

はじめに

ホスト: Cook Medicalは、約30年にわたって世界中の不妊専門医のニーズに的確に対応する製品を高度な熟練技術によって設計・製造してきました。Cook ART (生殖補助医療) ラボによろそお越しいただきました。

今日のツアーでは、Cookの革新的な体外受精製品について説明します。これには、卵子吸引、顕微操作、胚培養、胚移植用の一連の体外受精製品が含まれます。体外受精装置による統合ソリューションによって、ラボおよび臨床の能力の両方を最適化することができます。

臨床情報担当者およびラボ情報担当者がその手順とCook装置の使い方について説明します。このツアーで提供する情報は、単にガイドとして使ってください。ここでお見せする方法は最先端の体外受精センターで現在実施されている方法ですが、別の手段や変法もたくさんあります。各ラボは、個々の医療施設に最適な手順とプロトコルを確立する必要があります。

では始めましょう。

---

-1日目

培地の設定と調製

ホスト: 配偶子採取の前日は、-1日目と呼ばれることもありますが、この前日は培地の設定と調製を始めます。

ラボ情報担当者: Cookは培地バイアルを無菌状態で開けられるようにSTICを開発しました。滅菌したSTICを用いて、各アームの末端にあるフックの1つを使ってプラスチック製キャップを外します。次にフックを使ってアルミニウム製のシールを外します。

ストッパーをSTICのジョー内にスライドさせ、ゆっくりと回転してシールを開けます。ご覧のようにしてストッパーを外します。

STICを傍に置きます。ストッパーは無菌領域、できれば層流フード内に必ず置いてください。

ホスト: 次に、ラボ情報担当者が、すべての体外受精手順で皿を準備する時に使用できるテクニックを説明します。

ラボ情報担当者: まず、ペトリ皿を層流フードで乾かすことから始めて、浮き上がりやすい汚染物を放散させることから始めます。

午後にペトリ皿を設定します。ペトリ皿を重炭酸イオン緩衝培地で満たし、これらをCookのMINCベンチトップインキュベータに一晩入れます。これによって、培地が6%二酸化炭素、5%酸素、89%窒素から成る混合ガス内で平衡状態に達します。

微液滴の蒸発によって起こる浸透圧ストレスを避けるために1度に1個ずつペトリ皿を準備してください。

ホスト: あるいは、お好みのペトリ皿を使用することもできます。一度に1個ずつペトリ皿を準備し、培養オイルでカバーします。開放系の培養を行う場合には、各ペトリ皿を準備し、できるだけ早くペトリ皿をMINCに戻して蒸発を避けるようにします。

---

0日目:  
卵子採取の準備

ホスト: 卵子吸引過程では、卵丘卵子複合体に何回もストレスがかかるため、卵子の生存性が損なわれる可能性があります。Cookの製品は、吸引手順を簡素化する一方で、最適な生存性を維持し患者が外傷を受ける頻度を最小限にします。この手順で使用される培地は、適切な栄養素が配偶子と胚の変化する代謝要求に見合うように調製されています。

ラボ情報担当者: エンブリオロジストは、卵子採取の前にFalcon社製の試験管を準備するために、各試験管に約5 mlのフラッシュバッファーで満たします。次に試験管は処置室に持って行き、試験管ヒーター内に入れます。Cookの試験管ヒーターは、最適の温度を維持するように設計されており、卵子への温度に関連する損傷が最小限になります。次に、看護師がニードルの開存性試験を実施します。吸引ニードルを患者に挿入する直前に試験管にルアーシールストッパーを取り付けます。

0日目:

卵子の採取

ホスト: これで医師が卵子の採取手順を行う準備ができました。

臨床情報担当者: すでに膣壁に局所麻酔が注入されています。膣壁に沿って16Gまたは17GのOva-Stiffニードルを前進させて左側卵巣に挿入し、最初の卵胞を吸引し始めます。次の卵胞に移動します。試験管に液体が流れていくのが見えます。卵胞の最初の部分を吸引する間は、通常透明に見えます。終わりに近づくと、少量の血液のために赤色になるのに気付きます。試験管に注意して、液体が一番上まで来ないようにすることが重要です。ストッパーは液体が誤ったチューブに流れることを防ぐように設計されています。

今、ニードルを引き戻して、次の卵胞に前進させています。ニードルが卵胞内に入ったら、ニードルをゆっくり回転させて卵胞壁がニードルのベベルに対して閉塞されることがないように確認します。超音波プローブをゆっくりと移動して卵胞が完全に空であることを確認します。もう一度ニードルを引き戻して、次の卵胞に前進させます。超音波モニターで卵胞のサイズがより小さくなっているのが確認できます。ニードルを回転させ、プローブをゆっくり移動させることで、卵子が最後のミリリットルの液体まで回収されたことが確認できます。

上方の次の卵胞に移動しながら、最初の卵子を取り出しました。次の卵胞に移動する前に、再度ニードルを回転させて卵胞が完全に空であることを確認します。最初の卵巣は完全に空になったように見えます。液体で洗い流すことができます。

次に2番目の卵巣です。もう一度ニードルを膣壁を通して最初の卵胞に挿入します。吸引手順中は、ポンプに弱めの一定の圧力をかけることが重要です。-100 mmHgの圧力を使用します。流速を低くすると、時間がかかり、採取手順の効率が低下します。ポンプの圧力が高すぎないようにすることも重要です。圧力が高すぎると、卵子の破損および透明帯に特有の亀裂を起こす可能性があります。

流れが適正でない場合は、ストッパーが正しく配置されていないこと、試験管に亀裂が無いことを確認します。

卵胞から卵胞に移動する時は、一定の圧力を維持するために吸引ポンプを動作したままにす。またニードルを常に回転させ、プローブを移動します。移動させると、卵胞壁がニードルに接着するのを防ぎます。

ニードルが完全に閉塞することが時々起こります。膣壁からの上皮細胞または卵胞内壁細胞が閉塞の原因となることがあります。閉塞が起こった場合は、Cookポンプの高圧ポンプボタンを使って近接した詰りを取り除きます。それでも解決しない場合は、ニードルを完全に抜去して、バッファーの入った試験管内にニードルを入れます。次に、チューブを通してバッファーを再度吸引することを試みます。

完全閉塞の原因の多くは、チューブ内に残った血液からの血塊である可能性があります。完全閉塞が起こった場合は、ストッパー（ストッパーの上部にはルアーセッティングが付いています）を外し、シリンジを使ってストッパーを通してバッファーを逆方向に注入し、閉塞を取り除きます。

---

0日目:

採卵用ニードル

ホスト:

Cookは、数種類の異なる系列の採卵用ニードルを提供しています。各系列には独自の特定の機能があります。ここで、その他のニードルについて説明し、どのようにして使用するかを見てみましょう。

以下の各採卵ニードルは、Cookが特許をもつEchoTipが付いています。EchoTipのマーキングにより、超音波モニター上でのニードル先端部がよく見えるようになります。EchoTipの付いたニードルを使うと、最適な採卵ができる位置にニードルを正確に留置できます。

採卵中に、卵胞のフラッシュを行いたい場合があります。Cookはこの目的のために特別に設計されたニードル系列を提供しています。ダブルルーメンニードルでは、小さい方のルーメンで卵胞がフラッシュされ、大きい方のニードルで内容物が吸引されます。これらの手技は同時に、または別々に実施することができます。ダブルルーメンニードルは、卵胞フラッシングバッファーでフラッシュするためにルアーロック式シリンジと簡単に接続できます。

このバッファーには、泡が出ないようにタンパク質が含まれておらず、また卵丘卵子複合体へのストレスを最小限にするように調製されています。HEPESバッファーが含まれており、使用前に37℃に暖める必要があります。

OPAAニードルは、Bベベルをもつシングルルーメン型の吸引ニードルです。このハンドルの設計は、吸引中の卵胞の回転を容易にします。サムノッチがベベ

ルの向きを示しています。ルアーロック式のプロキシマルハブには、シリンジまたは吸引ラインを接続できます。

Cookにはまた、小さい卵胞用に特別に設計された一連のニードルがあります。これらのニードルは18Gから21Gの範囲で、すべてより小さいAベベルが取り付けられており、卵胞の内容物が確実に回収されるようになっています。

---

0日目:

卵子の凍結保存

ホスト: 卵子を凍結保存することによって、卵子を解凍して受精させるまで無期限に保存することができます。この技術は、不妊の問題をもつ女性、癌や医療治療によって卵子が破壊されるか、損傷を受ける可能性のある女性にとって特に重要です。

Cookは卵子凍結保存キットと卵子解凍キットを販売しています。卵子凍結の詳細について関心がありましたら、「Life from the Freezer (冷凍庫からの生命)」をご覧ください。

---

0日目:

卵丘卵子複合体の同定

ホスト: 次に、ラボまたは処置室のいずれかで層流フードを使って、エンブリオロジストが卵丘塊を同定します。ラボ情報担当者が卵丘卵子複合体の同定手順について説明します。

ラボ情報担当者: エンブリオロジストが卵丘卵子複合体を捜します。同定された卵子は、血液や細胞の残渣を除くために洗浄され、前もって平衡化された受精培地の入ったペトリ皿に入れます。通常、各ペトリ皿に2個または3個の卵丘卵子複合体を入れます。媒精または顕微授精の準備をしている間、卵丘卵子複合体をCook MINCベンチトップインキュベータ内に戻しておきます。

ホスト: MINCは、Cookが体外受精のために特別に開発したベンチトップインキュベータです。このインキュベータは、蓋を閉じる度に自動的にガスを追い出して、望ましい環境を再度達成します。その結果、他のインキュベータと比べてpHレベルがより速く通常レベルに戻り、胚へのストレスが少なくなります。

MINCの加熱したチャンバーベースプレートと蓋は37℃の安定した温度環境を提供します。さらに24時間自己モニタリングソフトウェアが、温度、ガスフロー、警報発生を監視し報告します。

ラボ情報担当者: ここではほとんどのMINCは直列に接続されますが、胚がインキュベータの外にある時間をできるだけ短くするために、処置が実施される場所のすぐ隣にも置かれます。MINCは培養システムの中で不可欠な要素になっています。従来よりも大型のインキュベータは、試験管内培地の平衡化にまだ使用できます。

---

0日目:  
精子の調製

ホスト: 射精液から運動精子を分離するには、一般的に密度勾配遠心法または精子スィムアップ法のいずれかの方法を使用します。

ラボ情報担当者: 精液検体の密度勾配法では、40%/80%の密度勾配混合液を使用して精子検体を分離・精製します。調製された2個の勾配に精液の原液を入れて検体を2個調製します。精液を入れすぎないように注意します。

検体試験管を300xgで20分間遠心します。注意して精子のペレットを取り除き、3 mlの配偶子バッファー中で600xgで遠心することで更に2度洗浄します。最後にペレットを少量の精子用培地または受精用培地内で再度懸濁します。このように調製された精子検体を、将来の媒精または顕微授精のために保存します。

ホスト: 精子を調製する別の方法はスィムアップ法です。これは、精液原液が洗浄した精液で行います。

---

0日目:  
顕微授精の準備

ホスト: 次に顕微授精について説明します。これはICSIと呼ばれることもあます。

ラボ情報担当者: 顕微授精の準備をするために、卵子を希釈したヒアルロニダーゼ溶液中で1分以下インキュベーションして、卵子から卵丘細胞を取り除きます。インキュベーション後、卵丘卵子複合体を配偶子バッファーに移して剥離します。CookのFlexipetを使って卵子の透明帯からできるだけ多くの細胞を取り除きます。

口径が順に小さくなる一連のCook Flexipetを使って、透明帯に細胞がなくなるまでコロナ細胞を取り除きます。Flexipetの先端を卵子にできるだけ近づけ、Flexipetでゆっくりと液体を出し入れします。顕微鏡の縁またはベンチの上に手首を置くことで、先端部の動きを最小限にできます。卵子が剥離されたら、前もって平衡化された重炭酸イオン緩衝培地の入った注入用の皿に卵子を移し、インキュベータに入れます。

顕微授精の手順が10分以上かかると考えられる場合は、配偶子バッファの入った注入用皿を準備して、使用前に37℃に暖めます。

ポリビニルピロリドン (PVP) の水滴の側面から精子を注入します。培養オイルで中央の水滴を覆い、必要になるまで皿を平衡化させます。次に、卵子を周辺部の水滴に注入します。

---

#### 0日目: 顕微授精

ホスト: 顕微授精の手順は、ホールディングピペットを使って卵子を保持し、インジェクションピペットを使って卵子の細胞質に精子を注入することで行います。個々のラボによって顕微鏡および注入装置のタイプが異なることがあります。

ラボ情報担当者: ラボの手順に従ってホールディングピペットとインジェクションピペットを設定し、正しい位置に来るようにします。注入する精子を同定したら、インジェクションピペットと垂直に泳ぐところで精子の尾を捕まえます。

精子の尾を先にしてピペット内に入れます。精子がバレル内で自由に動けることを確認します。

培養の水滴の1つに1個の卵子が見えるように顕微鏡のステージを調整します。ホールディングピペットで陰圧をかけて卵子を固定します。極体を12時または6時のいずれかに位置するように卵子を固定することが重要です。次に、マイクロインジェクションピペットを透明帯に通し、卵細胞膜を通して3時の位置で細胞質内まで押し込みます。

卵細胞膜は非常に高い弾性をもつため、ピペットの先端が卵細胞膜を貫通せずに反対側の透明帯の内側部分に達することがあります。その結果、精子が注入される前に一部の細胞質をインジェクションピペットに吸引することが必要になります。

卵細胞膜を貫通したら、精子を注入すると共に細胞質のすべてを卵子に戻します。

精子が注入されたら、インジェクションピペットをゆっくり抜去します。陰圧をゆるめて卵子を離します。

皿内のすべての卵子に精子が注入されるまでこの手順を繰り返します。注入後、卵子を洗浄して、前もって平衡化されたクリベージ培地で16時間から18時間インキュベーションします。

---

#### 0日目: 媒精

ホスト: 古典的な体外受精では、卵丘卵子複合体は調整された濃度の精子細胞を添加することで受精させます。この濃度は通常、約100,000/mlです。理想的には、媒精は制御された環境のチェンバー内で行われるべきです。それが利用できない場合は、解剖顕微鏡の加熱ステージを使用してください。

ラボ情報担当者: 2~3個の卵丘卵子複合体が入った各ウェルに、調整された濃度の精子をできるだけ少量だけ加えます。解剖顕微鏡上のウェルを暗視野下で観察し、運動性の精子が存在することを確認します。次に、媒精後16時間から18時間の受精確認まで皿をインキュベータに戻します。短時間媒精法を使用する場合は、精子と卵子を2時間インキュベーションした後、卵子を取り除いて新しい培養培地に入れます。

---

#### 1日目 前核の観察

ホスト: 媒精の18時間後に、残りの卵丘細胞が受精卵から除かれているかどうかを見るために前核を確認します。

顕微授精の場合も前核を観察します。すでに剥離されているため、卵丘細胞を除去する必要はありません。

ラボ情報担当者: 媒精の16時間から20時間後に体外媒精された胚が受精されているかどうかを確認します。Cook Flexipetを使って、すべての卵丘の残渣を取り除きます。

顕微授精された受精卵での受精は、注入後14時間から18時間で観察することができます。解剖顕微鏡の最大倍率(約40倍)下で、Flexipetを使って受精卵を回転させます。受精卵の前核の数、極体、全体的な形態を評価します。2つの前核をもつ卵子だけを受精された卵子として数えます。すべての受精卵を評価し、平衡化されたクリベージ培地内で培養するためそれらを集めます。インキュベーションの前に受精卵が十分に洗浄されていることを確認します。

### 2~5日目 胚の観察

ホスト: ラボによっては、卵子採取後の何日目に胚移植をする日が異なります。通常は2日目、3日目、または5日目です。

2日目の胚観察では、すなわち受精確認の約24時間後または媒精の40時間から48時間後に、胚移植、凍結保存、または継続培養のいずれが適しているか評価します。2日目の胚は通常、2細胞期または4細胞期の間にあります。

ラボ情報担当者: Flexipetを使って胚を回転させ、それを解剖顕微鏡の最大倍率で観察します。卵割球の数と規則性、細胞質の分裂、卵割速度に基づいて胚を評価します。

ホスト: 3日目、すなわち媒精後66時間から74時間後に、胚移植、凍結保存、または5日目や6日目までの継続培養のいずれが適しているかを評価します。

ラボ情報担当者: 3日目の胚を評価するには、胚の入った皿を解剖顕微鏡の加熱ステージ上に置き、胚が更に卵割しているかを確認します。Flexipetを使って胚を回転させ、それを最大倍率で観察します。もう一度、卵割球の数と規則性、細胞質の卵割の程度、卵割速度に基づいて胚を評価します。胚は6細胞期から8細胞期の発生段階にあるはずで、3日目の朝に、継続培養する胚を平衡化したブラストシスト培地に移します。

ホスト: 48時間後の継続培養では、ブラストシスト培地内の胚はインキュベータ内に残します。

ラボ情報担当者: 胚移植には、数の細胞を含み、明確に形成された内部細胞集団をもつ胚盤胞を選択します。生理的なpHと温度を維持しながら、倒立顕微鏡でその胚盤胞を評価します。

2～5日目

胚移植用カテーテル

ホスト: 科学者と臨床医は胚発生と妊娠率の間の食い違いに惑うことがよくあります。外傷を最小限にして、胚を母の子宮の正しい位置に戻すことが重要です。残念ながら、十分に形成されている胚が必ずしも母の子宮内で正しく移植されるとは限りません。1つの理由は胚移植の技術にあるかも知れません。子宮収縮や移植用カテーテルの先端部の血液と粘膜などの問題によって、子宮内への胚の移植が困難になり、最悪の場合は失敗に終わることがあります。

Cookは、この重要な手順が簡単かつ非外傷性で、繰り返し実施できるような、精巧に作製された胚移植用カテーテルの一系列を提供しています。

まず、Cook Sydney体外受精用カテーテルを見てみましょう。前もって湾曲されたバルブチップをもつグライディング同軸カテーテルは、子宮頸部を容易に通過します。また、カテーテルは柔らかく柔軟性があるため、子宮内膜への傷害を防止します。その他のCook移植用カテーテルと同様に、Sydney体外受精用カテーテルにはMicrovol技術が組み込まれており、最小限の培地容量で胚を移植することを可能にします。液体量が少ないため、移植中に置かれた場所から胚が移動する可能性が減少します。

Cookでは、アクセスと胚の移植に関する個々の臨床医およびラボの希望に合うように、移植用カテーテルを製造しています。オプションには、湾曲型またはストレート型の先端部、EchoTip、可鍛性または硬性のオブチュレーター、遠位端または近位端のマーキング、Microvol技術の有無、テフロン製またはポリエチレン製のガイドカテーテル等があります。

Soft-Pass胚移植カテーテルは、Sydney体外受精用カテーテルと同様に柔らかく柔軟性のある設計ですが、そのカテーテルは先端部がストレート型であり、またMicrovol技術が組み込まれています。Soft-Passにはまた、超音波ガイド下での移植でEchoTipの更なる有利性があります。移植手順中にSoft-Passカテーテルの先端部に組み込まれた金属バンドが超音波下で先端部を強調させ、臨床医が子宮腔内での正しい留置を視認するのに役立ちます。Soft-Passにはオプシ

ンのステンレス製サポート用カニューレがあり、それがカテーテルの位置付けにさらに役立ちます。

使用するカテーテルにかかわらず、胚移植の手順は胚発生のすべての段階で基本的に同じです。唯一の差は、使用する杯移植培地です。2日目と3日目の段階の胚は、クリベージ培地で移植します。5日目の胚はブラストシスト培地で移植します。

---

## 2～5日目 胚移植

ラボ情報担当者: 移植用の胚は、その形態と発生速度に基づいて選択します。胚の培養培地が移植に最も適した培地になります。Cookの2ピース式非毒性1.0 mlシリンジをリンスして満たします。

シリンジを移植用カテーテルに取り付けます。50マイクロリットルの培地を残してすべての培地をカテーテルを通して排除します。制御された環境チェンバー内で作業しながら、2マイクロリットルの空気を吸引し、次に2マイクロリットルの培地、続けてすぐに更に5マイクロリットルの培地中の胚を吸引します。最後にもう一度2マイクロリットルの空気を吸引します。インナーカテーテルをアウターカテーテル内に引き戻し、子宮頸部に挿入する臨床医にカテーテルを渡します。

臨床情報担当者: アウターカテーテル内のインナーカテーテルを子宮腔まで到達させます。プランジャーを10マイクロリットル分だけ押し、胚をゆっくりと放出します。その後で、注意してカテーテルを抜去します。インナーカテーテルをフラッシュした後、点検して胚が放出されたことを確認します。

超音波を使用して、移植前に子宮の位置を確認し、また移植後には2つの気泡間にある胚の位置を決定することもできます。子宮頸管からの通過が困難な場合は、バルブチップが内子宮口を通りやすくさせるためオブチュレーターを使用します。

---

2～5日目

胚と胚盤胞の凍結保存

ホスト: 胚と胚盤胞は、発生の卵割段階または胚盤胞段階で、凍結保存キットを使用して凍結できます。これらのキットは、細胞を正しく脱水させるのに使用される凍結保護剤のタイプが異なるだけです。卵割段階の胚の場合は、プロパンジオール/シヨ糖が選択すべき凍結保護剤です。胚盤胞については、Cookはグリセロール/シヨ糖溶液を提供しています。

患者が凍結胚の取り替え周期のために戻ってくる場合は、移植の日に胚または胚盤胞を解凍することができます。培養に解凍する胚を希望する患者の場合は、必要な日の1日前に凍結胚を解凍して発生の可能性を評価します。胚を3日目まで培養する場合は、一晩のインキュベーションのために同じ培地に入れたままにするか、または平衡化した新しいクリベージ培地に移すことも可能です。

凍結保存方法を成功させるためには、胚への氷結晶形成、溶液効果、そして浸透圧ショックの影響を最小限にする必要があります。現在、余分の胚を凍結保存するための2つの一般的な方法があります。従来の方法は、胚とその周辺の溶液を保存温度までゆっくりと冷却し、胚から離れた部分での氷結晶形成を故意に誘導します。

胚の凍結保存に関するより最近の方法はガラス化法です。

ラボ情報担当者: ガラス化法では高濃度の凍結保護剤を使用します。この場合はDMSO、エチレングリコール、トレハロースであり、それらは非常に急速な冷却速度を可能にします。急速冷却は、溶液を氷結晶構造の無いガラス様の非結晶質の固体に変換します。その結果として、胚の内部またはその周囲にも氷の結晶が形成されなくなります。

## 結論

ホスト: Cookの生殖補助の統合システムについて学ばれたことが役立つものと期待しております。当社の装置についてご質問がありましたらご連絡ください。当社のウェブサイトの他の部分をまだ閲覧されていない場合は、ぜひそちらもご覧ください。当社のKnowledge Center（知識センター）内のリソースにアクセスしたり、最新のニュースや出来事について確認したり、さらにフォーラムやライブチャットに参加したり、女性の健康に関するCookのオンラインカタログのすべてを閲覧することができます。また、ツアーのどのセクションもご自由に再訪問してください。

ありがとうございました。