

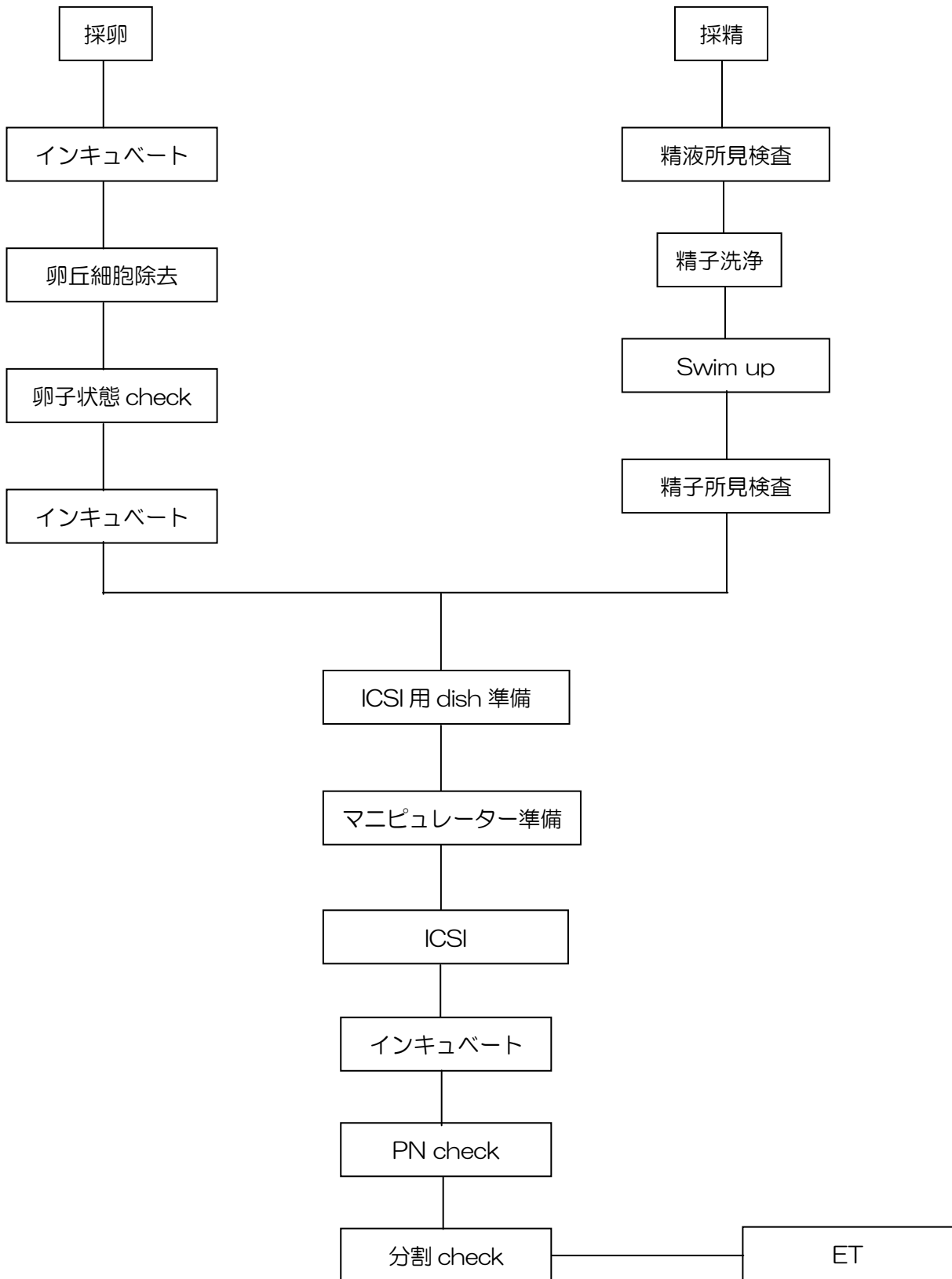
# ICSI

## 目次

	Page
ICSI フローチャート	1
精子処理	2
精子の確認	2
マニピュレーター準備	2
パスツールピペットの引き伸ばし	2
ピペット作製手順	3
卵丘細胞の除去	3
ICSI 用ディッシュの準備	4
ホールディングピペットの装着	4
インジェクションピペットの装着	5
ICSI 前の確認	6
ICSI	6
トラブルシューティング	8
ICSI 準備品一覧 (例)	9

高度生殖医療技術研究所 (ARMT)  
〒371-0105  
群馬県前橋市富士見町石井 909-21  
TEL : 027-230-5411  
FAX : 027-230-5412  
e-mail : yaaraki@nifty.com

# ICSI フローチャート

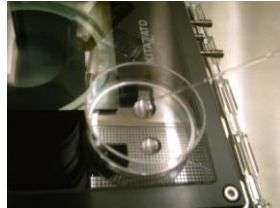


## 精子処理

精子処理は、Percoll などにより精子分離した後、Swim up 法などにより、なるべく綺麗な精子浮遊液を作製することが望ましい。方法については他の教科書などを参照。

## 精子の確認

Swim up した精子は、9 インチパスツールピペットにシリコン球を装填したものが、回収しやすい。なるべく上層を 100~200  $\mu$ l ほど静かに吸引し、ディッシュにドロップを作製する。原精液の検査結果から回収精子数が少ないと予測される場合は、更に奥の中間層からも回収し、他のドロップも作製しておく。(上層部と中層部の区別ができるように、ディッシュ裏面から印を付けておくといよい。)

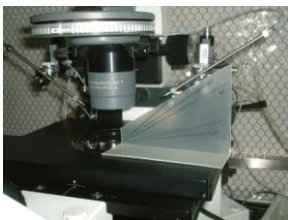


精子浮遊液のドロップは実体顕微鏡、確認できない場合は倒立顕微鏡を用いて、ICSI に使用できるだけの精子数が回収されているか確認しておく。精子数が非常に少ない場合は、更に下層部から回収して、確認する。

ICSI ができると判断できたら、インキュベーターに一時保管しておく。

## マニピュレーターの準備

マニピュレーターの基本的なセッティングは、本番であわてないように事前に済ませておく。左右の可動部分は中間付近にセットしておく(上昇可動部はぶつからない程度に上端にしておく)。



ピペットを装着するホルダーの角度は、ステージに対してホールディング側が 30°、インジェクション側は 30° 強にしておく。(分度器や三角定規で測定して角度を書いたプレートなどを準備しておくとう便利。)

おく。

また、インジェクターラインにオイルを使用している場合は、チューブ内やシリンジ部分に大きな気泡が無いこと、シリンジ内のオイルがなくなりそうでないことを確認して

## パスツールピペットの引き伸ばし

パスツールピペットの先端径は大まかに分けて大、中、小の3種類を作大: 卵子-卵丘細胞複合体の大きな塊から、卵部分を分離するために使用。

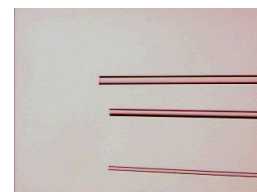
500  $\mu$ m)

中: 卵子周辺についている卵丘細胞を少しずつはがしていくため、また

するために使用。(直径約 300~400  $\mu$ m) 数本作製し、ものから並べておく。

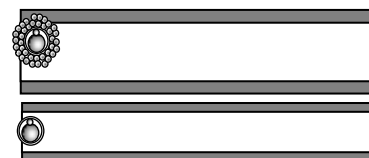
小: 卵子の透明帯に付着している1~2層の卵丘細胞を綺麗に使用。(直径約 120~200  $\mu$ m、卵子がぎりぎり入る内い。)

実際に操作していて、絶妙! なパスツールができたときは、使ールで管内外を洗浄して保管しておき、次回からの内径見本に



製する。  
(直径約

は卵を移動  
径の大きい



はがすため  
径が望まし



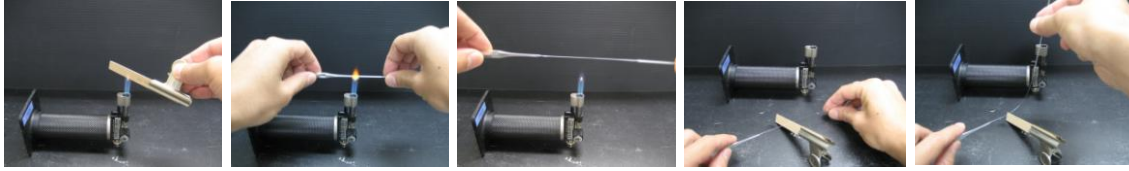
用後エタノ  
すると良い。

## ピペット作製手順

アンプルカッターや砥石を使用する場合は、ピペットの触れる範囲をよく火炎滅菌しておく。

パスツールピペットをバーナー（アルコールランプなど）の炎上部であぶり、左右の手をすこし動かして、軟らかくなったら炎の外に出し、すばやく引っ張る。

（熱する炎の位置や、炎の外に出してから引っ張るタイミングなどで、ピペット先端径を調整。炎からだしてからゆっくり引くと太く、すばやく引くと細くなる。炎内でほんの少し引いてから外に出して引いても細くなる。）

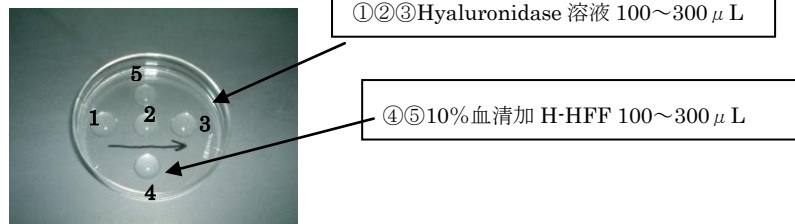


アンプルカッターや砥石で折りたい箇所に傷をつけ、傷の部分が頂点になるよう、反対側にしならせて先端を折りきる。綺麗な先端になる場合は折れる瞬間の音が比較的小さい。

## 卵丘細胞の除去

Hyaluronidase 溶液（60～80 IU/ml）と 10%血清加 HEPES-HFF のドロップをディッシュに作製する。例えば下写真のように。卵の数が多くて卵丘細胞を剥がすのに時間がかかる場合はオイルを掛ける方が望ましい。

間違わないように裏にマジックで矢印など書いておく。

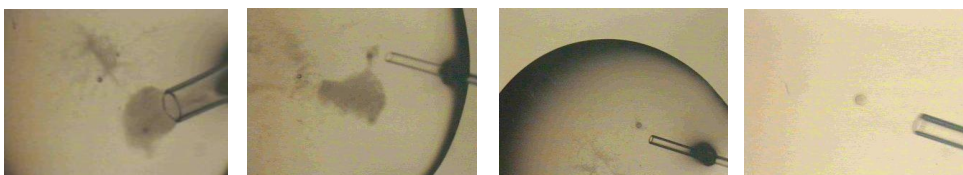


卵丘細胞のついた卵子をシリコン球付きパスツールで1のドロップへ移動し、ピペッティングにより卵丘細胞の結合をやわらかくする。

太い先端のパスツールピペットで卵子部分を固まりから引きちぎり、2のドロップへ移動する。

マウスピースにつけた中間径のパスツールピペットで、ピペッティングにより卵丘細胞をはずしていく。このとき太い径のものから順次細いものに付け替えながらはがしていく。

最後は3のドロップに移動し、先端の細いパスツールピペットを使って、卵丘細胞を ICSI の邪魔にならない程度まではずす。卵子に損傷を与えるほど細い直径のピペットの場合は中に吸い込まず、ついばむ様にはがしていく。



卵丘細胞がとれた卵子を、4～5で洗浄する。

Hyaluronidase の浸漬時間が長くなるようなら、HEPES バッファーへ移動して剥がしたりもする。

10%血清加 HFF に移動して、インキュベーター内で ICSI まで培養する。

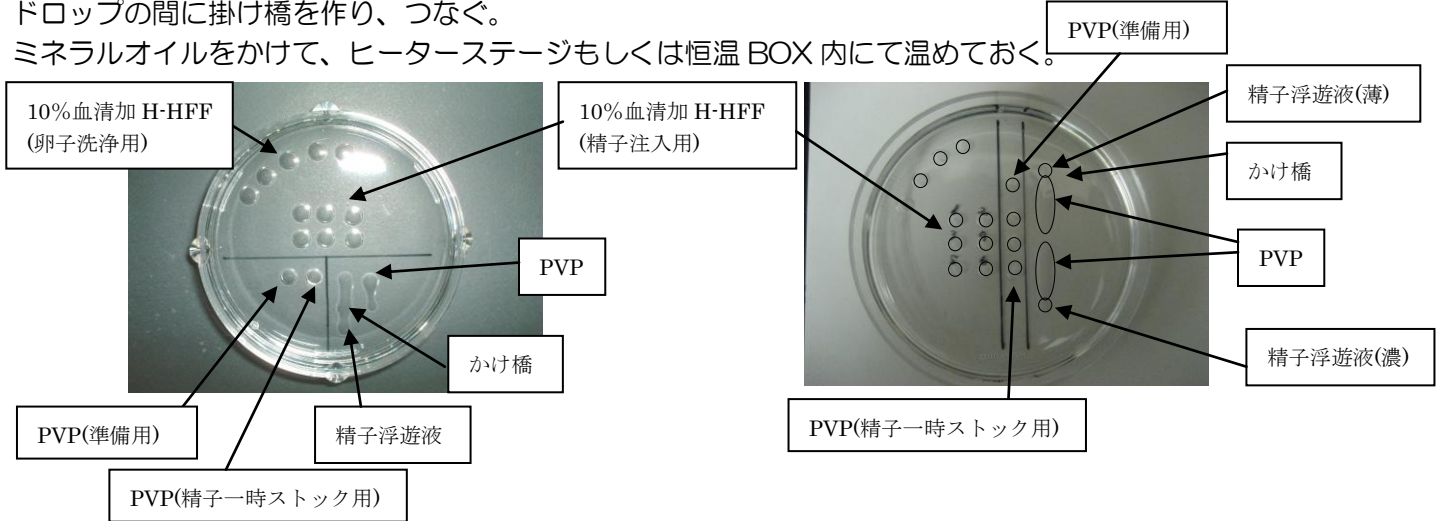
## ICSI用ディッシュの準備

ICSI用ディッシュ (Falcon 1006) に 5~10%PVP, swim up した精子浮遊液, 10%血清加 HEPES-HFF のドロップを 7~10 $\mu$ l ずつ作成。精子数が極端に少ない場合は仕方ないが、精子液と混ぜる PVP の量は多く、精子浮遊液は少なくしたほうが、精子の吸引操作が容易になる。

ドロップを作製する順番は、PVP→精子液→培養液が望ましい。

レイアウトは各自のやりやすい方法でよいが、例えば右図のように。チップなどの先端で、精子ドロップと PVP ドロップの間に掛け橋を作り、つなぐ。

ミネラルオイルをかけて、ヒーターステージもしくは恒温 BOX 内にて温めておく。



## ホールディングピペットの装着

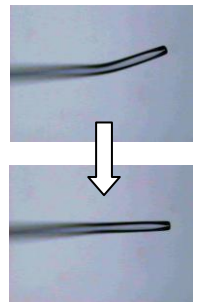
私達は、チューブ内がエアラインのインジェクター (IM-9C : Narishige) を使用している。

インジェクターのダイヤルメモリを中間付近にあわせておく。

ホルダーの先端を緩めてホールディングピペットを差込、しっかりネジを締め、ピペットを手で動かしてみても簡単に抜けないかどうか確認する。動く場合はホルダー内のシリコンパッキンが磨耗している可能性あり。

ホルダーをマニピュレーターに装填して、目視で大体の位置を合わせる。

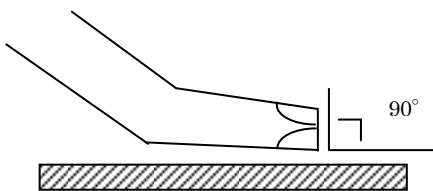
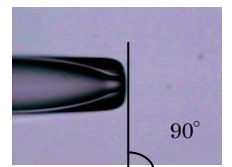
まずは顕微鏡の低倍率でホルダーを回して、角度を合わせる。



倍率を実際に ICSI するときまで上げて、先端の角度や向きを微調整する。

ホールディングは顕微鏡を見た時、先端の面が視野に対して垂直になるように調整する。

ホルダーを回して調整すると、ステージと先端面との角度も変わるので注意が必要なので、できればホルダー調整機構を使用して調整したい。



また、先端の面がステージと垂直になっているのが理想。対物レンズを上昇下降させて先端穴の見え方で確認する。穴が見える場合は、下か上を向いている。(正確にアングルをつけられたピペットであれば、ほとんど調整はいらない。)



## インジェクションピペットの装着

私達は、チューブ内がオイルラインのインジェクター（IM-9B：Narishige）を使用している。

インジェクターシリンジ内にオイルが十分あるのを確認しておく。

ホルダー先端部品をはずし、インジェクターダイヤルを排出側（時計周り）に回してオイルをあふれるほど吐き出させ、管内に入っている気泡を出し切ってしまう。



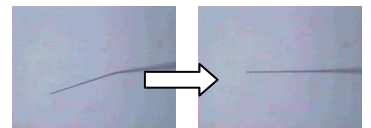
インジェクションピペットをホルダー先端の部品にさしてから、ホルダーに差し込み、しっかりネジを締める。ピペットを手で動かしてみて簡単に抜けないかどうか確認する。動く場合はホルダー内のシリコンパッキングが磨耗している可能性あり。



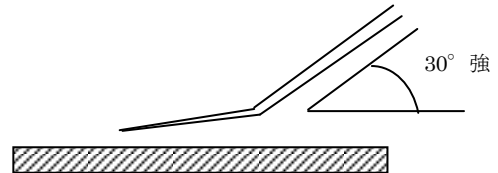
ホルダーをマニピュレーターに装填して、目視で大体の位置を合わせる。

インジェクションの先端が、ステージから上 3~5 mm ぐらいの高さになるまで目視でインジェクションを下降させる。

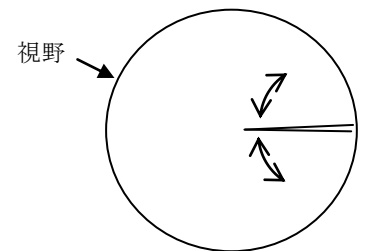
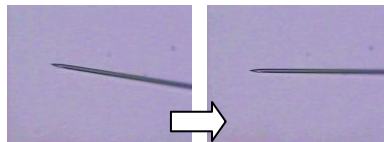
まずは顕微鏡の低倍率でホルダーを回して、ピペットのアングル部分の両側が真直ぐになるよう角度を合わせる。



ステージに対しての角度は、先端が少し下がるくらいが操作しやすい。（アングル 30° のピペットの場合、あらかじめホルダーの Set 角度を 30° 強に設定する。）

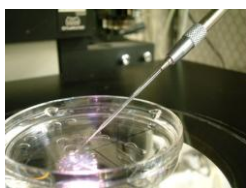
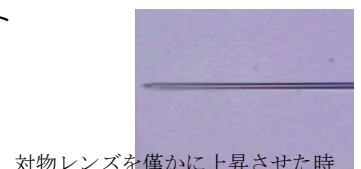
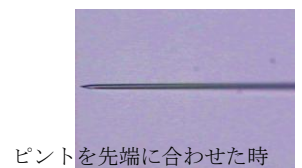


次に、顕微鏡を覗きながらピペットが視野に対して平行になる様に、角度を調整する。ホルダーを回して調整すると、ステージと先端との角度も変わるので注意が必要なので、できればホルダー調整機構を使用して調整したい。



倍率を実際に ICSI するときまで上げて、先端の角度や向きを微調整する。対物レンズを上下に動かして、ピペットの先端が少し下がっていることを確認する。

（インジェクションの先端にピントをあわせて、レンズを上昇させるにつれてインジェクションの先端から右方向にピントがあっていけば OK。）ピペット先端にピントを合わせた時、ピペット先端から右へ卵子の直径ぐらいの長さまでピントが合っていて、そこからぼやけていくような感じが角度調整の目安。



インジェクターで、オイルをピペットの先端から半分～2/3ぐらいのところまで出し、止める。（インジェクターの回転を止めてもしばらくオイルは動くと思うので、様子を見ながら行う。）

このときにインジェクション先端からオイルまでの空気層の量で、インジェクター操作の敏感さが変わる。空気は圧縮されてバネの働きをするため、空気が多ければインジェクターが鈍感になり、少なければ敏感になる。よって、経験により自分のやりやすい空気量を決めておくのがコツである。

## ICSI 前の確認

用意した ICSI 用ディッシュを顕微鏡ステージにのせる。(ピペットの先端にぶつからないよう注意する)

低倍率で顕微鏡を覗いて、PVP ドロップの境界面にピントを合わせる。

インジェクションピペットをオイルに入るまでは目視で、入った後は顕微鏡で確認しながらオイル内に下降させる。

オイルをインジェクションピペット内にある程度吸引する。(ピペット内の PVP が空気に触れて乾燥するのを防ぐ目的でオイルのフタをする為少し多めにすっておいの方が良い。)

インジェクションピペットを PVP のドロップ内に入れて、PVP を吸い込む。

インジェクションピペットのアングル付近まで PVP が入ったら、吸引を止めて PVP とオイルの境界を見ながら管内の動きを止める。



次にディッシュを動かして、精子の入った PVP にピペットを移動し、精子を不動化したり、吸い込んで止めたりして確実にコントロールできることを確認する。精子はなるべく PVP 濃度が高い(精子浮遊液のドロップから離れた)場所から、検索していく。(PVP 濃度の薄い箇所の液をピペット内に入れておくと、吸引排出のコントロールが難しくなってくる。)

インジェクションを上昇させ、ディッシュを取り出す。

## ICSI

パストツールピペットを使用して、卵丘細胞を除去した卵子を ICSI 用ディッシュの HEPES-HFF のドロップに 1 つずつ移動する。(慣れないうちは 1 個ずつ ICSI したほうが良い)

ディッシュを顕微鏡ステージにのせる。

低倍率で顕微鏡を覗いて、精子+PVP ドロップの境界面にピントを合わせる。

インジェクションピペットをオイルに入るまでは目視で、入った後は顕微鏡で確認しながら下降させる(粗動)。

インジェクションピペットを精子+PVP のドロップ内に入れる。

インジェクションピペットにピントが合うまでインジェクションピペットを下降させる。

倍率を上げ、境界面にピントを合わせる。

インジェクションピペットを上昇下降させて、インジェクションピペットにピントを合わせる。

ディッシュの底面を泳いでいて、PVP 濃度の高い部分まで泳いで来ている運動性の良い精子で、形態が良好な精子を探す。(対物×40、接眼×15 を、顕微鏡の倍率上昇させるレバー×1.5 でみると形態が比較的良好わかる。)

精子にピントを合わせ、インジェクションを上昇下降させて(微動)、インジェクションピペットにピントを合わせる。

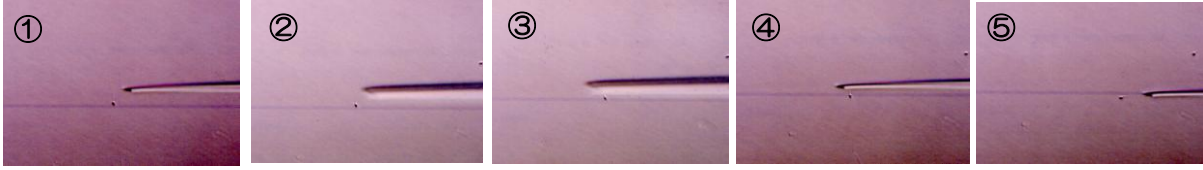
精子を吸引して(ここで不動化しても良い)、左下中央側 PVP ドロップへ移動し、一度排出する。

(吸引するときは、精子が入ってくるまでダイヤルをただ回すのではなく、インジェクターやインジェクションピペット形状や事前に吸い込んだ PVP の状態によっても違うが、20° 位とかひねってしまう。最初ピペット内が平衡状態になっていれば、この状態でしばらくは吸引し続けるので、精子が入ってこないのは、精子とピペット先端穴の位置がずれているからである。ピペットの位置、高さを調整すれば、入ってくるポイントがある。)

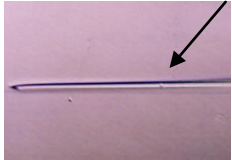
精子の尾部をインジェクション先端でディッシュの底にこすり付け、精子の不動化を行う。(精子尾部に傷をつけることが受精に重要! 少し過剰なくらいこすり付けるほうが良い。)

不動化するときの精子の捕まえ方:

- ①ディッシュ底面を泳いでいる精子にピントをあわせ、ついでインジェクションピペットにピントを合わせる。
- ②インジェクションピペットを精子から離れた位置で少し上昇させる（ピントはぼやける）。
- ③そのまま精子尾部の上部にピペットを移動する。
- ④ピペットを下降させ、ピペットとディッシュ底面の間に精子尾部を挟む。
- ⑤その場でこすり付けるか、ピペットを右に移動して、精子尾部細胞膜に傷をつける。



精子を尾部から吸い込み、適当な位置で止める。



インジェクションを少し浮かせ、ディッシュを動かしてインジェクション先端を卵の入った HEPES-HFF ドロップに移動する。  
 低倍率で顕微鏡を覗き、ステージを移動して、卵を視野中心にもってくる。  
 ホールディングを下降させ、卵の近くにホールディング先端が来るようホールディングを移動する。

倍率を上げ、卵にピントを合わせる。

精子がインジェクション内にとどまっているか確認する。移動していたら倍率を変えたり、インジェクターダイヤルを軽く動かしたりして、探し、適当な位置で精子を止める。（なれない内はここで精子が移動して見失いがちである。ピペット内の精子は PVP ドロップ内で静止していても、メEDIUMのドロップに移動すると抵抗が変わるので移動し始めてしまうことが多い。）

ホールディングを上昇下降させ、ホールディング穴の壁にピントを合わせる

インジェクションで卵を軽くホールディングに押し付けて、卵を吸いかるく固定する。  
 インジェクションで卵を回転させて、極体を 12 時か 6 時の位置に持ってくる。位置が決まったらホールディングで卵をしっかり吸い、きちんと固定する。  
 ホールディングを少し上昇させて、ピントを合わせ直す。



インジェクションの先端をかるく卵に押し当てて、卵の中心に刺さるように、インジェクションを微妙に上昇下降させ高さ位置を調整する。（卵細胞膜のへこみ方で判断する）



良いへこみ方。  
細胞膜がまっすぐへこんでいる。



底のほうに少しずれている。



上のほうに少しずれている。

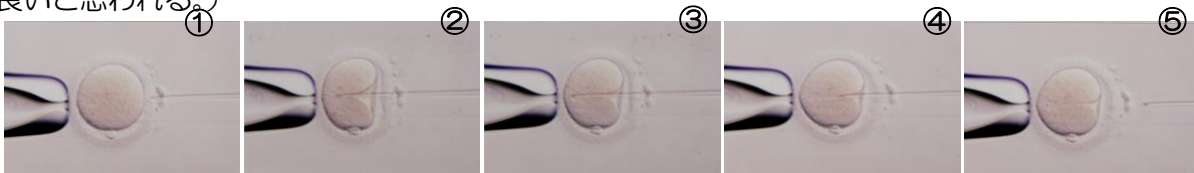


インジェクションを透明帯に押し当てたまま、精子を先端までゆっくり移動してくる ①。(インジェクション先端開口部は透明帯にふさがれて、精子は先端ギリギリで止まる。)

インジェクションを卵に刺し、卵細胞直径の2/3程度まで、深く押し込む ②。

この時点で細胞質が破れる場合もあるが、通常は破れないので、インジェクションを素早く吸引すると、細胞膜がパチッとやぶれて細胞質がピペット内に吸引されるのがわかるので、すぐにダイヤルをもとの位置に戻してピペット内部の吸引を止め、慌てずにゆっくりダイヤルをもどしながらインジェクションをさらに細胞質の奥まで進めて精子頭部を細胞質の中に完全に注入する。

(破く時ゆっくりゆっくり吸引していると細胞膜を多く吸い込んでしまうので、破けた後に吸い込んだ細胞膜が邪魔して精子がうまく卵細胞質内に入れられないことがあるので、細胞膜をたくさん吸い込まずに破くのが良いと思われる。)



破れたかどうか分からなかったときは、軽く吸引をかけてみて、たわんでいる細胞膜が引っ張られたら、まだ破けていない。また、破けているとたわんでいる膜は動かず、細胞質もピペットに抵抗なく入ってくる。精子頭部が細胞質に入ったら、インジェクションを丁寧に引き抜く。この時、精子がインジェクション先端に張り付いてしまう場合もあるので、その場合はインジェクションを奥に戻して精子を入れなおす。また、抜くときに画面下のほうに先端を擦りつける様にして引き抜くと、精子が細胞質に残ってくれることが多い。

ホールディングから卵を離して終了。

次のICSIに取り掛かる。

ICSI終了後、準備しておいた培養ディッシュに卵を移動し、インキュベーターで培養する。



## トラブルシューティング

**動作を間違えて、針を折ったりしてしまう。**

針を折る原因のほとんどは、針を実際に目で見て動かしていない、もしくは、見えていない針の位置が自分の予測と違った場合に起こる。針の位置が分からなくなったら、なるべく低倍率にして探して、現在の位置を把握したうえで、動かすこと。その他、動作を間違えるのはマニピュレーターをいじって、体に覚えこませるのが近道。いちいち考えなくても全ての動作が自然にできるまで、練習すること。

**ホールディングで卵子を保持するとき、微妙な吸ったり吐いたりができない。**

ホールディングピペット内にオイルを少し吸引しておき、先端に入っている培養液量を減らしておくと、微妙な吸引操作ができてよい。

**インジェクションを装填してインジェクターを回したが、内部のオイルがうごかない。もしくは止まらない。**

ライン内のどこかがリークしている可能性がある。チューブに亀裂が入っていないか。ネジ等はキチンとしまっているか。オイルが漏れていないか。全て確認。

**最初は問題なかったが、やっているうちにインジェクションで精子が吸引できなくなる。(インジェクターを回してもピペット内液が動かなくなる)**

最初の準備段階のとき、インジェクションに PVP を吸引する前にオイルを吸引して、オイルの蓋を作り、

PVP と空気が接触しないようにすると翌日まででも固まらない。

### 精子がピペット内で止められなくなる。コントロールがきかなくなる。

インジェクションピペット先端の細い部分中が、PVP ではなく培養液に置換されてしまうとコントロールできなくなる。一度 PVP ドロップ内にピペット内液を排出して、新しい PVP を吸いなおす。また、ピペット内液の動きを常に止めておけるように心がける。また、精子注入後など培養液内で吸引動作は行わない（多少 PVP を出しっぱなしぐらいで大丈夫）。

精子数が多ければ、PVP と混ぜる精子液の量は減らすほうが良い。

### 不動化の時、精子をうまく止められない。

インジェクションのセッティング角度を少し急にしてみるとうまくいく場合がある。また、インジェクションピペットとディッシュ面が接するところはいつも一緒ではないので、そのピペットを使ったときの接点を見つけ、そこで尾部をはさむこと。インジェクションをディッシュ面に押し当てたときのピペットの動き、感じをつかもう。はさんだ瞬間に精子がわずかに動くので判断できる。

### 細胞膜がなかなか破けない。

卵細胞に押し込んだ後、ゆっくりゆっくり吸引するのではなく、一気に素早く吸引すると破けやすい。ただし破けた瞬間にダイヤルをすばやく戻し、吸引を止める必要があり、インジェクターが完全にコントロールできる状態になっていることが条件。PVP 内で精子を吸ったときにデモンストレーションし、インジェクターを吸引したり戻したりすばやくする感覚を覚えておく。

### だいぶ上達してきたので、全体のスピードを上げたい。

まず、良好な精子を PVP ドロップ内に幾つか集めておき、それから、卵子を ICSI 用ディッシュに入れて、まとめて数個 ICSI すれば、卵移動の時間と良好精子検索の時間が短縮できる。ただし、不動化してからなるべく短時間で卵細胞質に注入すること。

### インジェクションピペットを刺しただけで、卵細胞膜が破けて卵子が壊れてしまう。

細胞膜に伸張性がない卵子はこれを完全に回避することはできないが、インジェクションを差し込むときに、一気に置くまで挿入するのではなく、透明帯をゆっくり刺して一度挿入を停止し、透明帯の弾力でインジェクションが透明帯を貫通するまで待ち、それからゆっくり差し込んでいくと回避できる場合もある。

ICSI準備品一覧(例)						
	品名	型式	数量	メーカー	購入先	備考
試薬品						
1	PVP Clinical Grade	1090 5000	0.2ml × 5本	Medicult	日本農産	
2	ヒアルロニダーゼ溶液	1511 5001	1ml × 5本	Medicult	日本農産	卵丘細胞除去用
備品						
1	インジェクション ピペット	K-MPIP-1030		COOK	東機貿	精子注入用
	インジェクション ピペット	SP-IJ30		北里サプライ	北里コーポレーション	精子注入用
2	ホールディング ピペット	K-HPIP-1030		COOK	東機貿	卵子保持用
	ホールディング ピペット	SP-HD1030		北里サプライ	北里コーポレーション	卵子保持用
3	締め蓋付きディッシュ	1006		Falcon	十慈フィールド	ICSI用チャンバーとして使用
4	マイクロピペット(10μ l用)					
5	チップ(10μ l用)					
* このリストはIVF準備品が整っているものとし、特にICSIを行うに当たって必要な物を記載してあります。						