

2. 人卵に関する研究

2 - a Diffusion Chamber を用いた 受精卵の腹腔内培養の研究

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

飯塚理八・鈴木俊夫

研究目的

test tube baby への新しい方法の可能性の一つとして、また腹腔内環境での受精卵の発育の検討を含めて、Diffusion Chamber を用いた家兎受精卵の腹腔内培養を試みた。

test tube baby は、現在体外受精、体外培養が行なわれているが、卵成熟、着床、子宮内発育など妊娠経過の多くは in vivo である。また in vitro での実験は、種々の環境を変化させ、その経過、影響を観察可能であることにより、受精の機構解明に大きな利点があるが現在使用されている受精卵の培養液は、組成の明確な化学合成培地のみよりも、これに不明微量成分の含まれる血清などを附加した方法で成績のよいこと、などより in vivo の再検討は価値のあるものと考えられる。血清と腹水の組成が近似していることより、また腹腔妊娠の報告も多くあり、腹腔内環境における受精卵発育の検討を行なった。腹腔内は、温度、PH、酸素濃度、電解質、グルコース、ホルモンなどが恒常的に保たれていると想定され、もし腹腔内が受精卵の発育に適した環境であれば、その腹腔内培養は、従来の方法に比し、操作管理が容易であり、また薬剤全身投与による卵への影響を検討するのによい方法となる。一方腹腔内環境が不適であるならば、卵管内環境との差における卵への影響をみることができる。

そこで、私達は Diffusion Chamber を利用して、家兎受精卵腹腔内培養を行ない、その培養成績を検討してみた。一方腹腔内培養卵を同種動物子宮内、卵管内へ移植することを試みた。

研究方法

受精卵腹腔内培養のため Diffusion Chamber を利用した。これは、図1のようにプラスチックリングの上下両面に millipore filter を接着させた構造を持つ、millipore filter は pore size 0.45 μ の millipore 社の HA WPO 1400 を使用し、Chamber は同社のプラス

チック穴あきリング PR000 1401 を使用した。

Diffusion Chamber の大きさより、また、一定時期の受精卵の採取が容易なように、交尾刺激により排卵する家兎を使用した。まず家兎卵にて行ない、その後ヒト卵を使用する予定である。

test tube baby への新しい方法の可能性として、図2のような実験計画をたてた。そのなかで、まず腹腔内培養の可能性を検討するため、実線の部分、枠で囲んだ部分を行なった。

家兎では交尾して1～2時間後に LH surge があり、10～15時間後に受精が行なわれる21～25時間後に2分割卵となり、48時間後には16～32分割卵となり、72～75時間で子宮に到達する。これより次のような実験系とした。採卵は、受精卵であることの確認容易な2分割卵の時点、交配24時間後に開腹し、卵管子宮側を結紮し、23Gの針を用いて Wash out し、実体顕微鏡下にマイクロピペットを用いて行なった。ただちに Diffusion Chamber の側面の小孔よりマイクロピペットを用いて注入、プラチックにて封印し、24時間腹腔内培養を行ない、その後再開腹し、Diffusion Chamber より卵を回収した。

培養が正常に進行したか否かの判定の最良の方法は子宮内移植の結果をみることであるが、交配48時間後卵管より得た16～32分割卵 morula をスタンダード卵とし、これと卵割速度、光顕、ラクモイド染色、ノマルスキー干渉顕微鏡での形態を比較検討することにより行なった。

研究結果

94ヶの家兎受精卵が Diffusion Chamber 内腹腔内培養に供されたが、24時間後に再開腹により回収された卵は35ヶであった。その内訳は、2分割卵のままであったもの16ヶ、4分割卵5ヶ、8分割卵10ヶ、morula 4ヶであった。全体的にみると卵割速度は、卵管内に比して遅延傾向にある。また2分割卵、4分

割卵では、変性卵と思われるものが多い。8分割卵および morula では、変性の所見は少ない。率は低いが、光顕レベルにて形態的に、および卵割速度に差のない morula が得られた。

考 察

卵の回収率の低いこと、分割速度の遅延傾向が、問題となるが、回収率の低さは、卵が millipore filter の膜面に附着するためとおもわれる。とくに変性卵にその傾向が強いと思われる。手術その他卵の操作時間の長短も関与していると思われる。実験当初行なっていた付属器切除を改め、手術時間の短い、そして、卵巣を残す手技など技術的な改良により、回収率は改善されつつある。また、光顕レベルの観察では、スタンダード卵と卵割速度および形態的に差のない morula が得られ、腹腔内培養の可能性をさらに検討する価値があると考ええる。今後ラクモイド染色、ノマルスキー顕微鏡により内部構造を観察し、また子宮内移植も検討する必要がある。子宮内移植は morula 3ヶを同一家兎の卵管内、子宮内に移植したが妊娠の成立はみなかった。

要 約

Diffusion Chamberを利用した家兎受精卵の腹腔内培養を試み、率は低いが卵管より同時間後に採取したスタンダード卵と、卵割速度と光顕レベルでの形態に差のない morula を得た。

図1

実験計画

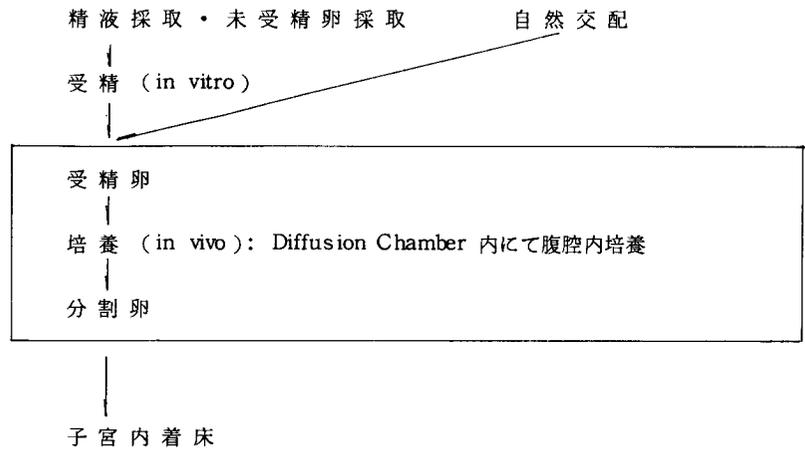


図2

DIFFUSION CHAMBER

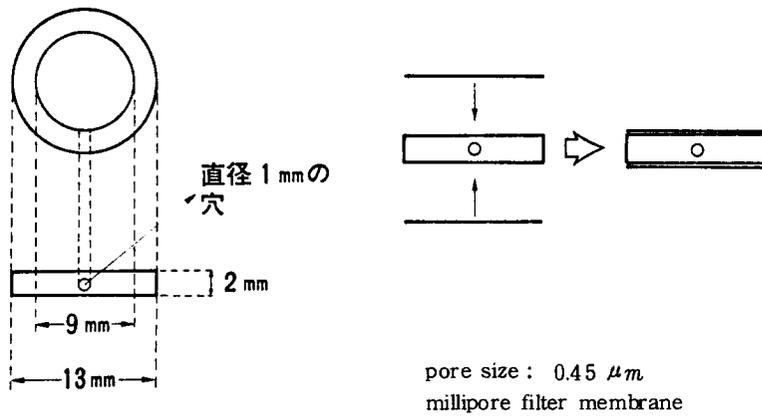


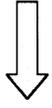
図3

受精卵の腹腔内培養

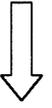
慶大家族計画相談所 1981.2 現在

ウサギ	DC 内 培養卵数	一回収卵数	回 収 卵			
			2 分割	4 分割	8 分割	16 分割
No. 1	2	0				
No. 5	1	0				
No. 7	4	0				
No. 9	7	0				
No. 11	8	2	0	1	1	0
No. 12	3	0				
No. 14	6	3	3	0	0	0
No. 15	3	0				
No. 16	6	2	0	0	2	0
No. 17	10	5	3	2	0	0
No. 19	3	1	1	0	0	0
No. 21	3	1	1	0	0	0
No. 23	4	2	0	1	1	0
No. 24	10	6	0	0	4	2
No. 25	6	3	0	0	1	2
No. 26	3	3	3	0	0	0
No. 31	2	1	1	0	0	0
No. 32	8	5	4	1	0	0
No. 34	5	1	0	0	1	0
	94	35	16	5	10	4

DC = Diffusion Chamber



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約

Diffusion Chamber を利用した家兔受精卵の腹腔内培養を試み,率は低いが卵管より同時間後に採取したスタンダード卵と,卵割速度と光顕レベルでの形態に差のない morula を得た。