

5. 体外受精胚の凍結保存と融解

1) 凍結保存

- ①平衡液: 1.36M グリセリン(Gly)+ 20 %NCS 添加修正 TCM199
②凍結媒液: 1.36M グリセリン(Gly)+ 0.25M シュクロース(Suc)+ 20 %NCS 添加修正 TCM199
③希釈液: 0.25M Suc + 20 %NCS 添加修正 TCM199
を準備する。
2. 平衡液中に胚を 10 分間浸漬する(胞胚腔の再拡張の観察)。
3. 胚を 1cm の長さの凍結媒液(約 30 μ L)と共に凍結媒液の入ったシャーレに移し、15 分以内(胚が沈んだらすぐにでも良いです)にストロー内へ装填する(図 8)。
4. あらかじめ植氷温度(−6.0°C)にしたプログラムフリーザーにストローをセットする。
5. アルコールバスにセットし、1分経過後に植氷操作(胚層の上の希釈液層)を行う。
6. 植氷後の植氷温度保持時間は9分間とする。
7. その後−0.33°C/min で−25°Cまで冷却し、−25°Cで 5 分間保持後、液体窒素に投入する。

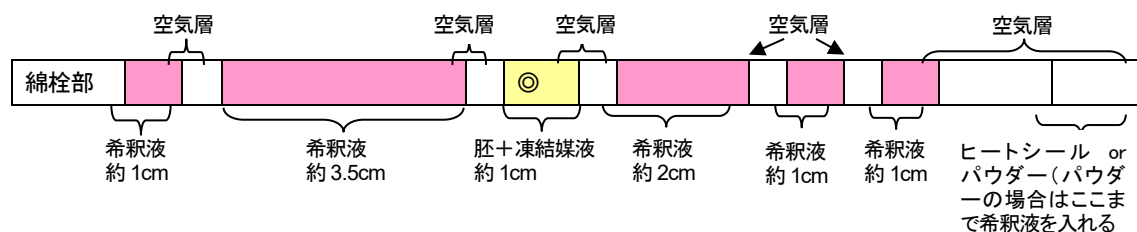


図 8. ストローへの胚の充填方法

(解説)

- ① 各溶液の調整には NCS を添加せず濾過滅菌して各溶液(各 4 mL または 8 mL に分注する)を−30°C以下で凍結保存しておくると便利である。使用時に融解し、濾過滅菌した血清を加えるだけで使用可。
- ② 拡張胚盤胞が胚盤胞に比べて凍結・融解後の生存率が高いため、拡張胚盤胞の時期に緩慢凍結することが実用的である。特に直径 180 μ m 以上に发育した胚盤胞は生存性が高い。
- ③ 平衡液の中で胞胚腔が再拡張した胚盤胞の凍結融解後の生存性は高い。これは耐凍剤の細胞膜透過性を指標とした評価法である。
- ④ 拡張胚盤胞を凍結媒液に入れてプログラムフリーザーにストローをセットするま

でが 15 分間であり、それ以上長くする必要はない。

- ⑤ あらかじめストローに綿栓側の前平衡液を吸引しておく、短時間でストローへの胚の充填が終了する。

2) 融解および受精卵移植

1. ストローカッターをアルコール綿で消毒する。
2. 受精卵移植器やシース管など移植に必要な器具を順序よく並べて準備する。
3. ストローを液体窒素から取り出し、空気中で 10 秒間保持し、30℃の温湯に移して融解する。
4. 氷晶が消えたら(20 秒間)ストローを取り出す。
5. 固く絞ったアルコール綿でストローを拭く。
6. シール部分をストローカッターでカットして受精卵移植器にセットする。
7. 受胚牛に移植する。

(解説)

- ① 受精胚は外気温、光によるダメージを受けるため注意する。
- ② 移植はなるべく短時間で終了させる。そのため、1 人で移植をする場合、受胚牛の準備(除糞、外陰部の消毒、尾椎硬膜外麻酔など)は受精胚の融解前に終わらせておく。
- ③ また、2 人で移植を行う場合、移植者が全ての準備を完了した後、補助者が受精胚を融解、移植器にセットして直ちに移植する。