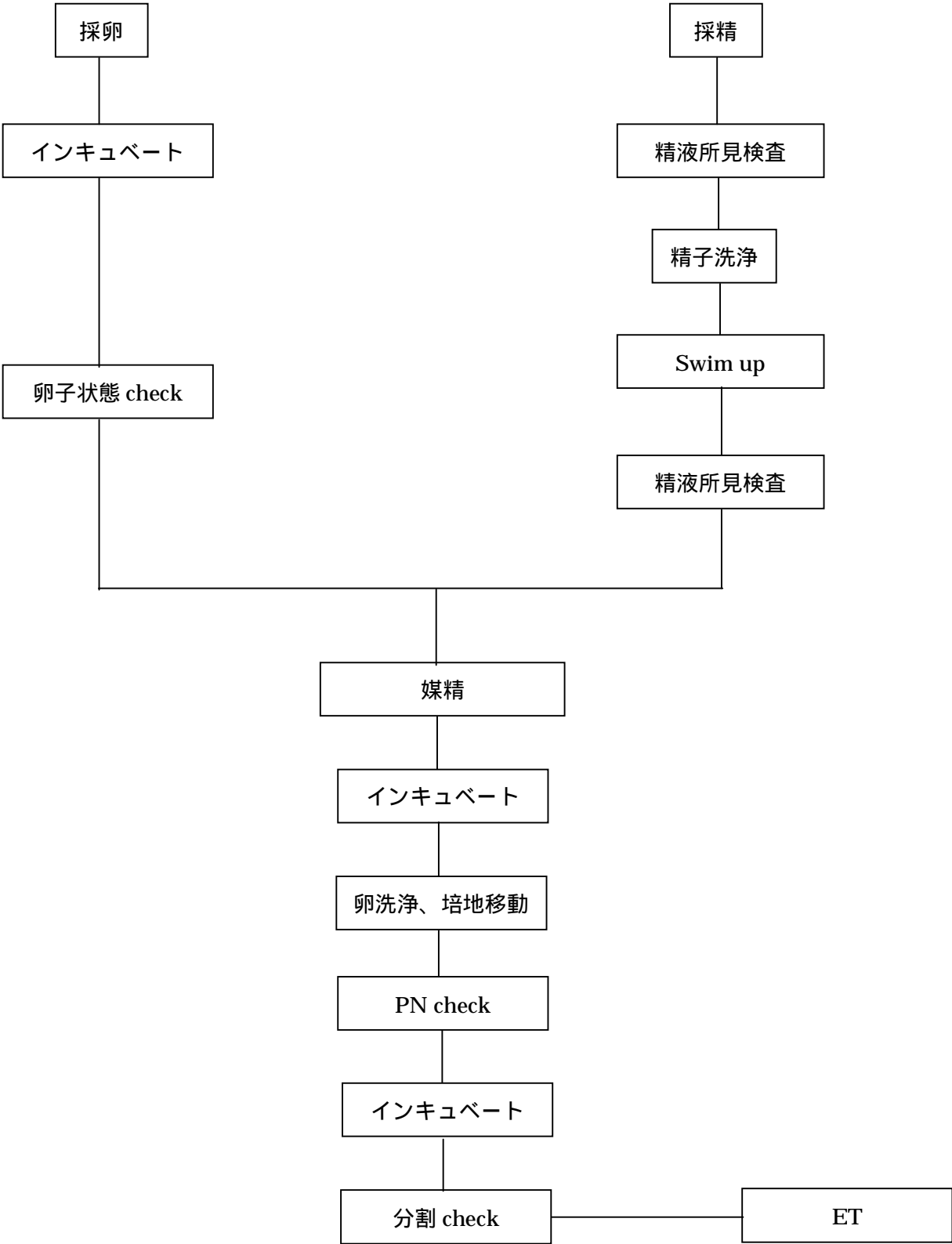


# IVF の手順

## フローチャート



## IVF の手順

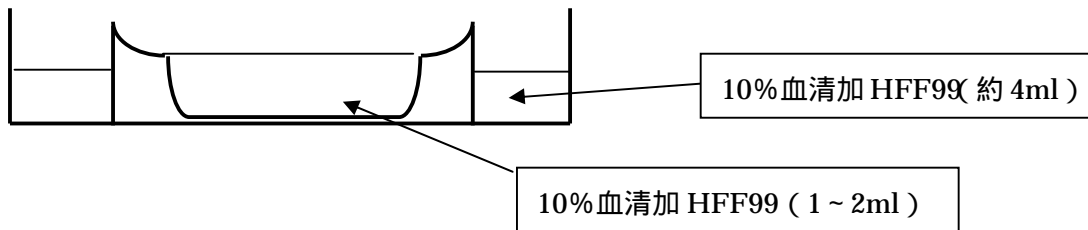
### 1) 採卵前日の準備

使用する予想必要量を計算し、HFF99(我々は扶桑薬品の製品を用いているが、炭酸 重炭酸緩衝系で炭酸ガスにより pH が調節される培養液であればどここの製品でも可)に血清を 10% 加えて、0.2 μm フィルターにてろ過滅菌し、チューブに小分けする。

採卵後に前培養するためのディッシュを準備する。

上記 10%血清加 HFF99 を 2 重ディッシュ (Falcon 3037) の内側に 1~2ml 入れ、外側にも適当量(約 4ml) 入れる。(間違わないように全てのディッシュの蓋に患者の識別を記入する)。

このディッシュを採卵数 5~8 個位に 1 ディッシュずつ用意する。



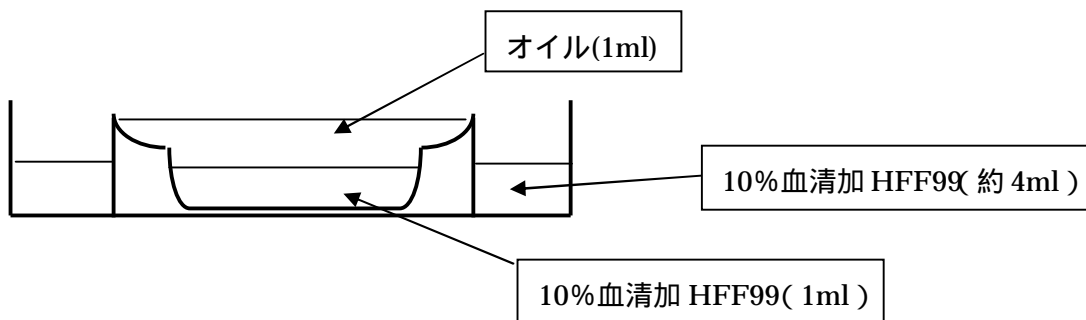
上記ディッシュ と残った培養液は、CO<sub>2</sub> インキュベーターにてガス平衡させておく。

媒精用のディッシュを準備する。

10%血清加 HFF99 を 2 重ディッシュ (Falcon 3037) の内側に 1ml 入れ、外側にも適当量入れる。内側にのみオイルでカバーする。スポイトが使いやすい(Falcon 7575)。

(間違わないように全てのディッシュの蓋に患者の識別を記入する。)

1 個のディッシュに採卵数 5~8 個位を入れるつもりで用意する。



Hepes-HFF99 も必要量を計算し、血清を 10% 加えて、0.2 μm フィルターにてろ過滅菌し、チューブに小分けしておく。

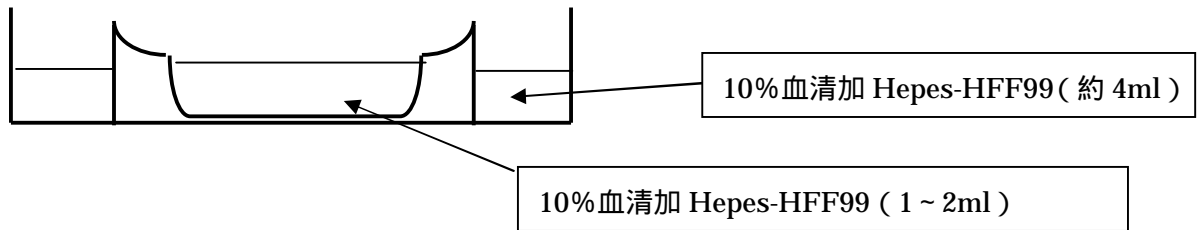
上記 10%血清加 Hepes-HFF99 は、冷蔵庫で保管しておき、採卵当日朝に温める。当日温める時間がなければ、前日から CO<sub>2</sub> ガスのない環境で温めておく。

明日の採卵、媒精等で必要なものについて点検をする。

### 2) 採卵当日準備

採卵から検鏡までに時間がかかると予想される場合は、血液の凝固を避ける為、ヘパリンを 2IU/ml 濃度になるように、準備しておいた採卵用メEDIUMに入れる(採卵後速やかにエンブリオロジストが検鏡するのであればヘパリンは必ずしも必要ない)。メEDIUMは 37 に加温しておく。

採卵直前に前日準備した 10%血清加 HEPES-HFF99 をパスツールピペットで 2 重ディッシュ (Falcon 3037) の内側に 1~2ml、外側に適当量(約 4ml)入れる。ディッシュはヒータープレートに乗せて加温しておく。

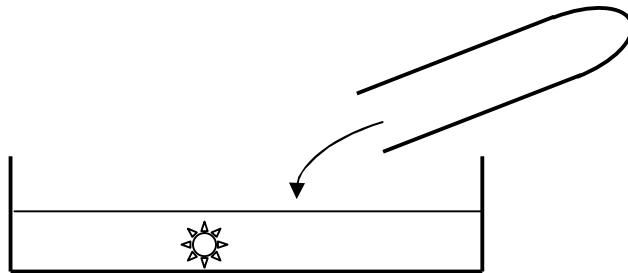


その他必要な器具をすべて準備しておく。

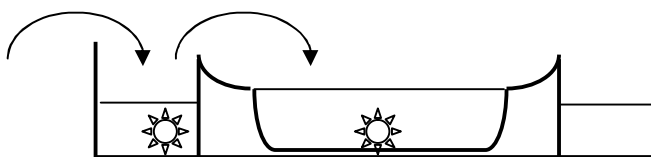
### 3) 採卵、検鏡と前培養

採取してきた注射器または試験管に入った卵胞液を空のディッシュ (Falcon 1007 など) に入れ、実体顕微鏡下で卵子を探す。

まず、実体顕微鏡のランプにかざし、肉眼でそれらしき塊を探す。ついで顕微鏡レンズを通してきちんと探す。



卵子は準備しておいた 10%血清加 HEPES-HFF99 を入れた 2 重ディッシュの外側でパスツールピペットを用いて数回出し入れして良く洗浄し、内側に移動して集める。



卵子がある程度、集まった段階で前日準備した前培養用の 2 重ディッシュの外側で同じく洗浄してから、内側の培養液に移動する。

CO<sub>2</sub> インキュベーターにて前培養する。(通常、媒精までは数時間の前培養を行なっている。)

#### 4) 精子処理

採精した精液は、精液所見を検査する。

Percoll、PureCeption などを用いて遠心沈殿後培養液で洗浄する。出来るだけクリーンな精子を回収できるように心がける。

(乏精子症の精液や粘性の高い精液はプロメリンによる処理が有効である。)

洗浄、Swim up 処理後の精子数をカウントする。

#### 5) 媒精 (媒精日 : D0)

カウントした精子数をもとに、媒精のために精液をどの位加えればよいか計算しておく。

(媒精濃度は各クリニックや症例によりさまざまであるが、大体 5 万 ~ 30 万個/ml の精子を媒精している)

例 : 目標媒精濃度 :  $0.3 \times 10^6 / \text{ml}$ 、カウント精子数 :  $30 \times 10^6 / \text{ml}$  の場合

媒精培地 1 ml には精液を 10  $\mu\text{l}$  加えればよいことになる。

卵子を前培養用のディッシュから、準備しておいた媒精用のディッシュに移動する。1 つのディッシュに卵子は 3 ~ 7 個入れる。

計算しておいた量の精子をマイクロピペットで測り、そのまま培養液に入れて媒精する。

CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 1 晩培養させる。

(媒精 2 ~ 3 時間で卵を洗浄し、別の新しい培養液に移して培養を継続する方が良いとの文献もある。)

#### 6) 明日の準備

採卵前日と同様に 10% 血清加 HFF99 の 2 重ディッシュをつくり、CO<sub>2</sub> インキュベーターにてガス平衡しておく (洗浄用)。

40 ~ 50  $\mu\text{l}$  の 10% 血清加 HFF99 のドロップを卵の数 + 1 個ディッシュにつくり、オイルでカバーし、CO<sub>2</sub> インキュベーターにてガス平衡しておく (培養用)。

#### 7) PN Check (媒精翌日 : D1)

卵丘細胞除去用のパストツールピペットを作る。(違った先端内径のものをいくつか作っておく)

昨日媒精していたディッシュより卵を取り出し、作製したパストツールピペットで Pumping により卵丘細胞や付着した精子を除去する (実体顕微鏡下で行う)

昨日準備しておいた 2 重ディッシュで卵を洗浄し、培養用のドロップに移動する。

2PN や第 2 極体の有無を顕微鏡にて観察し受精の確認をする。

CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養継続する。

#### 8) 分割 Check (D2 ~)

分割の様子など胚の発育状況を観察、記録する。

**9) ET 前日の準備**

ET 用の培養液を準備する。(HFF99 に血清を 10 ~ 30% 加えて、0.2  $\mu$ m フィルターにてろ過滅菌し分注し、インキュベーターでガス平衡) 中央、1 ~ 1.5 ml (中央の培養液にはオイルをかけない)、外に約 4 ml。

ET カテーテルをはじめ、明日の準備が O.K が否か確認する。

10) 移植 (媒精から2日目で移植するとき D2、胚盤胞移植のときは通常 D5)

必要器具の準備、温度、Clean Bench の清掃など

10%血清加 HFF99 を2重ディッシュに分注して、インキュベーターへ戻す。中央、1~1.5 ml (中央の培養液には オイルをかけない)、外に約 4 ml。

胚移動用のパスツールピペットを作製する。

培養していた胚を検鏡し、ET する良好胚を決定する。


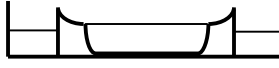

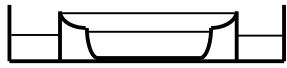
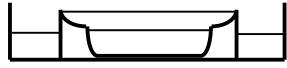

用意した2重ディッシュにET する胚を移動する。


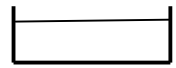
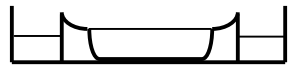
再度このディッシュをインキュベーターに戻しておく。

各施設で使用している ET カテーテルの使用法に従って ET を行なう。

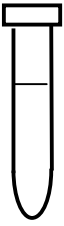
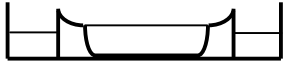
付録：培養液準備

HFF 10%SSS

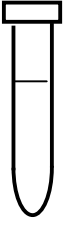
採卵前日準備	採卵当日 (D0)	(D1)
10ml ( / 卵 5 個位) 	採卵した卵ストック用  精子洗浄用 	
	媒精用  媒精後卵洗浄用	
	 ドロップ 卵数 + 個 胚培養用	

ET 前日準備	ET 当日 (D2 or D3)
10 ~ 15ml 	 ET カテーテル洗浄用  ET 時胚ローディング用

Hepes-HFF 10%SSS

採卵前日準備	採卵当日 (D0)
<p>10ml</p> 	 <p>採卵時卵ストックに使用</p>

Hepes-HFF 小分け (生理食塩水を使用している施設もある)

採卵前日準備	採卵当日 (D0)
<p>10ml x _____ 本 (採卵できそうな卵数による。先生と相談。)</p> 	<p>採卵時使用</p>