

各種溶液の調製

< 卵子吸引～成熟培養 >

生理食塩水 (1ℓ): 卵巣運搬液

塩化ナトリウム	NaCl	9.0 g
---------	------	-------

NaCl (9.0 g) を超純水で攪拌溶解後、1ℓにメスアップする。

ガラス瓶に移し、キャップを緩く閉め、キャップから瓶の上部をアルミホイルで被う。

オートクレーブ (121℃、15 分間) で滅菌する。

1%CS 加 乳酸加リンゲル液 (1ℓ): 採取卵子検索用

乳酸加リンゲル液	1000	ml
CS	10 ~ 10.1	ml
抗生物質 PC-SM (29 頁参照)	1000	μl

市販の乳酸加リンゲル液 1000ml に、CS を 10 ~ 10.1ml 入れ、抗生物質を 1000μl 添加して転倒混和する。

保存する場合は、冷蔵保存する (約 1 週間)。

10U/ml ヘパリン加 1%CS-乳酸加リンゲル液 (100ml): OPU 卵子吸引液

1%CS 加 乳酸加リンゲル液	100	ml
ノボヘパリン	1	ml

- ・上記 1%CS 加 乳酸加リンゲル液にノボヘパリンを 1ml 加える。調製量は、施術頭数により変更する。

5%CS 加 25mM Hepes 緩衝 TCM-199 (100ml): 成熟培養液

25mM Hepes 緩衝 TCM-199	95.0 ml
CS	5.0 ml
抗生物質 PC-SM	100 μ l

メスシリンダーに上記試薬を入れ、開口部をパラフィルムで被い転倒混和する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間) 。



図 58 . 5%CS 加 25mM Hepes 緩衝 TCM-199 の調製

<精子処理～媒精>

1. パーコール液関連の調製

凍結融解後の生存精子を選別する際に 90%パーコール液を用いるが、パーコール液（100%濃度：Percoll）を希釈するために 10 倍濃度の sperm TL を調製する。

10 倍濃度 sperm TL (100ml): Percoll 希釈液

塩化ナトリウム	NaCl	4.675 g
塩化カリウム	KCl	0.23 g
リン酸二水素ナトリウム（無水）	NaH ₂ PO ₄	0.035 g
Hepes		2.38 g

ビーカーに 50ml 程度の超純水を入れ、上記薬品を溶解する。

pH メーターを用いて pH = 7.3 に調製する（NaOH を用いる）

* この液は pH が極めて低いため、約半分の溶液量で調製し、NaOH を加えていくことで pH = 7.3 に調製する。

メスシリンダーに溶液を移し、100ml にメスアップする。

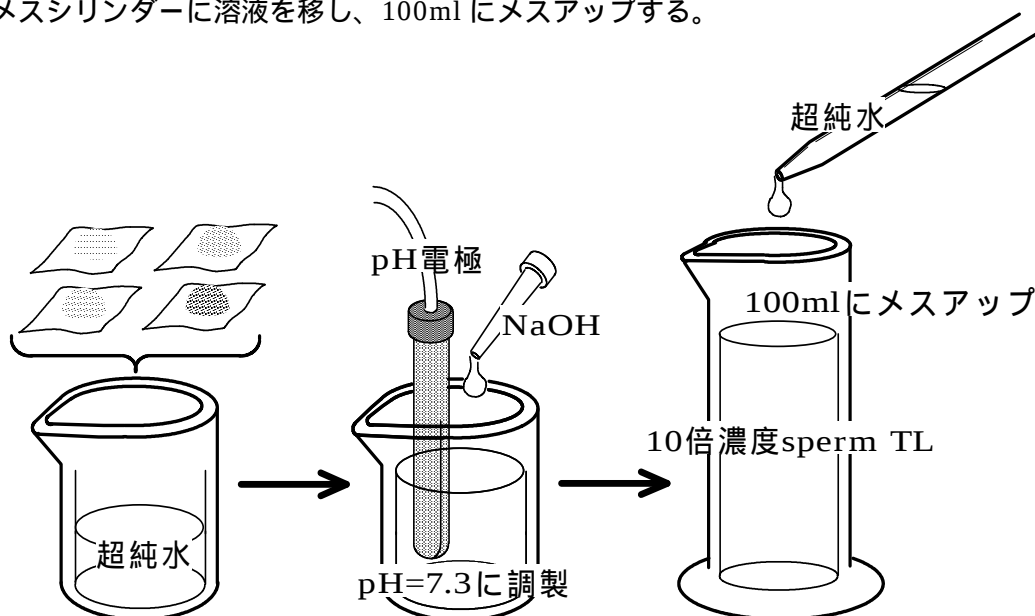


図 59 . 10 倍濃度 sperm TL の調製

90%パーコール液 (50ml): 生存精子選別溶液

a)	Percoll		45 ml
b)	10 倍 sperm TL		5 ml
c)	塩化カルシウム 1M 水溶液	CaCl ₂	98.5 μl
d)	塩化マグネシウム (六水塩) 0.1M 水溶液	MgCl ₂ · 6H ₂ O	197 μl
e)	DL-Lactic acid (syrup)		184 μl
f)	重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	0.1045 g
g)	0.5% フェノールレッド		10 μl
* c) 1M CaCl ₂ : 1.1098g / 10ml			
1M CaCl ₂ · 2H ₂ O : 1.4701g / 10ml			
d) 0.1M MgCl ₂ · 6H ₂ O : 0.2985g / 10ml			

a)と b)を混和し、50ml に調製する

c) ~ g)の試薬を加え、転倒混和する。

0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する。

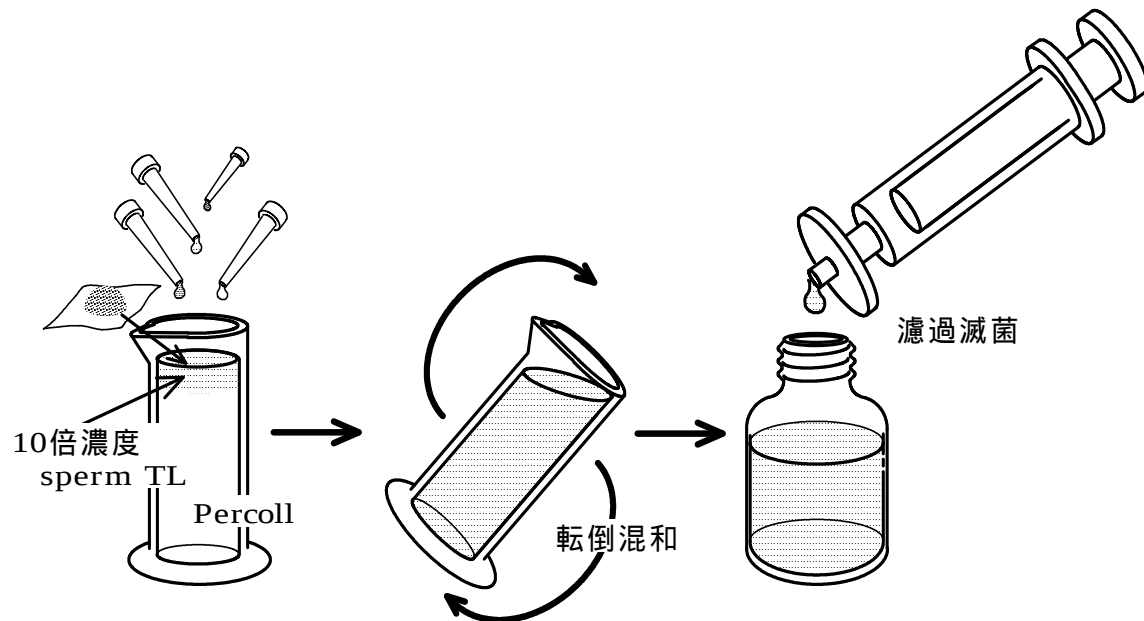


図 60 . 90%パーコール液の調製

2. BO 液の調製

予めストック液（BO-A 液および BO-B 液）を調製する

BO-A 液（500ml）: BO 液調製用ストック液

塩化ナトリウム	NaCl	4.3092 g
塩化カリウム	KCl	0.1974 g
* 塩化カルシウム二水塩	CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.2171 g
（塩化カルシウム無水塩の場合： CaCl ₂ 0.1639 g）		
リン酸二水素ナトリウム二水塩	NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O	0.0840 g
（リン酸二水素ナトリウム無水塩の場合： NaH ₂ PO ₄ 0.0646 g）		
* 塩化マグネシウム六水塩	MgCl ₂ ・6H ₂ O	0.0697 g
0.5% フェノールレッド		100 μl

500ml のメスフラスコに上記試薬を超純水で順次溶解し、メスアップする。
0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

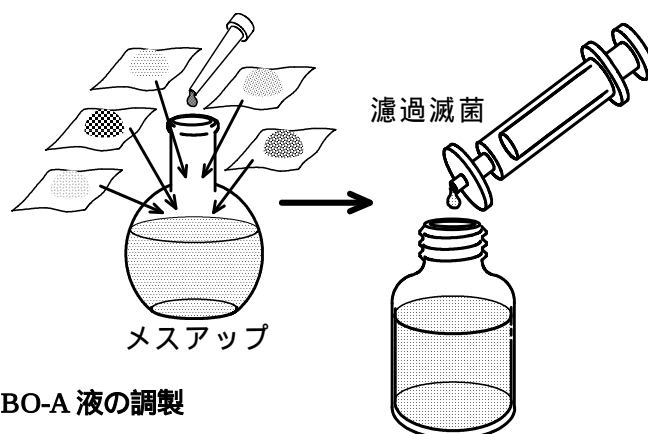


図 61．BO-A 液の調製

* 塩化カルシウム二水塩（CaCl₂・2H₂O）および塩化マグネシウム六水塩（MgCl₂・6H₂O）は水分を吸着し易いため、以下の方法で秤量する。

秤量皿で秤量する。

超純水を用いて試薬を秤量皿中で溶解し、メスフラスコに入れる。

を数回繰り返す。

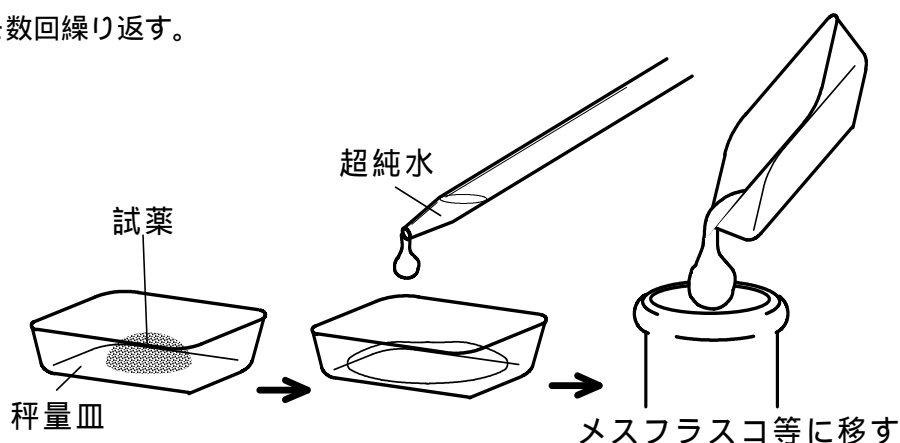


図 62．秤量皿での秤量

試薬が少量の場合や、水分の吸着が速すぎて秤の数値が数秒ごとに増えてしまう場合は、以下の要領で秤量する。

秤量皿で試薬の 10 倍の量を秤量する。

少量の超純水を加えて試薬を溶解する。

溶解した液をメスピペット等で量る。

溶解液の 1/10 量を調製液（メスフラスコ等）に入れる。

* の量について、場合によっては 2～5 倍でも構わない。 の秤量法も同様に、メスシリンダー等でも良い。BO-A 液にこの方法を用いる場合は、10ml 程度の超純水をメスピペットで量ることによって試薬を秤量出来る。

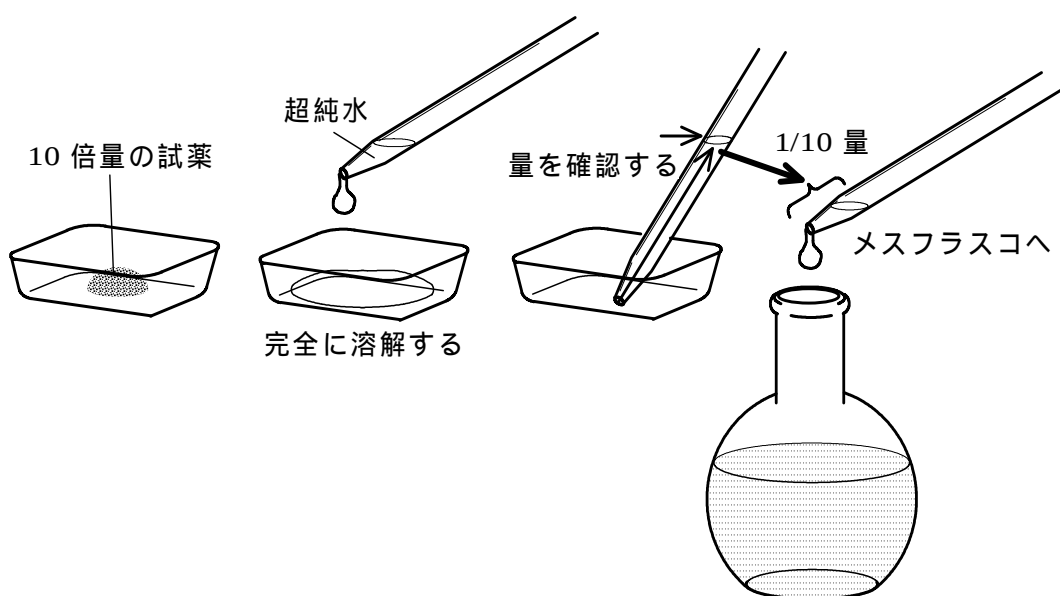


図 63 . 10 倍量秤量法

BO-B 液 (200ml): BO 液調製用ストック液

重炭酸ナトリウム	NaHCO_3	2.5873 g
0.5% フェノールレッド		40 μl

200ml のメスフラスコに上記試薬を超純水で溶解し、メスアップする。

溶液の色が淡赤色から淡黄色に変わる中間色になるまで直接 CO_2 ガスを通気する。

0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 ヶ月間)。

フェノールレッドは水素イオン濃度 (pH) 指示薬の一つで、pH6.4~8.2 の範囲で色調が淡黄色から淡赤色を示す。水溶液に CO_2 ガスを吹き込むと、水溶液が酸性に傾くので淡赤色から黄色に変化する。

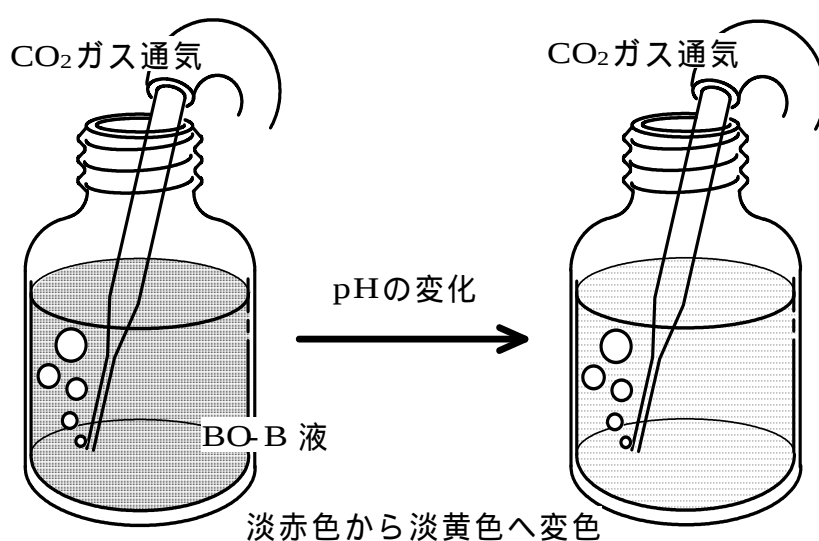


図 64 . BO-B 液への CO_2 ガス通気

* ストック液調製の際に CO_2 ガス通気して pH 調整するが、冷蔵保存中に元の色に戻る場合があるため (容器内の空気に変化する) 後述の BO 液調製の際に再び CO_2 ガス通気する。

**BO 液 (100ml) : 精子洗浄液、精子希釈液および卵子洗浄液の基礎培地
使用する前日または当日に調製する**

ピルビン酸ナトリウム	0.01375 g
BO-A 液	76 ml (メスアップ)
BO-B 液	24 ml (メスアップ)
抗生物質 PC-SM	100 μ l

100ml のメスシリンダーにピルビン酸ナトリウムを入れる。

BO-A 液でピルビン酸ナトリウムを溶解し、76ml までメスアップする。

BO-B 液に CO₂ を淡黄色になるまで通気する。

の液に BO-B 液を 24ml 加える (100ml の目盛りまでメスアップ)。

抗生物質を 100 μ l 加える。

転倒混和後、以下の精子処理液 (精子洗浄液、精子希釈液および卵子洗浄液) を調製する (54 頁、図 65)。

3. 精子処理液（精子洗浄液，精子希釈液および卵子洗浄液）の調製

BO 液（100ml）を元にして、以下の培養液を調製する

精子洗浄液（10ml）: パーコール処理後の精子洗浄（遠心分離）用

BO 液 + 10mM ハイポタウリン + 10u/ml ヘパリン

BO 液	10 ml
ハイポタウリン	0.01091 g
ヘパリン注射液（100u/ml）	100 μ l

以上を順次溶解し、転倒混和する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、使用時まで容器の蓋をゆるめて CO₂ インキュベーター内でガス平衡を行う。

精子希釈液（10ml）: 第二希釈時に使用

BO 液 + 20mg/ml BSA

BO 液	10 ml
BSA (crystallized and lyophilized)	0.2 g

BO 液をビーカー等に移し、BSA を静置溶解する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、使用時まで容器の蓋をゆるめて CO₂ インキュベーター内でガス平衡を行う。

卵子洗浄液（50ml）: 成熟卵子の洗浄用

BO 液 + 10mg/ml BSA

BO 液	50 ml
BSA (crystallized and lyophilized)	0.5 g

BO 液をビーカー等に移し、BSA を静置溶解する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌する。

媒精用のスポットと成熟卵子の洗浄用のシャーレを作製し、CO₂ インキュベーター内でガス平衡を行う。

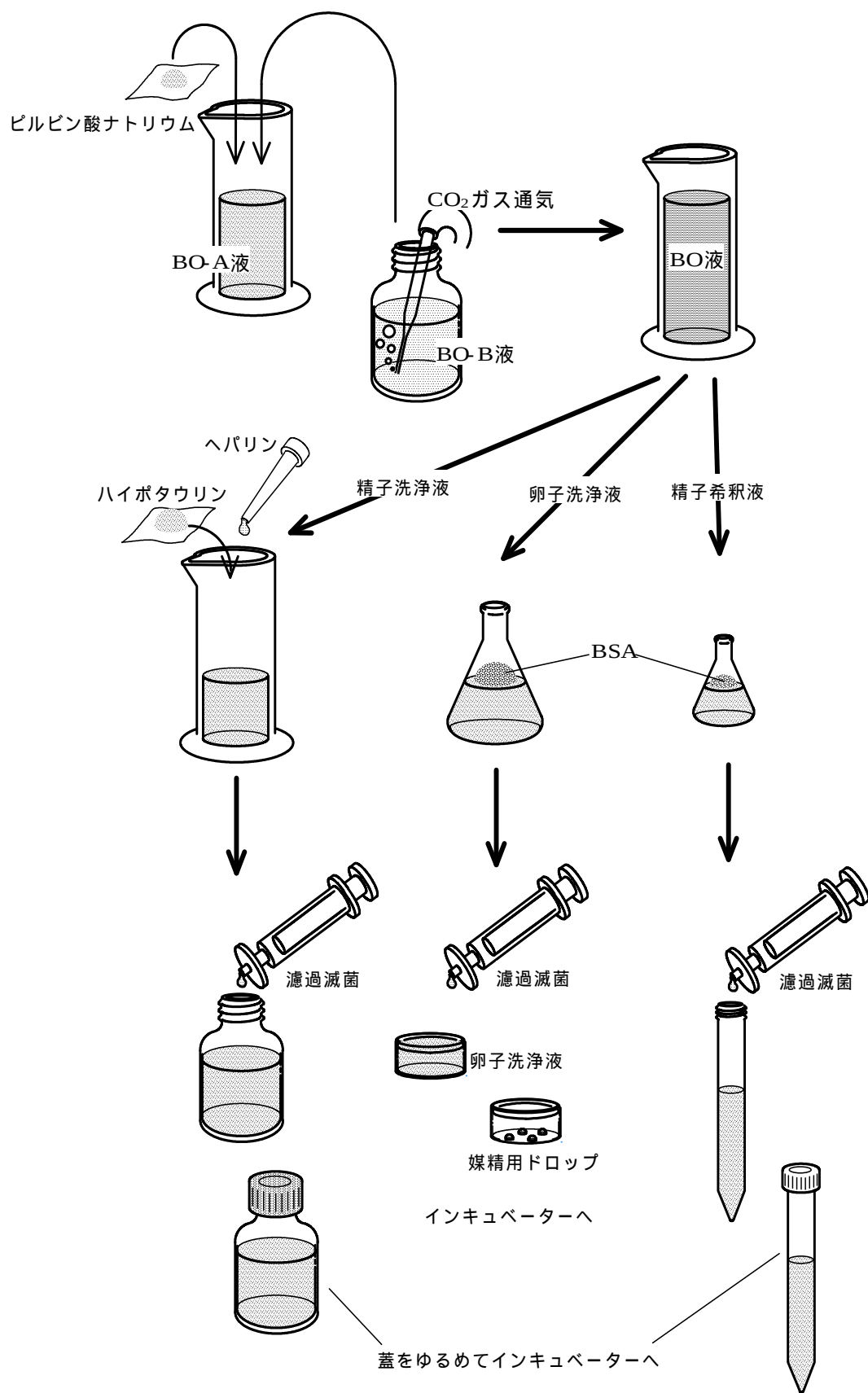


図 65 . 精子処理液調製法

< 発生培養 >

1. CR1aa の調製：発生培養の基礎培地（CS および LAA を添加して使用）

予めストック液（CR1-A 液および CR1-B 液）を調製する

CR1-A 液（760ml）：CR1aa 調製用ストック液

塩化ナトリウム	NaCl	6.7031 g
塩化カリウム	KCl	0.2311 g
ピルビン酸ナトリウム		0.0440 g
重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	2.2011 g
0.5%フェノールレッド		2.0 ml

1 リットルのメスシリンダーに上記試薬を超純水で順次溶解し、760ml までメスアップする。

0.22μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

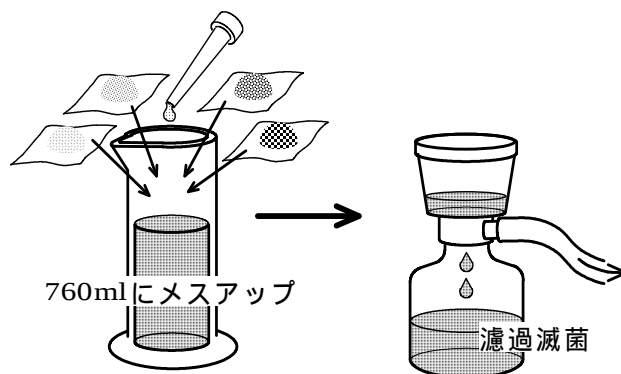


図 66 . CR1-A 液の調製

CR1-B 液（200ml）：CR1aa 調製用ストック液

L(+)-Lactic Acid Hemicalcium Salt	0.5996 g
-----------------------------------	----------

200ml のメスフラスコに上記試薬を超純水で溶解し、メスアップする。

0.22μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

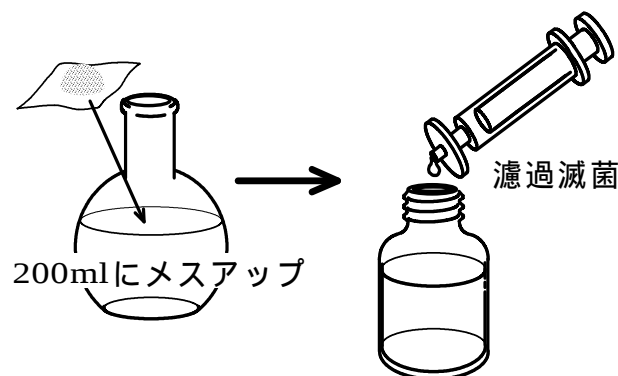


図 67 . CR1-B 液の調製

CR1aa (100ml) : : 発生培養の基礎培地 (CS および LAA を添加して使用)

a) CR1-A 液	76 ml
b) CR1-B 液	20 ml
c) BME Essential Amino Acids (× 50)	2 ml
d) MEM Nonessential Amino Acids (× 100)	1 ml
e) L-Glutamic acid (1 アンプル 20mg を超純水 10ml で溶解)	1 ml
f) BSA (Fatty Acid-free)	0.3 g
g) 抗生物質 PC-SM	100 μl

ビーカー等に a) ~ e) をメスピペットで入れ混和する。

BSA (Fatty Acid-free) を静置溶解する。

抗生物質 PC-SM を入れ、混和する。

血清を添加して使用する場合は、5%CS 加 CR1aa の調製に従う。

血清を添加しない場合は、0.22μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)

5%CS 加 CR1aa (105.26ml) : 発生培養液

CR1aa	100 ml
CS	5.26 ml

100ml の CR1aa に、CS を 5.26ml 加え転倒混和する。

0.22μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)

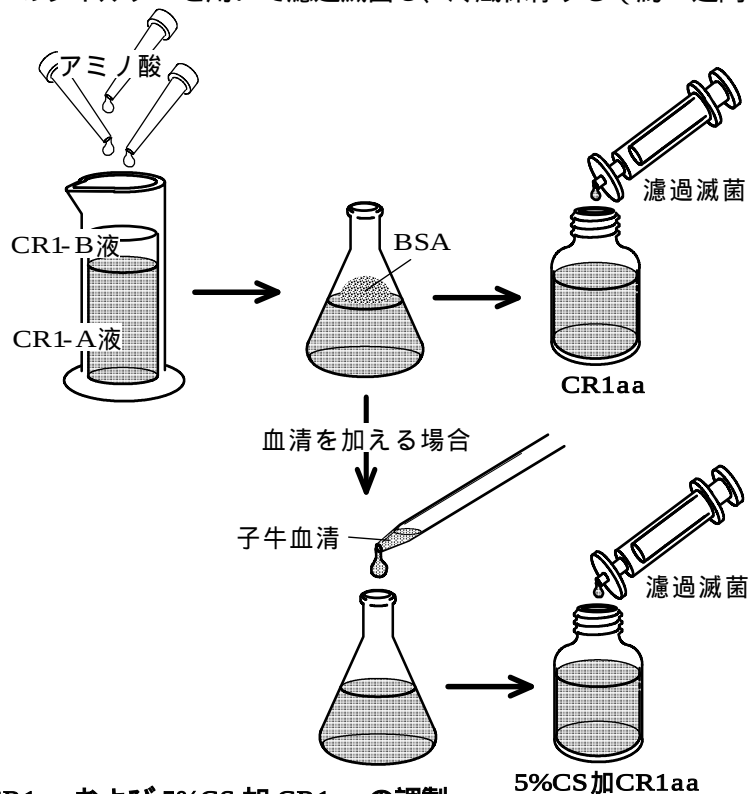


図 68 . CR1aa および 5%CS 加 CR1aa の調製

2. リノール酸アルブミン (LAA): 体外受精卵の耐凍性を向上

50mg/ml LAA ストック液 (10ml): 5%CS 加 CR1aa に添加するストック液
LAA (500mg) の瓶に CR1-A 液を 10ml 加え、完全に溶解する (約 1 ヶ月間)。

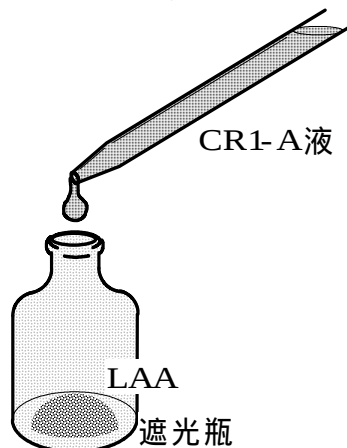


図 69 . LAA ストック液の調製

0.25mg/ml LAA + 5%CS 加 CR1aa (10ml): 耐凍性を向上させた発生培養液

5%CS 加 CR1aa 10ml からマイクロピペットを用いて 50 μ l 取り除く。

LAA ストック液を 50 μ l 加え、転倒混和する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。

* 使用する頻度が少ない場合は、LAA を秤量して 0.25mg/ml となるように直接培養液へ溶解する。

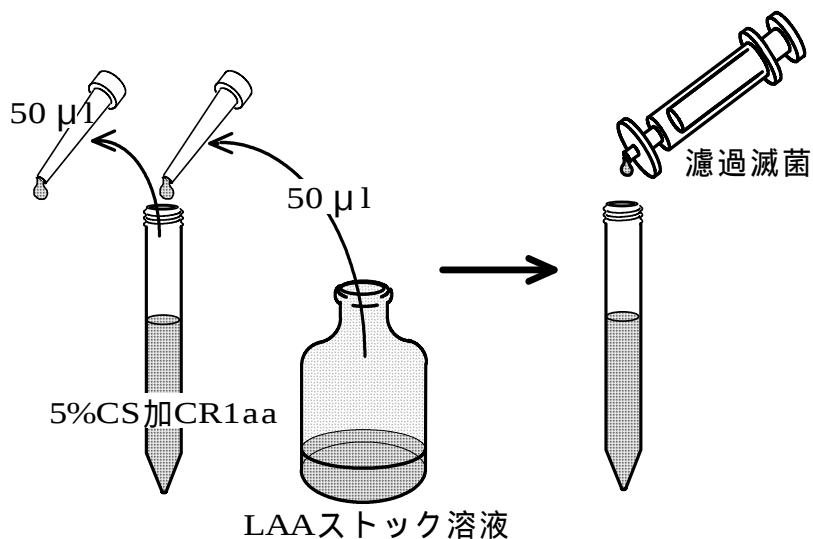


図 70 . 0.25mg/ml LAA + 5%CS 加 CR1aa の調製

< 体外受精卵の凍結・融解 >

1. 修正ダルベッコ PBS の調製

PBS-A 液と PBS-B 液を混和して D-PBS を調製し、ピルビン酸ナトリウムとグルコースを添加する。本来の修正 D-PBS は BSA が含まれるが、保存期間を延ばすため本マニュアルでは不含としている。

PBS-A 液 (約 700ml): D-PBS(-)液

塩化ナトリウム	NaCl	8.0 g
塩化カリウム	KCl	0.2 g
リン酸一水素ナトリウム (無水)	Na_2HPO_4	1.15 g
リン酸二水素カリウム (無水)	KH_2PO_4	0.2 g

- ・ 1 リットルのメスフラスコに約 700ml の超純水で上記試薬を順次溶解する。
- ・ 市販の D-PBS(-)粉末あるいは錠剤を利用すると、簡便に調製できる。
- * いずれの場合も、マグネティックスターラーを用いて溶解する。

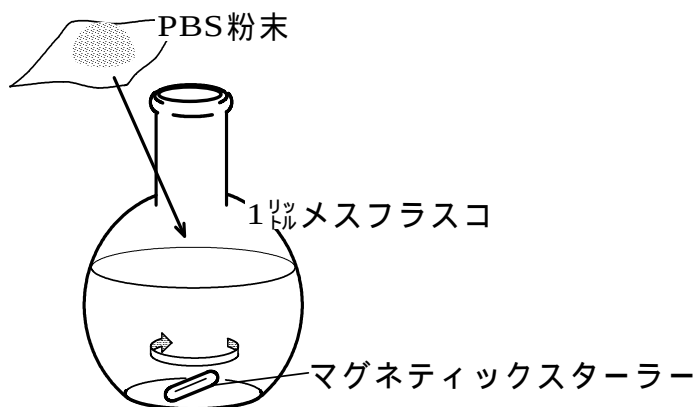


図 71 . PBS-A 液の調製

PBS-B 液：金属塩類希釈液

予め金属塩類ストック液を調製し、修正ダルベッコ PBS 調整時にストック液を希釈して PBS-B 液とし、PBS-A 液と混和する（D-PBS(+)液）。

1) 金属塩類ストック液（100ml）

塩化カルシウム無水塩	CaCl_2	1.0 g
.....		
（塩化カルシウム二水塩の場合 : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.1395 g）		
.....		
塩化マグネシウム（六水塩）	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 g

上記試薬を超純水で溶解し、100ml にメスアップする。

0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

2) PBS-B 液（約 100ml）

10ml の金属塩類ストック液を約 100ml の超純水で希釈し、PBS-B 液とする。

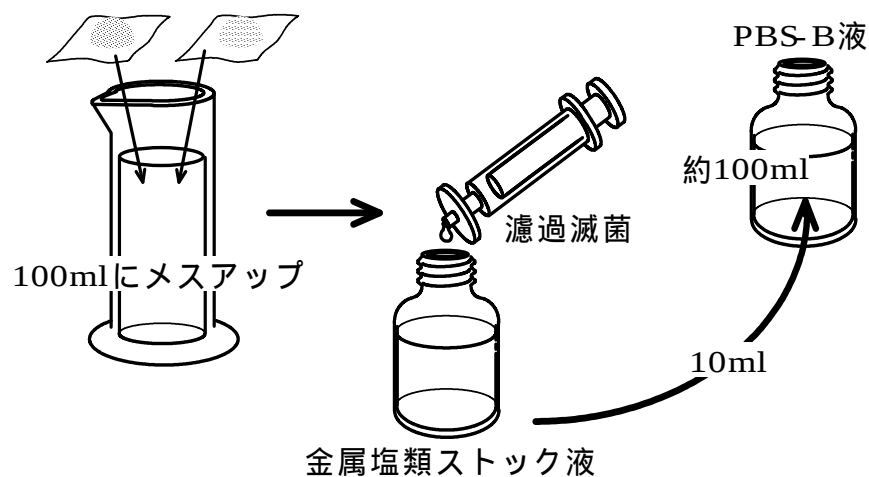


図 72 . PBS-B 液の調製

修正ダルベッコ PBS : D-PBS + ピルビン酸ナトリウム + グルコース (1 リットル) : 凍結および移植後の
基礎培養液

PBS-A 液	約 700 ml
PBS-B 液	約 100 ml
ブドウ糖	1.0 g
ピルビン酸ナトリウム	0.036 g

スターラーで搅拌している PBS-A 液中に、PBS-B 液を少量ずつ 4~5 回に分けて添加し、D-PBS(+)液とする。

約 800ml の D-PBS(+)液にブドウ糖およびピルビン酸ナトリウムを加え、完全に溶解してから 1 リットルにメスアップする。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 ヶ月間)。

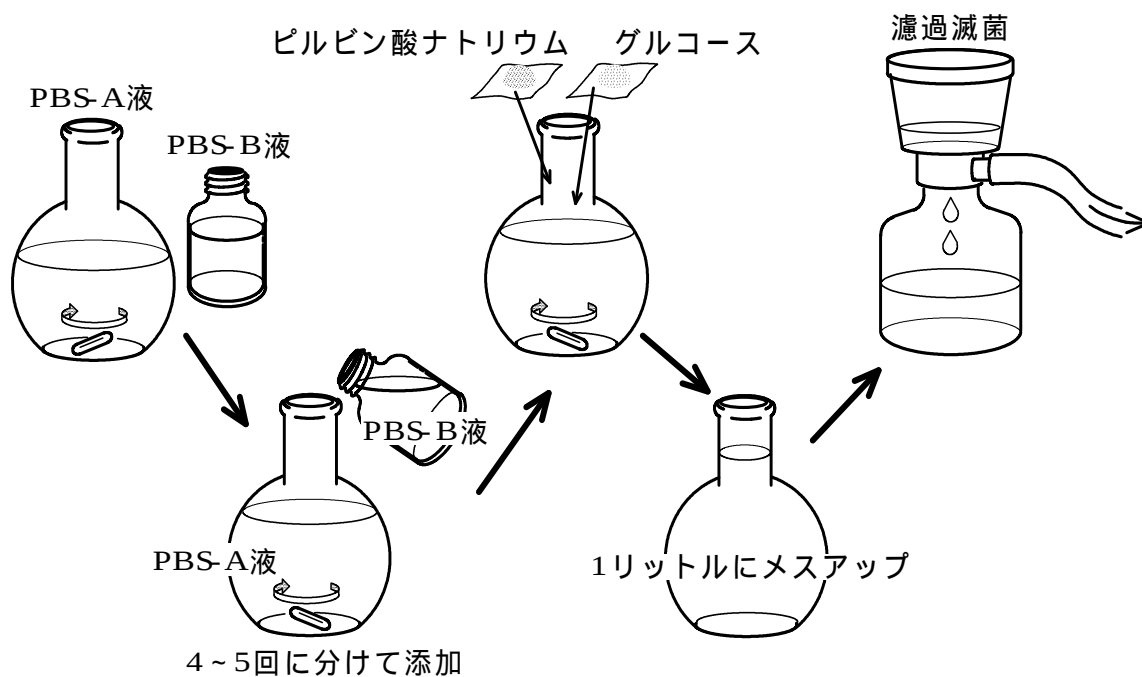


図 73 . 修正ダルベッコ PBS の調製

2. 凍結保存液の調製

20%FCS 加 修正 D-PBS (10ml): 体外受精卵の凍結保存に用いる基礎培地

a) 修正 D-PBS (m-PBS)	8 ml
b) FCS	2 ml
c) BSA (fraction V)	0.04 g
d) 抗生物質 PC-SM	10 μ l

ビーカー等に a)、b)をメスピペットで入れ混和する。

BSA (fraction V)を静置溶解する。

抗生物質 PC-SM を入れ、混和する。

凍結保存液を調製する場合は、1.5M EG + 0.1M Suc + 20% FCS 加 m-PBS の調製に従う。

凍結保存液を調製しない場合は、0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。

1.5M イソングリコール + 0.1M シュクロース + 20% FCS 加 m-PBS (10ml): 凍結保存液

シュクロース (Suc)	0.3423 g
イソングリコール (EG)	0.83 ml
20%FCS 加 m-PBS	10 ml (メスアップ)

メスシリンダーに Suc を入れる。

20% FCS 加 m-PBS を 5 ~ 6ml 加え、Suc を完全に溶解する。

EG を 0.83ml 加える。

20% FCS 加 m-PBS で 10ml までメスアップする

パラフィルムでシールし、転倒混和する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。

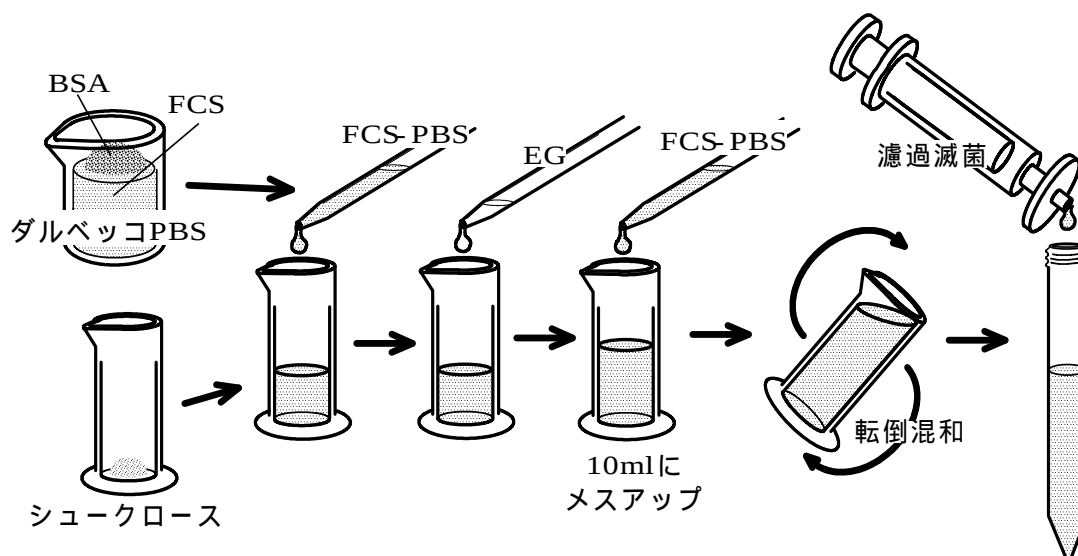


図 74 . 20%FCS 加 修正 D-PBS

および 1.5M イソングリコール + 0.1M シュクロース + 20% FCS 加 m-PBS の調製

3. 融解後の培養液の調製

20%FCS + 0.1mM β -メルカプトエタノール + TCM-199 を調製するが、添加する β -メルカプトエタノールは 0.1mM と微量であるため、予め 100 倍濃度のストック液を調製する。

β -メルカプトエタノールストック液 (10ml)

TCM-199	10 ml
β -メルカプトエタノール (β ME)	7 μ l

10ml の TCM-199 を試験管に入れる。

マイクロピペットを用いて試験管中の TCM-199 を 7 μ l 取り除く。

β ME を 7 μ l 加える。

パラフィルムでシールし、転倒混和する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。または、マイクロチューブ等に分注し、冷凍保存する。

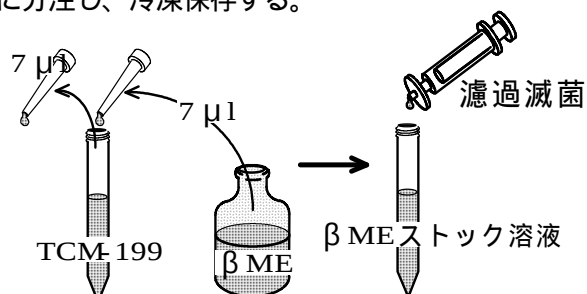


図 75. β -メルカプトエタノールストック液の調製

20%FCS + 0.1mM β ME + TCM-199 (10ml): 融解後の生存性確認用培養液

TCM-199	7.9 ml
β ME ストック溶液	100 μ l
FCS	2.0 ml
抗生物質 PC-SM	10.0 μ l

TCM-199 を 7.9ml 試験管に入れる。

マイクロピペットを用いて β ME ストック溶液を 100 μ l 加える。

FCS を 2.0ml 加える。

抗生物質を 10 μ l 加え、パラフィルムでシールし転倒混和する。

0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する (約 1 週間)。

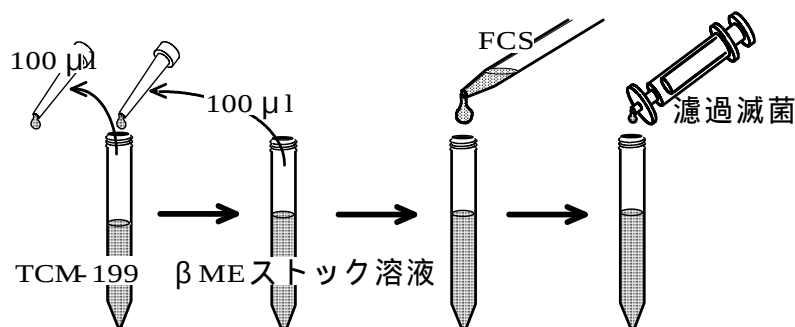


図 76. 20%FCS + 0.1mM β ME + TCM-199 の調製

< 培養液全般 >

1. 子牛血清 (CS) の非働化

CS の融解

凍結状態の CS 容器を 25 ℃ のウォーターバスで完全に融解する。

液体の状態になっても CS 中の成分が完全に溶解するまで 5～6 時間保温する。

*** この時、効率的に溶解するため、CS を撹拌する必要がある。撹拌の方法は以下の通り。尚、これらの撹拌操作は非働化处理時と同様に行う。**

- 数分おきに手で容器を振って撹拌する。
- シェーカーを用いる。
- ウォーターバスとマグネティックスターラーを組み合わせる容器内を撹拌する (図 77)。

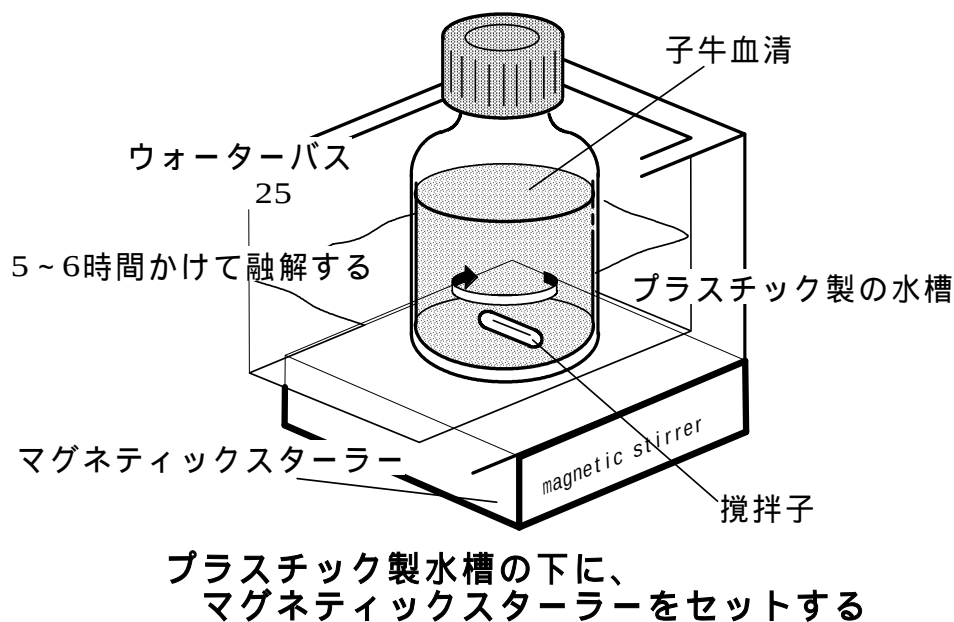


図 77 . CS の融解 c)法

CS の非働化

融解した状態から非働化を開始する。非働化の条件は 56 で 30 分間であるが、融解温度の 25 から非働化温度の 56 まで上昇する時間は非働化の処理時間には含まれない。CS の融解方法同様に様々な方法が考えられるが、本マニュアルでは以下の 2 つの方法を説明する。

a) プログラム通りに 56 へ徐々に温度を上昇させる方法

5-6 時間保温した状態 (25) から非働化を開始する。

ウォーターバスを設定を 56 にし、徐々に温度を上昇させる。

56 になった時点で非働化を開始する (30 分間)

終了したら CS 容器を取り出し、室温程度まで CS の温度を下げ、ボトルフィルタユニット等 (0.22 μ m) で濾過滅菌を行う。

1 回に使用する量により容器(冷凍保存に適する材質のもの:ポリプロピレン製のチューブ、遠心管)に分注し、冷凍保存する。

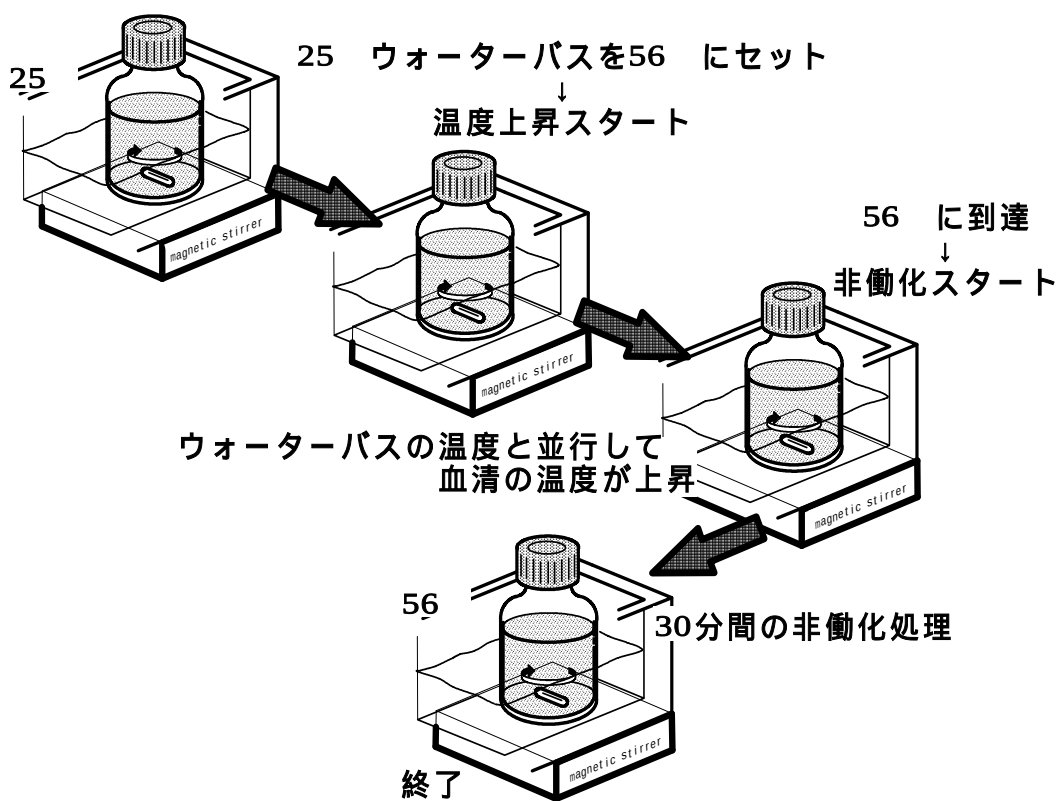


図 78 . CS の非働化 a) 法

b) 56 の温湯へ容器を投入し、温度を上昇させる方法

予め 25 の CS 容器中の液体が、何分で 56 になるかダミーを使用して確認する。

空の CS 容器中に水を入れ、温度計を挿入しパラフィルムで密閉する（ダミー）。
ダミーを発泡スチロール容器等で 25 に保温しておく。

ウォーターバスの温度を 56 にする。

ダミーをウォーターバスに投入し、タイマーをスタートさせる。

ダミーの温度計が 56 になった時間を記録する。

数回繰り返し、その平均時間を求め、「温度上昇時間」とする。当センターでは 500ml の容器を用いて、温度上昇時間を 15 分間としている。

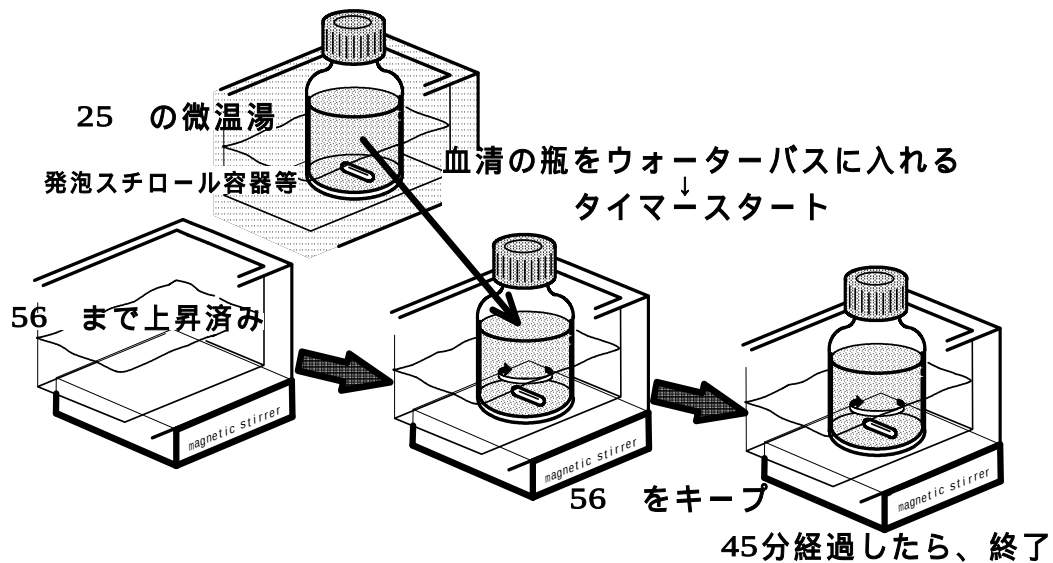


図 79 . CS の非働化 b) 法

温度上昇時間を求めたら、同条件（室温等も）で CS を非働化する。

CS 融解後... (図 79)

CS 容器を発泡スチロール容器等で 25 に保温しておく。

ウォーターバスの温度を 56 にする。

CS 容器をウォーターバスに投入し、タイマーをスタートさせる。

温度上昇時間 + 非働化時間が経過したら非働化を終了し、CS 容器を取り出して室温程度まで CS の温度を下げ、ボトルフィルタユニット等（0.22 μm ）で濾過滅菌を行う。

1 回に使用する量により容器（冷凍保存に適する材質のもの：ポリプロピレン製のチューブ、遠心管）に分注し、冷凍保存する。

* 当センターでは、タイマーをスタートさせてから 45 分間（温度上昇時間：15 分間 + 非働化時間：30 分）で終了としている。

2. 抗生物質：培養液、凍結媒液等に添加する。雑菌の増殖を防ぐ。

ペニシリン - ストレプトマイシン (PC-SM) 混合液

ペニシリン (PC)

結晶ペニシリン G 加味明治 10 万 単位

ストレプトマイシン (SM)

硫酸ストレプトマイシン明治 1 g 力価入 0.1 g

m-PBS 1 ml

SM 0.1g を秤量し、PC 10 万単位が入っている小瓶に入れる。

使用するまでパラフィルムで被い、冷蔵保存しておく。

使用時に m-PBS 1ml で溶解し、よく混和する。

*** 溶解してから 1 週間冷蔵保存可能**

各種溶液への添加量は、PC-SM が 1000 倍希釈されるようにする

例 PC-SM 1 μ l / 溶液 1ml

PC および SM の最終濃度は、以下のようになる

PC : 100 U / ml

SM : 100 μ g / ml



図 80 . ペニシリン - ストレプトマイシンの調製