

# *Ovarian Tissue Vitrification Protocol*

卵巣組織の凍結保存



Ova Cryo Kit 製品サイト  
QRコード

**KITAZATO®**

## 卵巣組織 凍結保存の流れ

卵巣切片の採取

凍結液への平衡

冷却  
(ガラス化)

保存

## PART1 必要な機器・消耗品

1. Ova Cryo Kit(製品コード：VT301S)  
Cryo 1：20 mL×1  
Cryo 2：20 mL×1  
Cryo 3：20 mL×1
2. Ova Rinse(製品コード：OVR-100)
3. Square Measure(製品コード：Square Measure) \*<sup>1</sup>
4. Ova Cryo Device Type M(製品コード：ODTx10) \*<sup>2</sup>
5. Ova Cryo Closed Device CryoSheet(製品コード：OCSx10) \*<sup>3</sup>
6. CryoSheet用ケーン(製品コード：KOCC10) \*<sup>3</sup>
7. 1~10mL シリンジ ×1
8. 18~21G 針 ×1
9. 卵胞液回収用スピッツ又は、遠心管
10. 検卵用ディッシュ
11. 検卵用顕微鏡
12. ディッシュ(Cryo1、2、3用 外径60mm) ×3
13. ディッシュ(Ova Rinseの卵巣浸漬用 外径60mm～100mm) ×2
14. ハサミ(曲剪刀×1、直剪刀×1)  
※曲剪刀と直剪刀をの2種類を使用することで卵巣の処理作業が効率的に行えます。
15. 曲がりピンセット(約12cm)
16. 液体窒素用ピンセット(約20cm) ×2
17. メス(ブレード No. 10)
18. 滅菌ガーゼ
19. カウントアップ機能付タイマー
20. 冷却用液体窒素
21. 液体窒素容器(製品コード：Cooling Rack)
22. ミクロトーム用ハンドル \*<sup>1</sup>
23. ミクロトーム用替刃 \*<sup>1</sup>
24. メス(ブレード No.11) \*<sup>1</sup>
25. ケーン(製品コード：C-2 ケーン) \*<sup>2</sup>
26. シーラー \*<sup>3</sup>

\*1 卵巣切片採取 Method2 用

\*2 Open System 用

\*3 Closed System 用



Ova Cryo Kit  
(Ref. 82212 製品コード：VT301S)

Cryo 1

Cryo 2

Cryo 3



Ova Rinse  
(Ref. 82215 製品コード：OVR-100)



Square Measure  
(Ref. 81212 製品コード：Square Measure)



Ova Cryo Device Type M  
(Ref. 81213 製品コード：ODTx10)



Ova Cryo Closed Device CryoSheet  
(Ref. 81214 製品コード：OCSx10)



CryoSheet用ケーシング  
(Ref. 81215 製品コード：KOCC10)

## PART2 準備

### 準備

Cryo1、Cryo2、Cryo3 を室温（25 ～ 27℃）に戻します。

ディッシュに「Cryo1」、「Cryo2」、「Cryo3」と識別できるよう油性ペンで記載、もしくはラベルを貼り、各ディッシュに該当する液を全量入れます。

### STEP1

卵巣組織を Ova Rinse で洗浄し、余分な血液を洗い流します。

### STEP2

卵胞を注射針で穿刺し、シリンジで卵胞液を吸引します（図 1）。

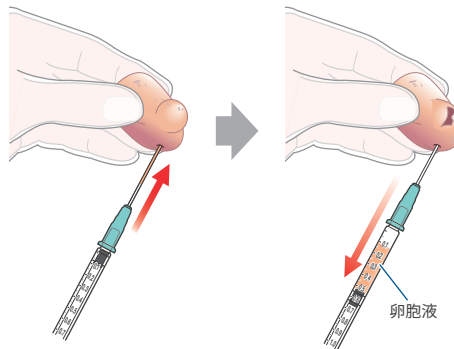


図 1

### POINT

採取した未熟卵は IVM 後に凍結します。成熟卵は卵子凍結、もしくは体外受精に用います。

## PART3 卵巣切片の採取

### Method 1

Ova Rinse を用いて卵巣が乾燥しないように注意しながら次の手順を行います。

#### STEP1

直剪刀を用いて卵巣を赤道面で半分割します（図 1）。

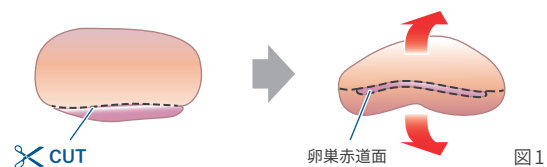


図 1

#### STEP2

半分割した卵巣を開き、髓質側を上にして乾燥しないよう Ova Rinse に浸漬し、細切作業を開始します（図 2）。

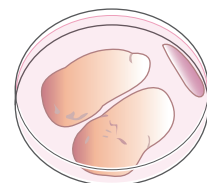


図 2

#### STEP3

切り開いた卵巣の髓質を曲剪刀で除去し、皮質のみを残します。  
ピンセットで卵巣をやさしく押さえ、髓質を曲剪刀で切除し、  
皮質が 1mm 厚になるまで作業を繰り返します（図 3）。  
すくい上げるように曲剪刀を入れることで髓質の除去が容易になります。

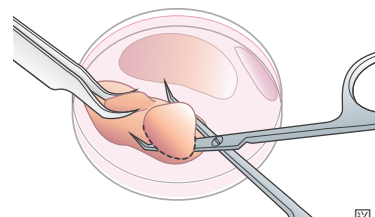


図 3

#### STEP4

1mm厚の皮質をメスを用いて 1cm 四方に細切します（図 4）。  
辺縁の髓質は細切後に除去すると作業が容易になります。



図 4

## Method 2

Ova Rinse を用いて卵巣が乾燥しないように注意しながら次の手順を行います。  
Method 1 で卵巣皮質の処理が困難な場合は、Square Measure をご利用下さい。  
Square Measure は、A と B の部品からなります（図 1）。

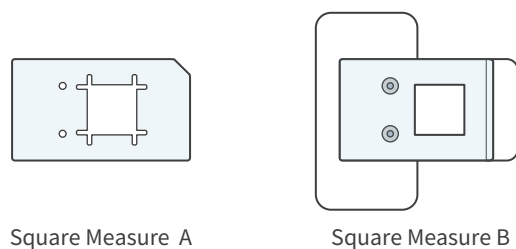


図 1

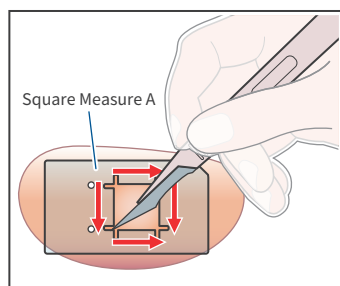
### 準備

卵巣表面の余分な水分を滅菌ガーゼで除き、Square Measure が滑らないようにします。

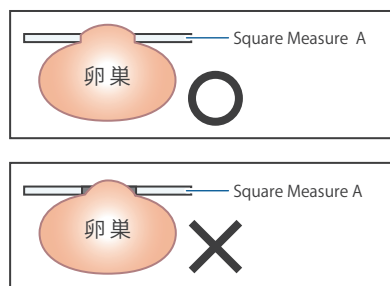
## STEP1

卵巣表面の細切したい部分に Square Measure A を置きます。Square Measure A の内側にある枠に沿ってメス（ブレード No.11）で卵巣表面を # 型に切ります。  
四隅が交差し、且つ、深さ 1mm 以上になるように切ってください。

### POINT



必ず # の形に切れ目を入れてください



## STEP2

Square Measure B を Square Measure A に取り付け、  
STEP1 で切った卵巣部分に再度置きます（図 2）。

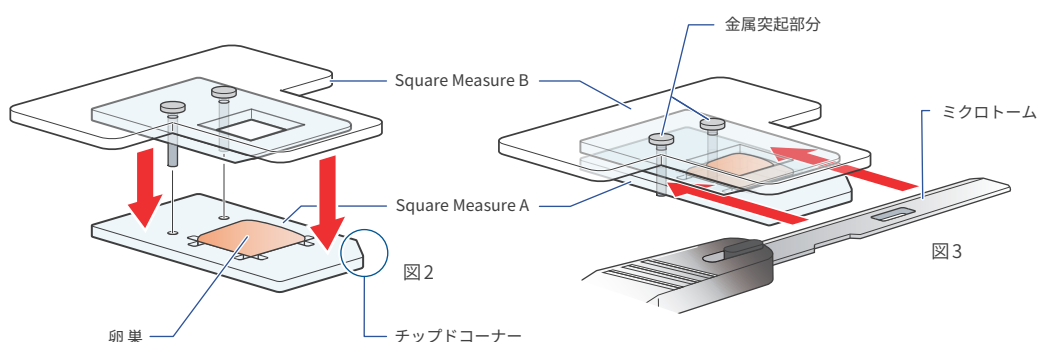


図 2

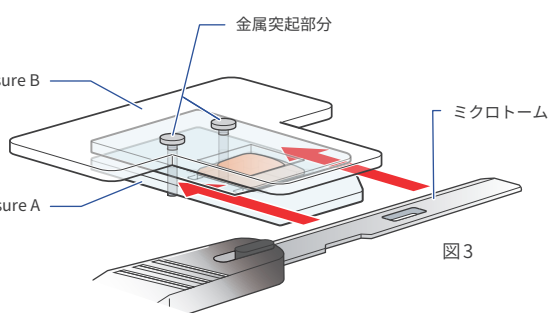
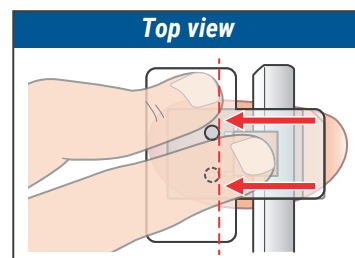
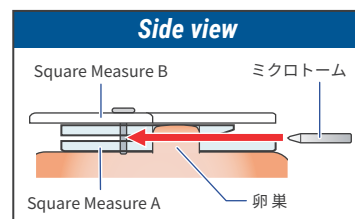


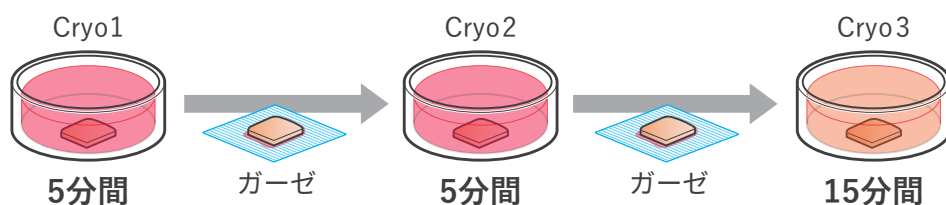
図 3



## STEP3

Square Measure を上から押さえたまま  
ミクロトームの刃を Square Measure A と B の間に挿入し、  
金属突起部分まで水平に滑らせ卵巣皮質部を切ります（図 3）。

## PART4 凍結液への平衡



複数の卵巢切片を同時に Cryo1、Cryo2、Cryo3 で処理することが可能です。

### STEP1

卵巢切片の余分な水分をガーゼで拭き、Cryo1 に 5 分間浸漬します。

### STEP2

Cryo1 平衡後、卵巢切片の余分な Cryo1 液をガーゼでやさしく除いてから、Cryo2 に卵巢切片を移し 5 分間平衡させます。

### STEP3

Cryo2 平衡後、卵巢切片の余分な Cryo2 液をガーゼでやさしく除いてから、Cryo3 に卵巢切片を移し 15 分間平衡させます。

### POINT

平衡の待ち時間に、凍結デバイス、及び液体窒素の準備を行います。

## PART5 ガラス化保存

### Open System

#### 準備

卵巣切片数分の Ova Cryo Device Type M を準備し、患者 ID を凍結デバイスのバイアルに記入します。

#### STEP1

卵巣切片をガーゼで拭きます。  
卵巣切片の表面積が最大になるよう広げ、凍結デバイスの金属部の上に載せます。  
卵巣切片は金属部の先端寄りに置くようにし、金属部分が埋め込まれているキャップの根本は避け、5mm 程度開けて卵巣を置きます（図 1）。

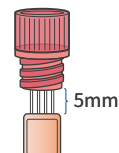


図 1

#### STEP2

凍結デバイスのキャップ部分をピンセットで掴み、液体窒素 (LN2) に素早く投入します（図 2）。

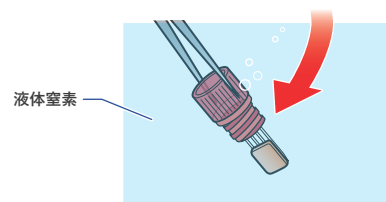


図 2

#### STEP3

卵巣切片が冷却されたら、液体窒素中でキャップにバイアルをつけて蓋を閉めます（図 3）。

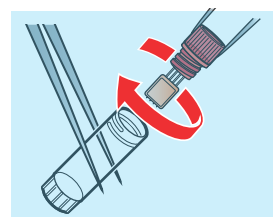


図 3

#### STEP4

凍結デバイスをケーンにはめ、タンクで保存します（図 4）。

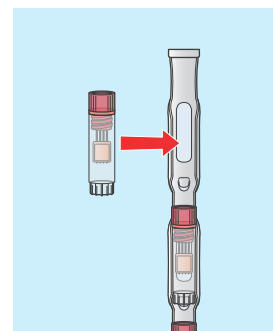


図 4

#### POINT

- 卵巣切片を載せた面から凍結デバイスを液体窒素に投入するようにしてください。凍結デバイスから卵巣切片がはがれてしまうのを防ぎます。
- 液体窒素内で卵巣切片が凍結デバイスから剥がれてしまった場合は、卵巣切片を バイアル部分にそのまま入れ、キャップをします。



## Closed System

### 準備

卵巣切片数分の Ova Cryo Sheet と付属の Ova Cryo Sheet 用パウチに、患者情報等の記入をします（図 1）。

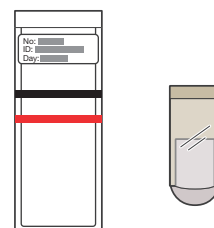


図 1

### STEP1

本体のフィルム部分を捲ります。  
卵巣切片をガーゼで拭き、表面積が最大になるよう、凍結デバイスの枠内に載せます（図 2）。

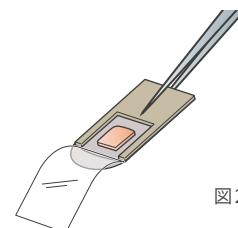


図 2

### STEP2

フィルムを、卵巣切片に被せ、余分な空気を抜き密着させます。

### STEP3

凍結デバイスを Ova Cryo Sheet 用パウチに入れます。  
空気を抜いて、指で軽く袋を押さえた後、黒線上でヒートシーラーを用いてシールします（図 3）。  
ヒートシーラーの設定温度が高すぎるとパウチが破損する恐れがあります。適切な温度でシールしてください。

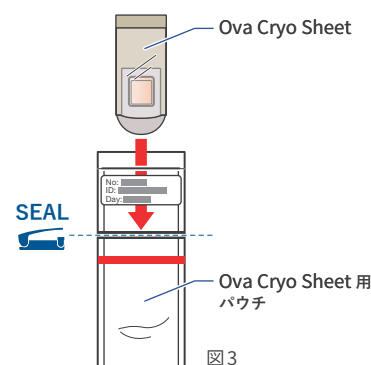


図 3

### STEP4

ピンセットを使用し、凍結デバイスを液体窒素に素早く投入します。  
液体窒素投入後はすばやく冷却されるよう、凍結デバイスを液体窒素中でやさしく振って下さい（図 4）。

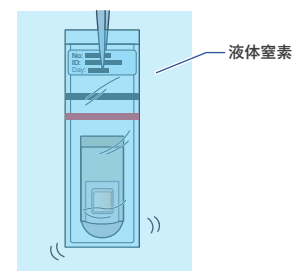


図 4

### STEP5

凍結デバイスを付属の Ova Cryo Sheet Cane に入れ、タンクで保存します（図 5）。

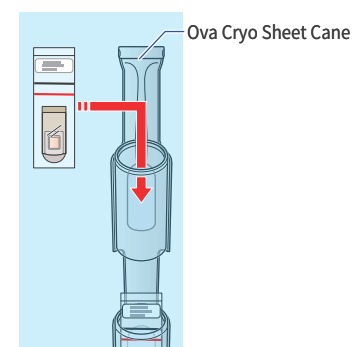


図 5

## 卵巢組織 加温の流れ

卵巢切片の融解

希釈と洗浄

移植 / 培養

## PART1 必要な機器・消耗品

1. Ova Thawing Kit(製品コード：VT302S)  
Thaw 1: 100mL ×1  
Thaw 2: 20mL ×1  
Thaw 3: 20mL ×1
2. Ova Culture (製品コード：OVCL-100)  
またはOva Culture with HEPES (製品コード：OVCM-100)追加培養用
3. 液体窒素
4. 液体窒素容器(製品コード：Cooling Rack)
5. 液体窒素用ピンセット(約20cm)
6. ウォーターバス
7. ディッシュ (外径 60mm ～ 100mm) × 2
8. 滅菌カップ(Thaw1用 110mL / 4.5 oz. コンテナ)
9. ピンセット (卵巢組織の希釈、洗浄用 約12cm)
10. カウントアップ機能付タイマー
11. ハサミ\*1

\*1 Closed System用



Ova Thawing Kit  
(Ref.82222 製品コード：VT302S)



Ova Culture  
(Ref.82216 製品コード：OVCL-100)



Ova Culture with HEPES  
(Ref.82217 製品コード：OVCM-100)

## PART2 準備

### STEP1

Thaw1 全量を滅菌カップに入れ、ウォーターバスで 37°C に温めておきます。

Thaw2、Thaw3 は室温（25 ～ 27°C）に戻します。

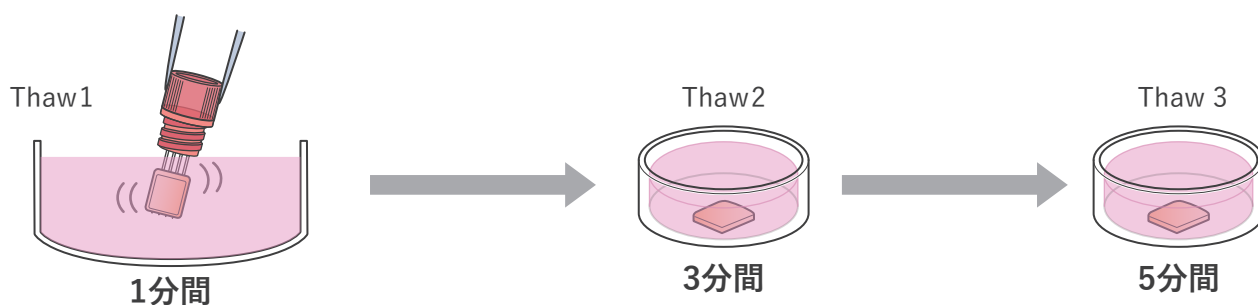
ディッシュに「Thaw1」「Thaw2」「Thaw3」と識別できるよう油性ペンで記載、もしくはラベルを貼り、各ディッシュに該当する液を全量入れます。

### POINT

融解時、凍結デバイスを液体窒素から Thaw1 に素早く移動できるよう、液体窒素は、ウォーターバスのすぐ隣に設置します。

## PART3 融解

### Open System



#### STEP1

凍結デバイスを保管タンクから取り出し、液体窒素容器に移します。  
ピンセットを使用し、液体窒素中で凍結デバイスのキャップを外します。凍結デバイスに卵巣切片があることを確認します。

#### STEP2

凍結デバイスを Thaw1 へ素早く移動し、1 分間平衡させます。Thaw1 内で凍結デバイスを軽く振ります。  
卵巣切片が剥がれたら、すぐに凍結デバイスを取り出します。

#### POINT

Thaw1 の温度を下げないように、凍結デバイスの金属部分のみを Thaw1 に浸漬してください。

#### STEP3

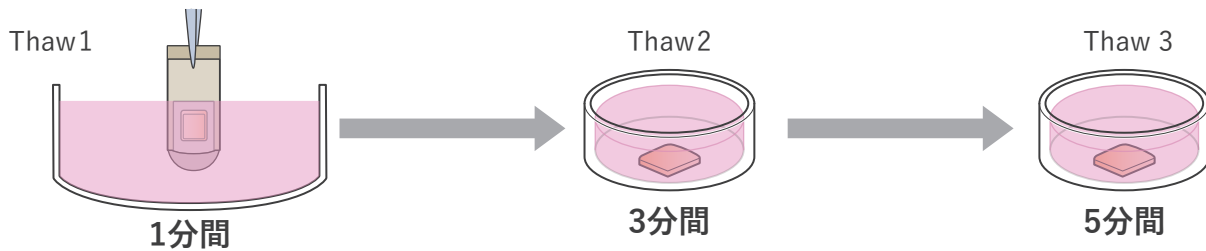
Thaw1 平衡後、卵巣切片を Thaw2 に移し、3 分間浸漬させます。

#### STEP4

Thaw2 平衡後、卵巣切片を Thaw3 に移し 5 分間浸漬させます。  
Thaw3 での融解処理が完了したら、移植等の作業に移行します。

融解直後に移植をする場合は、Ova Culture with HEPES で 30 分間追加培養を行ってください。  
30 分以上追加培養を行う際は Ova Culture を使用し、インキュベータ内で行ってください。

## Closed System



### STEP1

凍結デバイスを保管タンクから取り出し、液体窒素容器に移します。  
液体窒素に浸けたままパウチの赤線状でカットし、開封します。  
パウチの開封口は液体窒素の液面より上に出し、パウチ内に液体窒素が入らないよう、注意してください（図1）。

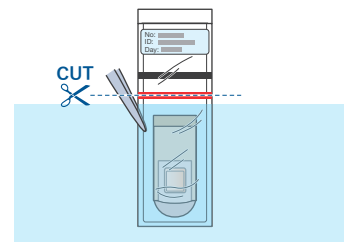


図1

### STEP2

凍結デバイスをパウチから取り出し、Thaw1 へ素早く移動し、  
1分間平衡します。  
Thaw1 の温度を下げないよう、凍結デバイスの卵巢切片部分のみを Thaw1 に  
浸漬させます。  
卵巢切片が外れたら、凍結デバイスを Thaw1 から取出します。

### STEP3

Thaw1 平衡後、卵巢切片を Thaw2 に移し、3分間浸漬させます。

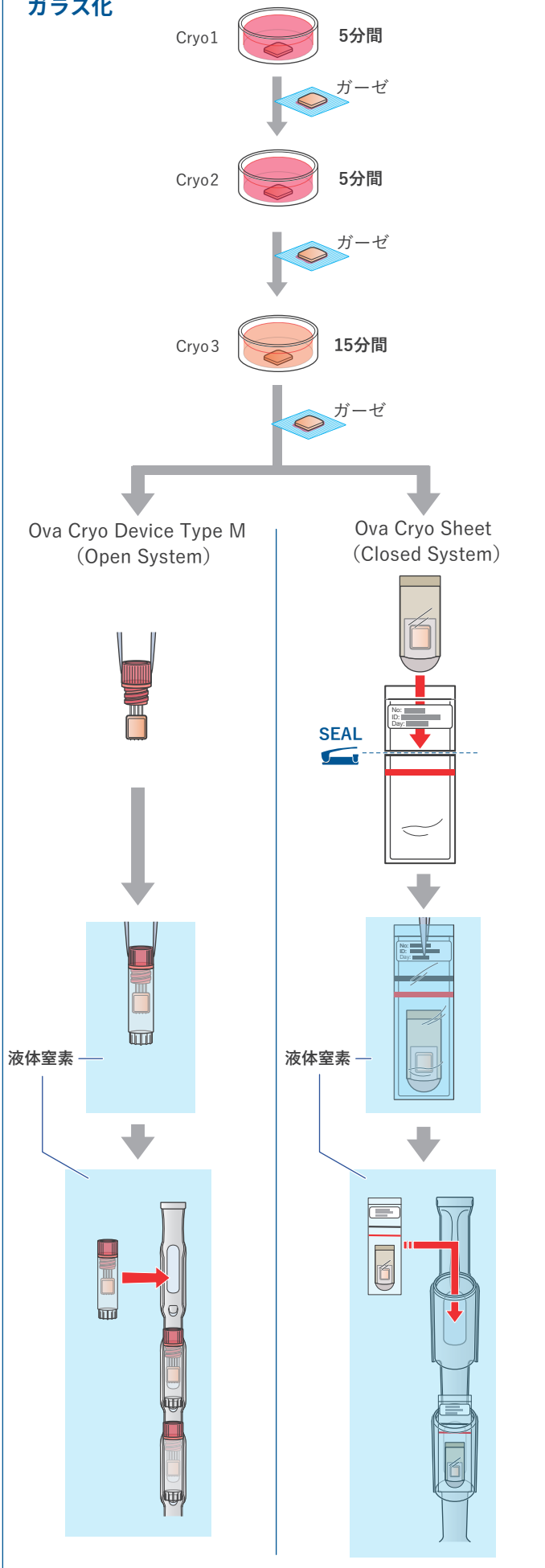
### STEP4

Thaw2 平衡後、卵巢切片を Thaw3 に移し5分間浸漬させます。  
Thaw3 での融解処理が完了したら、移植等の作業に移行します。

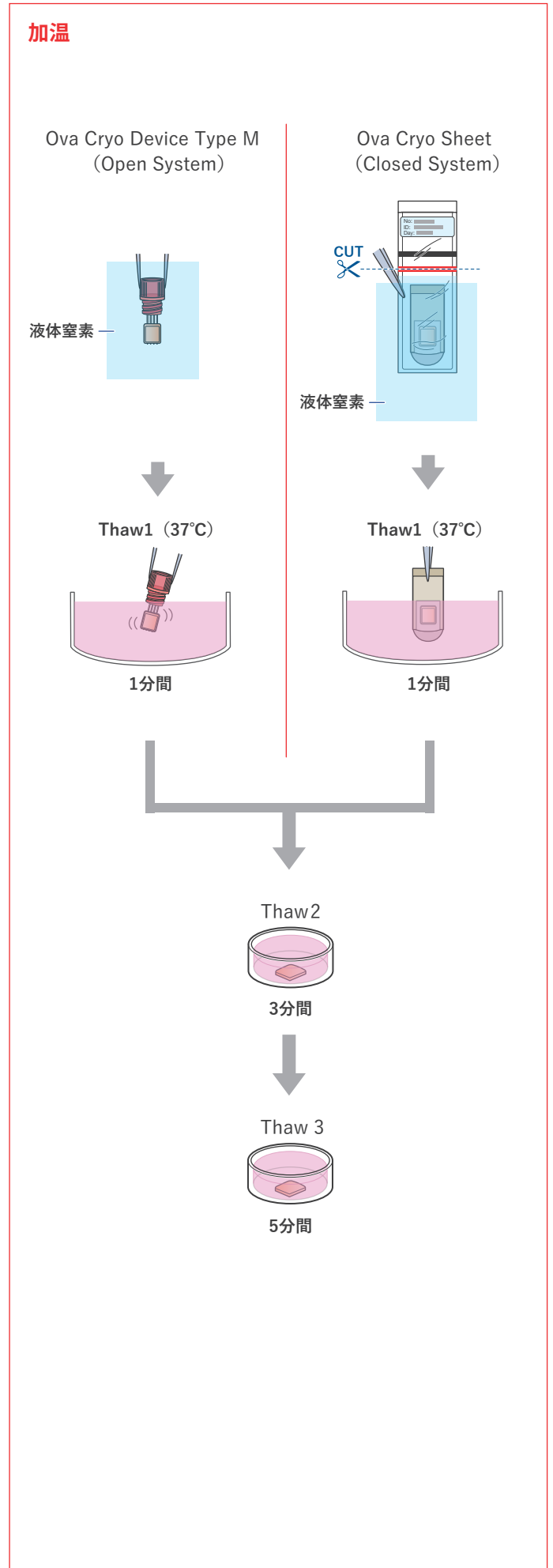
融解直後に移植をする場合は、Ova Culture with HEPES で30分間追加培養を行ってください。  
30分以上追加培養を行う際は Ova Culture を使用し、インキュベータ内で行ってください。

# Ovarian Tissue Protocol

## ガラス化



## 加温





*Happiness, for the Next Generations*