

【使用目的】

ICSIの際に卵子の周りの卵丘細胞塊を除去する操作等。

【組成】

Bovine Hyaluronidase (ウシヒアルロニダーゼ)：80±10 U/mL

Human Serum Albumin (HSA：ヒト血清アルブミン)：治療用グレード品5.0 mg/mL

Gentamicin Sulfate：10 μg/mL

HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 添加 HTF 溶液

【品質保証】

10⁻³の Sterility Assurance Level (SAL10⁻³、無菌性保証水準)に適合した設備でろ過滅菌して製造され、ロットごとにエンドトキシン含量の測定、Mouse Embryo Test による生物適合性試験、Pharmacopoeia of the United States of America 24 (USP 24, アメリカ薬局方)に準拠した方法による酵素活性の測定、USP24に準拠した方法による無菌試験が実施され、結果が Certificate of Analysis(分析証明書)に記載される。

*Hyaluronidase(ヒアルロニダーゼ)は、米国内の United States Department of Agriculture (USDA, 米国農務省)の基準を満たした施設で管理されたウシから採取された成分を用いて製造される。また、特定危険部位ではないウシ精巢由来の Hyaluronidase が使用される。

【緩衝能】

21 mM HEPES、4 mM の Sodium Bicarbonate (炭酸水素ナトリウム)により生理的な pH に調整済み。CO₂ インキュベーター外での使用に適す。

【使用方法】

1. 使用前に37℃に加温する。
2. バイアル中の本溶液を適当なディッシュ上に分配する。
3. 卵子を本溶液中に移し、継続的にピペティングしながら卵丘細胞を取り除く。本操作は概ね30秒以内に完了させる。
4. 上記3の操作の完了後、直ちに卵子を本溶液から取り出し、洗浄用培地*に移す。
* 5.0 mg/mL HSA 含 Modified HTF
注：卵子を移す際には、本溶液の混入量を最小限に抑え、卵丘細胞を洗浄用培地に持ち混まないこと。
5. ピペットで卵子を吸引し、卵子に付着している卵丘細胞や放射冠細胞を取り除く。
6. 完全に卵子が裸化するまでさらに2回以上卵子を洗浄する。
7. 裸化した卵子を CSCM-C (カタログ番 90165) 等の初期胚用培養液に移し、ICSI 等目的とする操作に適した卵子を選別する。



8. ICSIの操作をする場合には、裸化後の卵子の順化、回復を目的として、1時間程度培養した後に操作開始する事が好ましい。

【保存温度】 2-8℃

【有効期間】 製造後12ヶ月

【使用上の注意】

異物の混在や溶液に濁りがみられた場合、赤みがかったオレンジ色でない場合には使用しないこと。

CO₂ インキュベーター内で加温する場合は、炭酸ガスの流入によりpHが7.0以下になる可能性があるので容器のフタを固く閉め、気相の交換が起きないようにすること。

39℃以上に行わないこと。

ロットごとの酵素活性は Certificate of Analysis で確認すること。本資料に記載された方法は一般的なものであり、使用に際してはプロトコルを至適化すること。

Gentamicin に対するアナフィラキシーを引き起こす可能性のある場合は使用しないこと。

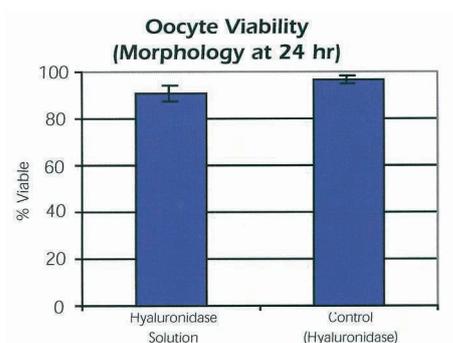
ヒトおよびウシ由来の成分が含まれており感染の可能性が完全に否定されたものではないので感染防止の措置をとること。

【参考文献】

Elder K and Date B ; Micromanipulation techniques, in In Vitro Fertilization, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2000, p237

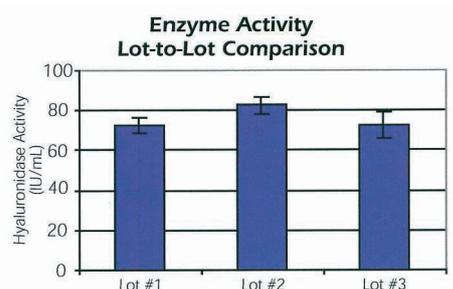
Rombouts L and Wood CE ; Oocyte retrieval, in Handbook of In vitro Fertilization, Trounson AO and Gardner DK., Eds., 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2000, p78

新鮮マウス卵子の生存率



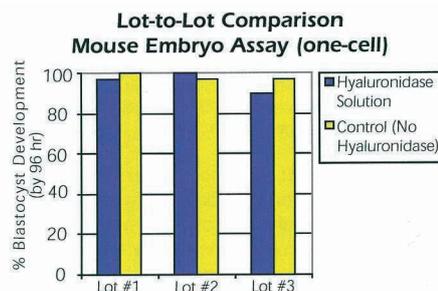
マウスから採取した卵子を Hyaluronidase Solution 中で、ゆっくりピペティングしながら 1-2 分間処理した。卵丘細胞は 2 分以内で解離が確認された。裸化後の卵子を 0.5% Bovine Serum Albumin 含 HTF 培地に移して培養し、24 時間後に形態観察により生存率を測定し、正常形態が確認された卵子の割合を算出したところ、陽性対照と同等の生存率が認められた。陽性対照は自施設で調製した hyaluronidase。結果は 5 回以上の試験の mean ± SEM(%、試験に供した卵子は各群とも合計 n=150)。

酵素活性のロット間差の評価



Hyaluronidase Solution 3 ロットの酵素活性を標準的な比濁法により測定したところ、ロット間差は認められなかった。

新鮮 1 細胞期胚による Mouse Embryo Assay によるロット間差の評価



マウスから採取した 1 細胞期胚を Hyaluronidase Solution 中でゆっくりピペティングしながら 1-2 分間処理した。次に 0.5 % Bovine Serum Albumin 含 HTF 培地で胚を洗浄後、培養用の同培地に胚を移し、胚盤胞の形成率を測定した。3 ロットの Hyaluronidase Solution で採卵後 96 時間培養したときの胚盤胞形成率を測定したところ、陽性対照と同等の胚盤胞形成率が認められた (n=31)。陽性対照は hyaluronidase 未処理群。