

6. 各種溶液の調整

<OPU>

◎1%CS 加 乳酸加リンゲル液(1L):採取卵子検索・洗浄用

乳酸加リンゲル液	1,000 mL
CS	10 mL
抗生物質 PC-SM(29 頁参照)	1,000 μ L

- ① 市販の乳酸加リンゲル液 1,000mL に、CS を 10mL 入れ、抗生物質を 1,000 μ L 添加して転倒混和
- ② 保存する場合は、冷蔵保存(約 1 週間)
- * OPU から卵子検索に時間が掛かる場合は、以下の卵子検索・保存液を用いる。

◎10U/mL ヘパリン加 1%CS-乳酸加リンゲル液: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(1,000 U/mL)	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

<卵子の検索・保存液>

◎11mM Hepes、9mM Na-Hepes 緩衝 TCM-199(1,000mL):修正 TCM199

a) TCM-199 粉末 (1,000 mL 用)	1 袋
b) 重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃ 0.42005 g
c) HEPES	2.62 g
d) HEPES sodium salt	2.35 g
e) 抗生物質 PC-SM	1,000 μL

- ① a)を約 800mL の超純水(シグマアルドリッチ:Water for embryo transfer)に溶解
- ② b)の試薬を加え、よく攪拌(最終的に 5mM とする)
- ③ 別の容器で、c)と d)を約 100mL の超純水に溶解し、混和したら②に添加(最終的にそれぞれ 11mM、9mM とする)
- ④ e)を③に混和し、超純水で 1,000mL にメスアップししばらく攪拌
- ⑤ 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、滅菌済み小瓶または遠沈管(95mL または 47.5mL)に分注し、冷蔵保存する(約 1 ヶ月間)

◎5%NCS 加 9mM Hepes、11mM Na-Hepes 緩衝 TCM-199(100mL): 卵子の検
索・保存液

修正 TCM199	95 mL
NCS	5 mL
抗生物質 PC-SM	100 μ L

- ① 分注した修正 TCM199 に NCS を 5%になるように添加して転倒混和
- ② 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)。

< 卵子の培養 >

◎5%NCS 加 25mM Hepes 緩衝 TCM-199(100mL): 成熟卵子培養液

25mM Hepes 緩衝 TCM-199	95 mL
NCS	5 mL
抗生物質 PC-SM	100 μ L

- ① 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
- ② 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存

◎5%NCS および 0.002AU/mL FSH 加 25mM Hepes 緩衝 TCM-199(100mL):
未成熟卵子培養液

25mM Hepes 緩衝 TCM-199	95 mL
NCS	5 mL
FSH(10AU を PBS 5mL に溶解)	100 μ L
抗生物質 PC-SM	100 μ L

- ① 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
- ② 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存

<精子処理>

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 45%および 60%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

◎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	0.230 g
リン酸二水素ナトリウム(無水)	NaH ₂ PO ₄	0.035 g
(* 上記が NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O なら 0.0455 g)		
Hepes		2.380 g

- ① ビーカーに 50mL 程度の超純水を入れ、上記薬品を溶解
- ② pH メーターを用いて pH=7.3 に調製(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
- ③ メスシリンダーに溶液を移し、100mL にメスアップ

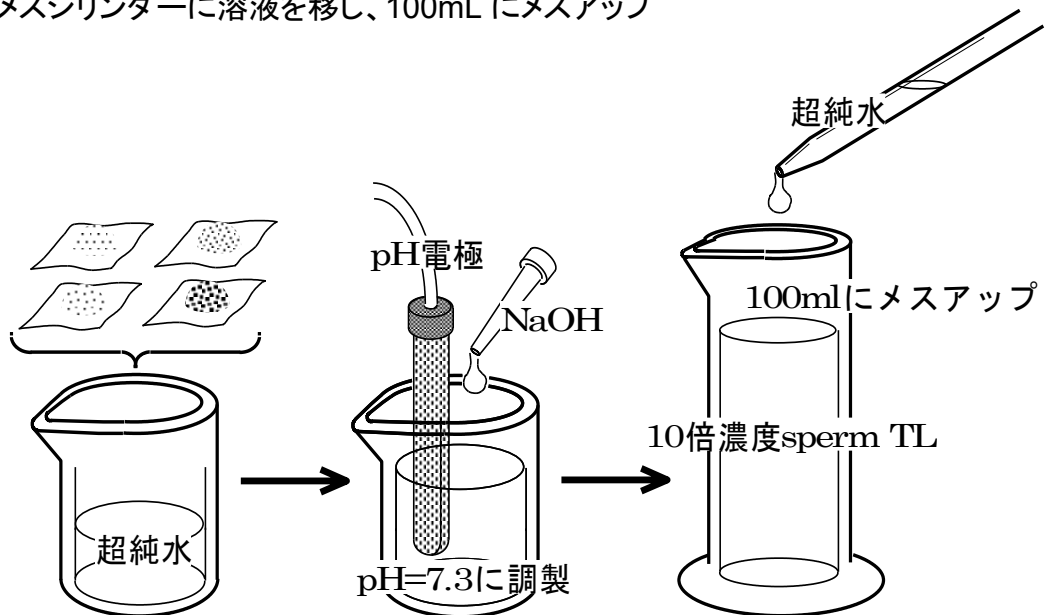


図 9. 10 倍濃度 sperm TL の調製

◎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		

- ① a)と b)を混和し、50mL に調製
- ② c)～g)の試薬を加え、転倒混和
- ③ 0.22μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存

◎45%パーコール液（50mL）：生存精子選別溶液

a) Percoll		22.5 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
h) 純水（ミリQ水）		22.5 mL

- ① a)、b)および h)を混和し、50mL に調製
- ② c)～g)の試薬を加え、転倒混和
- ③ 0.22μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存

◎60%パーコール液（10mL）：生存精子選別溶液

90%パーコール液	3mL
45%パーコール液	6mL

混合して 60%パーコール液 9mL となる

＜発生培養＞

1. CR1aa の調製：発生培養の基礎培地（NCS 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 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。
- ② 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）。

◎CR1-B 液（200mL）：CR1aa 調製用ストック液

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

- ① 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。
- ② 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）。

◎CR1aa（100mL）：発生培養の基礎培地（NCS 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 (0.02 g を超純水 10mL で溶解して使用)	1 mL
f) BSA (Fatty Acid-free)	0.3 g
g) 抗生物質 PC-SM (29 頁参照)	100 μL

- ① ビーカー等に a)～e)をメスピペットで入れ混和する。
- ② BSA (Fatty Acid-free)を静置溶解する。
- ③ 抗生物質 PC-SM を入れ、混和する。
- ④ 血清を添加して使用する場合は、5%NCS 加 CR1aa の調製に従う。
- ⑤ 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%NCS 加 CR1aa (105.26mL) : 発生培養液

CR1aa	100	mL
NCS	5.26	mL

- ① 100mL の CR1aa に、NCS を 5.26mL 加え転倒混和する。
- ② 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)。

2. リノール酸アルブミン (LAA) : 体外受精胚の耐凍性を向上

◎50mg/mL LAA ストック液 (10mL) : 5%NCS 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)。

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

- ① 5%NCS 加 CR1aa 10mL からマイクロピペットを用いて 50 μ L 取り除く。
- ② LAA ストック液を 50 μ L 加え、転倒混和する。
- ③ 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)。

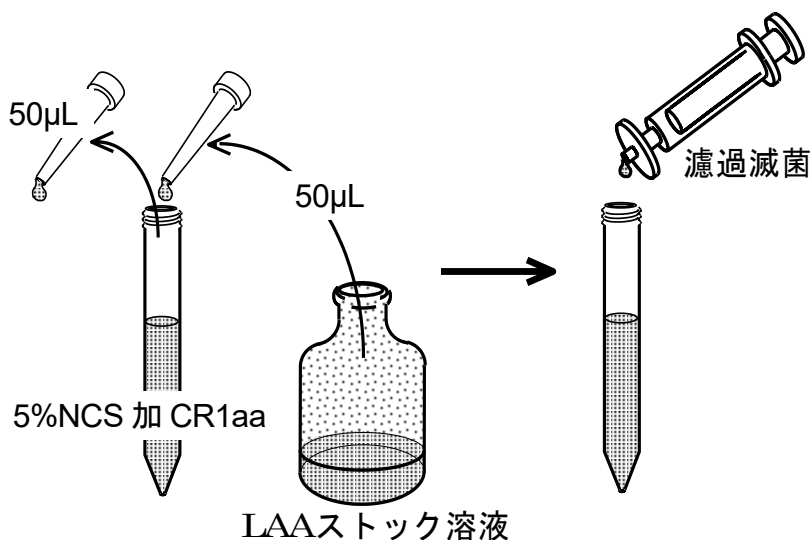


図 10. 0.25mg/ml LAA+5%NCS 加 CR1aa の調製