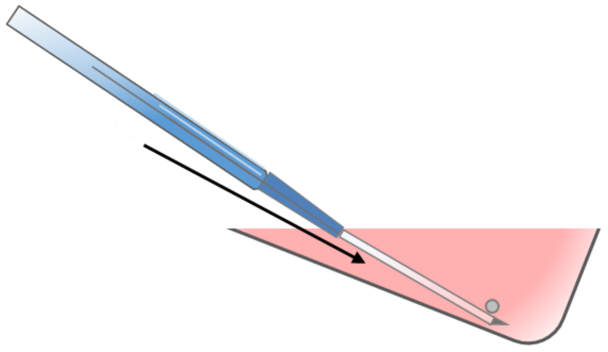
【STEP 4】

TS による加温（1 分間）

フィルムのめくり方一例

まず TS ウェルの空気を逃がすためフィルムを少しめくる。次に安定した状態でフィルムをめくるため、片方の手でしっかりとプレート本体を固定する。そのときにプレートの内側に手が触れないように気を付ける。途中でプレートを持ち直し、最後は少しずつ丁寧にはがす。

	図	手順
1		1. 予め 37°Cに加温された融解プレート本体をインキュベーターから取り出し、フィルムを丁寧にはがす。
2		1. 顕微鏡のフォーカスを TS ウェルの底（特にクライオテック挿入時にシート部分が来る位置：左図点線部）に合わせる。

3	 TS	1. 直ちに液体窒素からクライオテックを素早くTS 中に投入（1 秒間以内）する(①)。 2. タイマーをスタートし、1 分間静止する。 3. 卵子/胚は加温中、緩やかにシートに張り付いている(そのまま 1 分間待つ)。 ※自然にクライオテックシートから離れ浮かび始めた場合、表面に胚が到達しないよう、最深部へ移動させる。

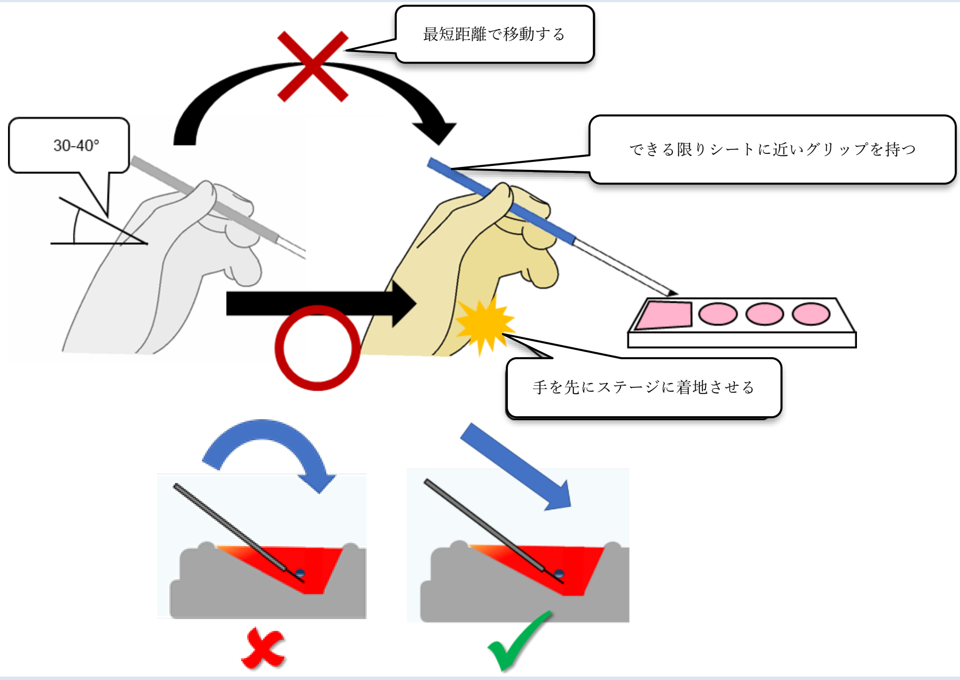
要 Check！　T S では必ず 1 分間静止！

TS にクライオテックを浸けたら、1 分間は必ず静止する。クライオテックを動かしてしまうと、冷えたクライオテックの影響で TS 全体の温度が下がってしまう。仮にクライオテック挿入時シート上に卵子/胚を見つけられなくとも、焦らずそのまま待機する。

クライオテックを安全に TS へ浸けるコツ

ピペットを右手に準備し、クライオテックのできる限りシートに近いグリップ部分を持ち、ただちに TS ウェルの斜面に沿って 30～40°の角度で挿入する。この時手は無意識に弧を描こうとするが、最短距離を保つために真っすぐ移動させ、先に手の側面をステージに着地させることで、安定してクライオテックを挿入することができる。手の着地までは素早く、そこから TS への挿入までは静かに丁寧に行う。

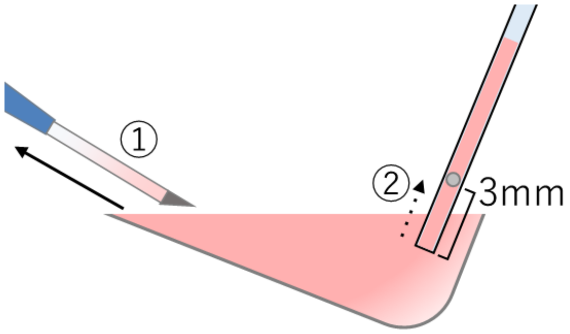
TS ウェルの表面に対して垂直に着水すると、クライオテックシート表面部分が液体と接する面積が非常に大きくなり、TS 中に気泡を形成する要因となる空気を持ち込んでしまう。シート上に気泡が発生すると卵子/胚を紛失しやすくなる恐れがあるため、LN_2 からはできるだけ直角に、TS へはウェルのカーブに沿って移動させることで気泡の発生を最小限に抑えることができる。



CRYOTEC®

【STEP 5】

DS による希釈（2 分間）

	図	手順
1	 TS	1. クライオテックを 1 分間静置後、ゆっくりとクライオテックを TS ウェルから取り出す(①)。 2. TS 中で卵子/胚を吸引し、続いてピペット内に 3mm の TS を 3 秒程度かけてゆっくりと吸引する(②)。

要 Check！

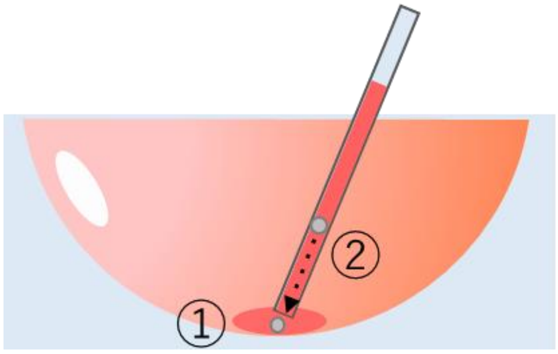
1 分間静置後、クライオテックシートから卵子/胚が離れない場合は、パスツールピペットにて卵子/胚の下から溶液を吹きかけてシートから浮かせる。この作業では、卵子/胚に触れることがないように気を付ける。

要 Check！　卵子/胚が見えなくなってしまったら

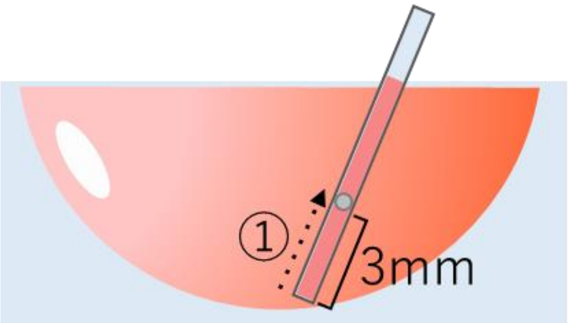
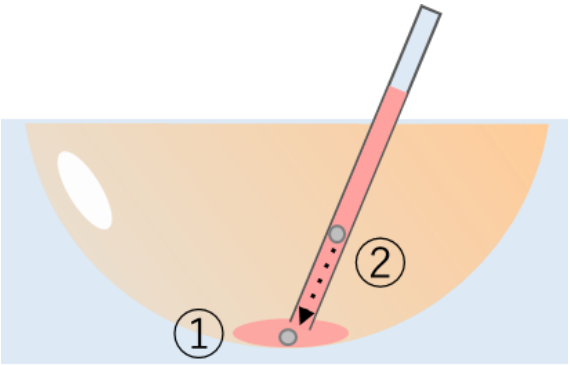
凍結時クライオテックに乗せたのであれば **TS ウェル内に卵子/胚は必ず存在する**。TS は非常に毒性の低い溶液の為、焦らず探すことが可能である。

要 Check！

3mm は融解プレート本体(TS ウェル右下)と蓋にある 3mm インジケーターで測定することが可能である。

2	 DS	1. ピペット先端を DS の底中心に挿入し、TS を 3 秒間かけてゆっくりと排出して底に TS 層の液だまりをつくる(①)。 2. 次いで卵子/胚を TS 層の底に静かに置く(②)。 3. タイマーをスタート後、顕微鏡のライトを消し、2 分間静置する。

WS1 による希釈（3 分間）

	図	手順
1	 DS	1. DS 中で卵子/胚を吸引し、続いてピペット内に 3mm の DS を 3 秒間かけてゆっくりと吸引する(①)。
2	 WS1	1. ピペット先端を WS 1 の底中心に挿入し、DS を 3 秒間かけてゆっくりと排出して底に DS 層の液だまりをつくる(①)。 2. 次いで卵子/胚を DS 層の底に静かに置く(②) 3. タイマーをスタート後、高倍率で卵子/胚の形態を注意深く観察し、顕微鏡のライトを消して、3 分間静置する。 4. 3 分後、記憶した卵子/胚の形態と比較する。収縮した卵子/胚の体積が完全回復あるいは回復最中であることが確認できたら生存と判定する。

要 Check！

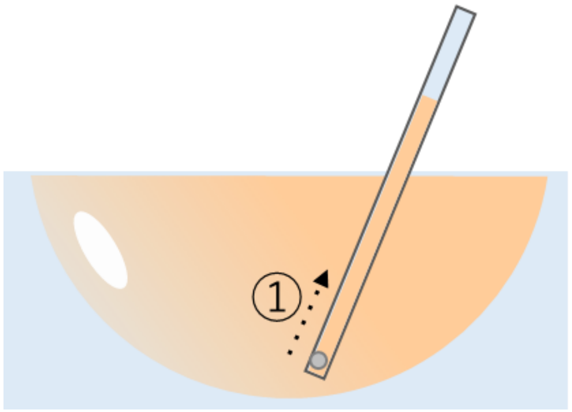
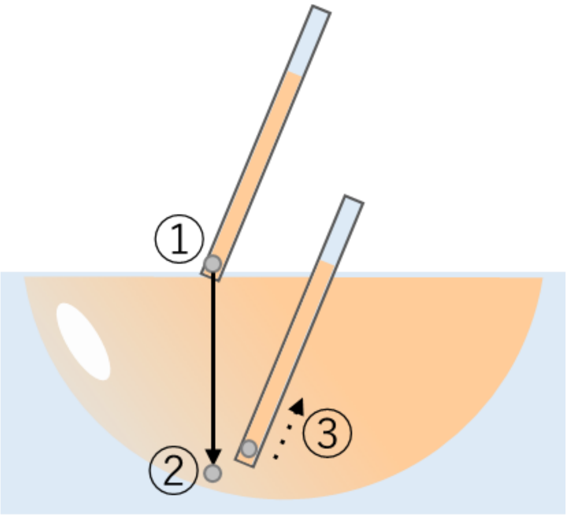
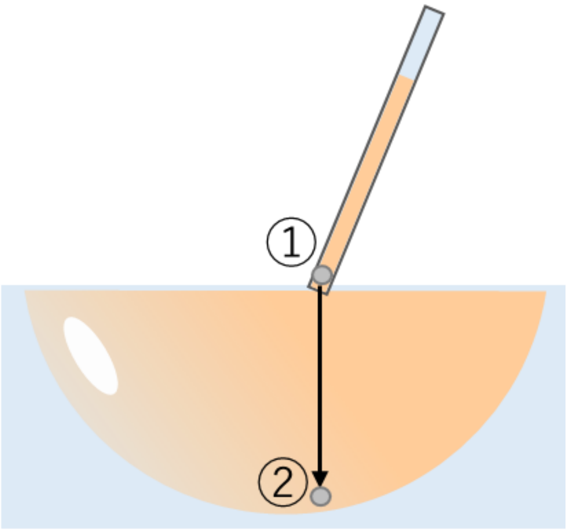
凍結-融解で卵子/胚にダメージがあったかどうかは WS 1 のステップで確認する事が重要である。

生存している卵子/胚は正常な膜反応が起こり、体積は回復する。WS1 におけるこの反応は卵子/胚が DS(900)から WS(300)に入ることによって、等張になろうと復水が起きるからである。つまり、良好な卵子/胚は体積が完全に回復するが、不良な卵子ほど体積の回復に時間がかかる。さらに、細胞膜がダメージを受けた卵子/胚の場合あるいは死滅した卵子の場合は、正常な膜反応が起こらず、卵子/胚の体積は「反応しない」或いは「何も変わらない」である。

胚盤胞の場合、再び胞胚腔ができ始め開いていくか、胞胚腔が再形成されれば「生存」となる。一般的にヒト胚は 30%以上の生存割球が認められた場合、将来子供になれる可能性がある。

-2 細胞期胚の場合、1 割球以上
-4 細胞期胚の場合、2 割球以上
-8 細胞期胚の場合、3 割球以上

WS2 による洗浄（30 秒間）

	図	手順
1	 WS1	1．ピペット最先端に卵子/胚を吸引する(①)。
2	 WS2	1．WS2 ウェルの左側表面に卵子/胚を置く(①)。 2．卵子/胚は自然にゆっくりとウェルの底に沈んでいく(②)。 3．卵子/胚がウェル底に到達後、再びピペット最先端に卵子/胚を吸引する(③)。
3	 WS2	1．WS2 ウェルの右側表面に卵子/胚を置く(①)。 2．再び卵子/胚は自然にゆっくりとウェルの底に沈んでいく(②)。 3．卵子/胚がウェル底に到達後、洗浄完了とする。 4．顕微授精または胚移植まで卵子/胚を培養液ドロップに戻し回復培養を行う。

要 Check！　ICSI には 2 時間培養、胚盤胞移植には 1 時間以上の培養を推奨する。