

「胚の AHA 法：バイオカット法」

第 13 回日本臨床エンブリオロジスト学会 実技書より

【はじめに】

胚の透明帯脱出を助けるアシストハッチングには、いくつかの方法が臨床応用されている。ここで紹介する方法は、フェザー社の Bio-Cut Blade[®]というステンレス製の小型ナイフを用いて、透明帯の一部に切り込みを入れる手技で、透明帯を広く切開きたいときに適している。また、コンパクションを起こす前の胚は、割球が飛び出してしまう可能性高いので、桑実胚や胚盤胞が実施対象となる。

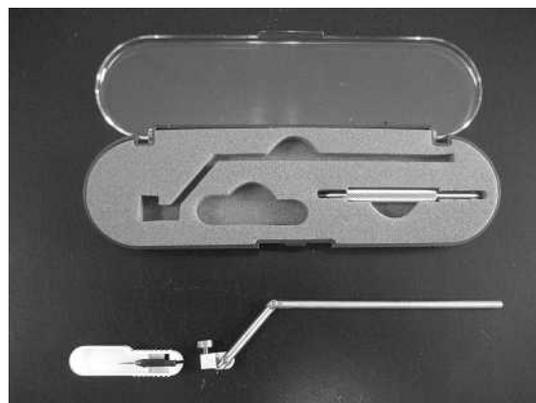
【適応】

アシストハッチングを施行する適応基準は、施設により様々だと思われるが一般的に下記の様な事項が挙げられる。

- 1) 反復不成功例
- 2) 高年齢
- 3) 透明帯が厚い、透明帯の色が茶褐色
- 4) 凍結融解胚

【器具】

- ・ Bio-Cut Blade[®]用ホルダー(フェザー社)
- ・ Bio-Cut Blade[®] 替刃(フェザー社)
- ・ Dish (Falcon1007)
- ・ その他、ICSI ができる機器、備品があれば OK



【試薬】

- ・ Sucrose (和光純薬 : 196-00015)
- ・ HEPES-HFF99 培養液 (扶桑薬品工業)
(アルブミン不含の hepes 含有培養液であればなんでもよい。)
- ・ ミネラルオイル (扶桑薬品工業)

【試薬の準備】

0.2M Sucrose 溶液

Sucrose を 0.6846g 電子天秤等で軽量し、HEPES-HFF99 培養液で 10ml にメスアップする。

(注 : 血清やアルブミンは加えない。よって血清入りの培養液は使えない。)

0.2 μm フィルターでろ過滅菌後、冷蔵保存しておく。

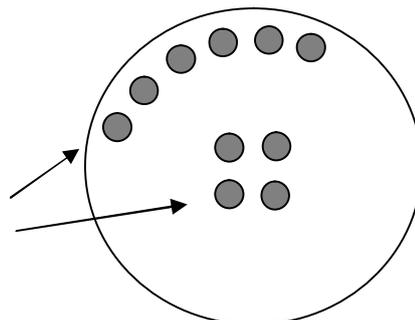
注 : 困卵腔が広い桑実胚や凍結融解直後の困卵腔が広い胚盤胞では、Sucrose 溶液を使用す

る必要は無い。通常の HEPES-HFF99 培養液のみで OK。

【アシストハチングの準備】

ディッシュ

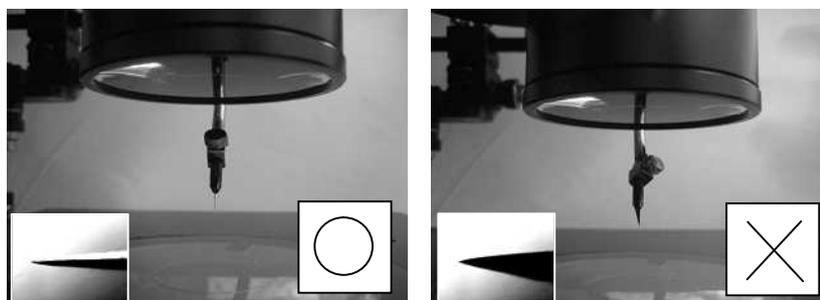
0.2M Sucrose HEPES-HFF99 溶液



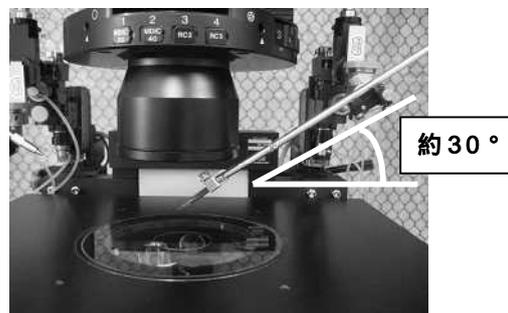
ディッシュ (Falcon1007) フタに 0.2M Sucrose HEPES-HFF99 培養液の 30 μ l ほどのドロップを外周と中心付近に適当個数作成し、ミネラルオイルを被せてホットプレート上で加温しておく。

Bio-Cut Blade[®]ホルダー装着

1. Bio-Cut Blade[®]ホルダーに Bio-Cut Blade[®] (刃) を取り付ける。
2. マニピレーターにホルダーを装着して横から除いて、刃がステージと垂直になるよう回してセットする。



3. 実施者によって好みがあると思うが、ホルダーをまっすぐに固定して、約 30° の角度にセットする。(ICSI の時と同じセッティングで OK。)

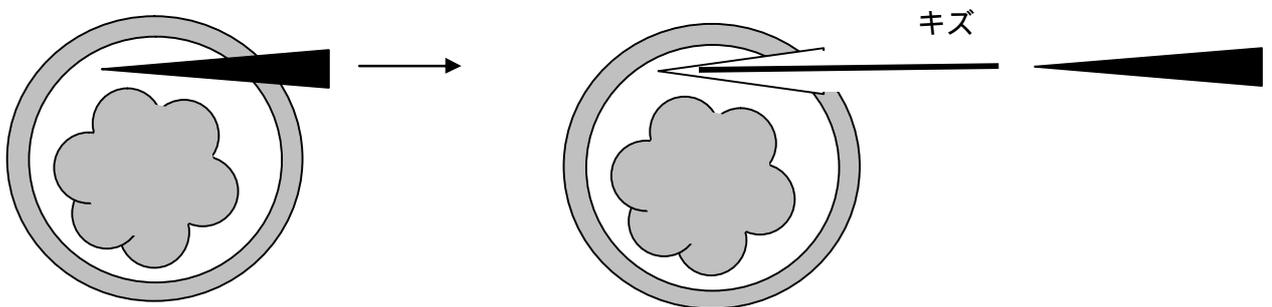


4. 清潔なプラスチックディッシュをステージにのせ、刃を下ろしてきてディッシュ底面にあててキズを付けてみて、キズの付く位置や範囲で角度を確認、再調整する。(刃先の部分でディッシュにキズが付くようにする)



【アシストハッチングの手順】

1. アシストハッチングを行う胚を 0.2M Sucrose H-HFF 培養液のドロップを移動しながら洗浄していく。このときアルブミンが除去される必要があるため、細めのガラスピペットを使用し、いくつかのドロップを使いよく洗浄する。（すばやくピペット移動しないとその場で、ディッシュに張り付いてしまう）
2. 顕微鏡ステージにディッシュを乗せて、胚の囲卵腔が広い位置やフラグメンテーションが多い位置を 12 時もしくは 6 時の位置にディッシュを回転させて位置調整する。
3. ブレードを下降させ、胚の無い位置でディッシュに一度キズを付けて確認する。
4. ブレードを胚よりも上昇させ、囲卵腔部分にもっていき、刃先がディッシュにぶつかるまで下降させる。（刃をほんの少し前後に動かして抵抗なく動く時はまだディッシュにぶつかっていない。）
5. ディッシュ底面に刃先がぶつかったら、刃を右に引いて、透明帯を切る。ディッシュ底面に線（キズ）が入ったことを確認することで、キチンと切れたか判断できる。



6. 刃の腹面を使って透明帯を切った方向から胚を押し、ディッシュから胚を剥がす。
7. 実体顕微鏡にディッシュを移動し、予め準備しておいた追加培養用の培養液をピペットで胚に強く吹きかけて、胚をディッシュ底面から剥がす。剥がれない場合は慎重にピペットで胚を突いて剥がす。
（胚がディッシュに張り付いて、取り辛いことがこのバイオカット法のデメリットである。操作メEDIUMに少量のアルブミンを入れると、胚が適度に張り付く場合があるので、いろいろな濃度を試してみてください。）
8. 追加培養用の培養液で胚をよく洗浄後、追加培養する。