

平成6年度厚生省心身障害研究  
「多胎妊娠の管理およびケアに関する研究」

多胎妊娠の予防に関する研究  
(分担研究：生殖補助医療技術の改善による多胎防止の研究)

分担研究報告書

分担研究者 浜松医科大学医学部  
寺尾 俊彦  
朝比奈俊彦

要約：体外受精に際し、着床・生育の可能性が高い良好な胚（受精卵）を選別して少数個子宮内に移植すれば、多胎の防止が可能である。また胚の質が向上すれば、多数個の胚を移植することにより妊娠率を高めるという必要性がなくなる。そこで、ヒト胚の質を向上させるために現在世界でどのようなアプローチがなされているかを明らかにするために最近5年間の文献的考察を行なった。共培養、培養液、その他、に分類し検討した。

共培養では、卵管上皮細胞との組合せが胚発育に最も効果があるようであった。どんな因子がその本体であるかは、未だ正確には解明されていなかった。培養液に関しては、添加血清中の胚発育阻害因子が問題であった。ヒト血清アルブミン添加のみでも十分発育するとの報告もあった。その他に関しては、酸素毒性と光の胚発育阻害効果を指摘するものがあった。以上より、胚の質を向上させるための研究として、卵管上皮細胞より産生される胚発育促進因子の検出と、培養液添加ヒト血清中の胚発育阻害因子の除去（あるいは発育必須因子の抽出・添加）が期待されていることが判明した。

研究方法：

- (1) 調査期間；胚の質向上に関する研究報告が発表され始めた、1990年より1994年までの5年間。
  - (2) 調査方法；MEDLINE
  - (3) 調査対象；欧米および日本における主たる生殖医学雑誌
- 以上の3項目を充たす論文を51篇選び出し、分析した。

結果：文献は、大きく分けて、胚と他の細胞との共培養に関するもの、培養液に関するもの、その他の培養条件に関するもの、の3部門に分類することができる。

- (1) 胚と他の細胞との共培養に関するもの (文献1)~(文献42) 〆

胚との共培養は種々の細胞で試みられている。その各々について整理した。

Vero cell ; マウス胚発育に有効。ヒト胚発育には、有効・無効両報告があり意見の統一をみない。

顆粒膜細胞 ; 牛胚発育に有効。ヒトにおいては、胚発育には有効であるが、その胚を子宮内に移植した結果の妊娠率には向上をみなかったとされている。

卵管上皮細胞 ; 有効との報告数は最も多く、ウサギ、ヒト、マウス、牛、馬、羊、すべての胚において有効とされている。特にヒトにおいては、受精率・均等分割率・妊娠率もすべて向上したと報告されている。

子宮内膜上皮 ; 牛、マウス胚の発育に有効。ヒトにおいては、胞胚期以降の発育に有効であったとの報告がある。

つぎに共培養の有効因子の分析では、  
培養液中に増加していた ; プロゲステロン (牛) , テストステロン (牛)  
胚発育を促進する ; 何らかの低分子蛋白 (マウス) , シス테인 (マウス) ,  
tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (羊) ,  
platelet-derived growth factor (牛)  
卵管上皮で産生される ; insulin-like growth factor-1 (ラット) ,  
transforming growth factor- $\alpha$  (ヒト) ,  
という報告がある。

## (2) 培養液に関するもの(文獻43)~文獻48)類)

培養液添加ヒト血清, 添加重金属, 活性酸素, 免疫抑制活性に関する研究がなされている。

添加ヒト血清 ; 2.25%ヒト血清アルブミン添加培養液でも胚発育や妊娠率に差がなかったという報告がある。( : ヒト, およびマウス胚)

原因不明不妊のある種の患者群の血清において、胚発育を阻害する作用があったという報告がある。( : ヒト, およびマウス胚)

添加重金属 ; 銅, 鉄, 亜鉛, hypoxanthin は、胚発育に阻害的に働くと報告されている。( : マウス胚)

活性酸素 ; 活性酸素は胚発育に有害であり、その消去系である superoxide dismutase はマウス胚の 2-cell block を解除すると報告されている。

免疫抑制活性 ; ヒト着床成功例は培養液中の免疫抑制活性が高いと報告されている。

## (3) その他の培養条件に関するもの

酸素毒性 ; マウス胚において、5%酸素下で扱えば、20%下に比してその培養効率は高いとの報告がある。

可視光線 ; ハムスター胚において、1,600lux下と70lux下の操作では、70luxのほうが

胚発生効率が高かったと報告されている。

考察：現在までのところ、共培養、それも卵管上皮細胞との共培養で胚の質が向上するのは間違いのないようである。これは、通常の生理的条件下における胚の存在部位が大部分の時期において卵管であることより、当然のことであろう。しかし、卵管上皮は開腹手術手技なしには得ることが不可能なため、実際問題として患者本人の細胞は使用できない。他種の動物、あるいは他人の細胞を利用するとなると常にウイルス等の感染の危険性が問題となってくる。また患者本人の細胞が利用できる顆粒膜細胞との共培養は、その効果に疑問が残る。

となると、次のステップとして卵管上皮細胞との共培養で産生される有効成分のみを解析し、それを利用しようという試みがなされてくる。現在まで、何らかの低分子蛋白やシステイン、プロゲステロン、insulin-like growth factor-1, transforming growth factor- $\alpha$ , platelet-derived growth factor, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, 等が胚発育促進因子として候補に挙げられているが、いまだ定説とはなっていない。今後の研究課題となっている。

次に培養液に関する文献であるが、通常、体外受精操作においては、培養液にヒト血清を加えることが一般的に行なわれている。これは、エネルギー源、緩衝液、成長因子の付加、ホルモンの付加等の理由である。しかしこれについても、ヒト胚発育に有害な因子が混和している可能性を指摘する論文がでている。（原因不明不妊のある種の患者群の血清において。） また、全血清ではなくヒト血清中のアルブミンのみを加えても胚発育は同様に良好であったという報告がある。一刻も早く必須成分を確定する必要がある。

以上より胚の質を向上させるためには、卵管上皮細胞より産生される胚発育促進因子の検出と、培養液添加ヒト血清中の胚発育阻害因子の除去（あるいは発育必須因子の抽出・添加）の研究が重要であると結論づけられる。

文献；（1st author only）

## 1. Co-culture

- 1) Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of Vero cells. Menezo Y, Biol Reprod 42:301,1990  
結論；ヒト胚の blastocyst移行率, hatching移行率ともに高かった。
- 2) Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. Carney EW, In Vitro Cell Dev Biol 26:629,1990  
結論；ウサギ胚において有効。
- 3) Co-cultures:their releavance to assisted reproduction. Bongso A, Hum Reprod 5:893,1990  
結論；ampullary cellは ヒト胚発育に非常に効果がある。
- 4) Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell support. Ouhibi N, Hum Reprod 5:737,1990  
結論；マウスおよび牛の 1) explanted oviduct 2) oviduct epithial cell がマウス胞胚移行率の良いベスト2だった。
- 5) Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2-cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. Ellington JE, J Reprod Fertil 89:293,1990  
結論；マウス胚は牛卵管上皮共培養 simple medium で十分発育する。
- 6) Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture system. Ellington JE, Biol Reprod 43:97,1990  
結論；glucose(-), serum(-), fresh BOEC monolayer(+)が牛胚にはベスト。
- 7) Ultrastructure of preimplantation human embryos co-cultured with human ampullary cells. Sathananthan H, Hum Reprod 5:309,1990  
結論；ヒト胚では Whittingham's T6 mediumのみによるものと差はなかった。
- 8) Improved fertilization rates of human oocytes in co-culutre. Bongso A, J IVF ET, 8:216,1991  
結論；human ampullary cellとの共培養は、ヒトにおける受精率、胚の質、妊娠率を上げる。
- 9) Co-culture:a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Bongso A, Fertil Steril 56:179,1991  
結論；卵管膨大部細胞との共培養はヒト胚において有効。
- 10) Effects of maturation and co-culture treatment on the developmental

- 21) Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of Vero cell. Van Blerkom J, Hum Reprod 8:1525,1993  
 結論；ヒトにおいて、超微細構造からみても特に効果なし。
- 22) 体外受精・胚移植における受精卵の卵丘細胞との共培養の試み。山辺晋吾, 日受精着床会誌 10:87,1993  
 結論；ヒト胚の肉眼的な質向上はみられたが、妊娠率は向上せず。
- 23) Co-culture of mouse embryos with cells isolated from the human ovarian follicle, oviduct and uterine endometrium. Melanie R, Fertil Steril 59:138,1993  
 結論；マウス胚の長期培養に、上記ヒト組織はすべて有効であった。
- 24) Embryonic morphology and rate of implantation of human embryo following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. Weimer K, Hum Reprod 8:97,1993  
 結論；ヒト胚において、妊娠率、着床率、均等分割率ともに高かった。
- 25) Granulosa cells improve human embryo development in vitro. Placot M, Hum Reprod 8:2113,1993  
 結論；ヒト胚発育には有効であったが、着床不全患者の妊娠率は向上せず。
- 26) Improved development of human embryos cultured on a Vero cell monolayer. Zetova L, J Assist Reprod Genet 10:234,1993  
 結論；ヒト胚において、Vero cell monolayerとの共培養は有効であった。
- 27) Development to blastocysts of one- to two-cell equine embryos after co-culture with uterine tubal epithelial cells. Ball BA, Am J Vet Res 54:1139,1993  
 結論；馬において、胚発育を促進する。
- 28) Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium and in co-culture on Vero cells. Sakkas D, Fertil Steril 61:521,1994  
 結論；ヒト胚において、Vero cellとの共培養は無効であった。
- 29) Human embryonic behavior in a sequential human oviduct-endometrial co-culture system. Bongso A, Fertil Steril 61:976,1994  
 結論；ヒト胞胚からの発育には、子宮内膜との共培養にした方がよい。
- 30) Frozen-thawed cumulus-granulosa cells support bovine embryo development during co-culture. Broussard JR, Fertil Steril 62:176,1994  
 結論；牛において、凍結融解・卵丘/顆粒膜細胞系も新鮮なそれと同様有効。
- 31) Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized

ovine zygotes: comparison between co-culture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. Watson AJ, Biol Reprod 50:715,1994

結論 ; 羊胚において, 共培養と低濃度酸素環境は有効。serumとFBSは差なし。

- 32) Viability of one-cell bovine embryos cultured in vitro :comparison of cell-free culture with co-culture. Goto K, J Reprod Fertil 100:239,1994

結論 ; 牛において, 顆粒膜細胞との共培養のほうが胞胚発育率は高い。

(共培養効果の解析)

- 33) Results of endocrinologic studies in culture media after co-culture of bovine oocytes with granulosa cells. Gotze M, Arch Exp Veterinarmed 44:941,1990

結論 ; 牛において, 共培養で培養液中のプロゲステロン, テストステロンの値は上昇していた。

- 34) Effect of low molecular weight oviductal factors on the development of mouse one-cell embryos in vitro. Minami N, J Reorod Fertil 96:735,1992

結論 ; マウス胚発育に重要なのは, 低分子卵管因子であった。

- 35) Analysis of oviduct-derived embryonic growth stimulator activity. Noda Y, Int J Fertil Menopausal Stud 38:57,1993

結論 ; ハムスター卵管分泌物中にはマウス胚に対する発育促進活性なし。

- 36) Cysteine as an embryonic growth stimulating factor in co-culture with oviductal cells. Noda Y, Sero Symposia Reviews

結論 ; 共培養液中に出現するcysteinにマウス胚発育促進効果がみられた。

- 37) Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the rat fallopian tube:possible autocrine and paracrine action of fallopian tube-derived IGF-I on the fallopian tube and on the preimplantation embryo. Carlsson B, Endocrinology 133:2031,1993

結論 ; ラットにおいて, IGF-Iは卵管で E<sub>2</sub>の制御下で産生され, 卵管と8細胞期胚にはそのレセプターが存在する。

- 38) Role of platelet-derived growth factor in development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. Thibodeaux JK, J Reprod Fertil 98:61,1993

結論 ; PDGFはウシ胚の発育を促進する。

- 39) Stimulation of development of in viro-matured and in vitro-fertilized bovine embryos by platelets. Thibodeaux JK, J Anim Sci 71:1910,1993

結論 ; 上記の PDGFは卵管上皮と血小板由来である。

- 40) Immunohistochemical localization of transforming growth factor - $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in human fallopian tubes and cumulus cells. el Danasouri I, Am J Reprod Immunol 30:82,1993  
 結論 ; ヒトにおいて, TGF- $\alpha$ は卵管上皮細胞に陽性, EGF-Rは卵丘細胞に陽性であった。
- 41) A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development.  
 Watson AJ, Biol Reprod 50:725,1994  
 結論 ; 羊の卵管上皮にも胚にも種々の GFが存在する。
- 42) Tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo. Satoh T, Biol Reprod 50:835,1994  
 結論 ; 羊において, 卵丘細胞および卵管上皮より産生される TIMP-1が主たる胚発育促進因子である。

## 2. Medium

- 43) Human serum albumin versus serum:a comparative study on ET medium.  
 Khan I, Fertil Steril 56:98,1991  
 結論 ; 1) 2.25%HSA・Earle'sは 75%serum・Earle'sと, ET mediumとして差はない。2) 2.25%HSA・Earle'sは, IM・GMとしても有用であった。
- 44) Involvement of superoxide radicals in the mouse 2-cell block. Noda Y, Molec Reprod Develop 28:356,1991  
 結論 ; SODにてマウス 2-cell blockが解除され, 高い胚盤胞率が得られた。
- 45) Immunosuppressive activity and  $\alpha$ -interferon concentrations in human embryo culture media as an index of potential for successful implantation. Jones KP, Fertil Steril 57:637,1992  
 結論 ; ヒト着床成功例は培養液中の免疫抑制活性が高い。(IF濃度は不変。)
- 46) The effect of heavy metal ions on the in vitro development of mouse embryos. Matsumoto H, J Reprod Dev 39:223,1993  
 結論 ; Cu, Fe, Zn, Hypoxanthinは, マウス胚発生に阻害的に働く。( $\alpha$ -MEMと Ham'sF-10を比較して)
- 47) Effect of human sera and human serum albumin on mouse embryo culture.  
 Levielle MC, J Assist Reprod Genet 9:45,1992  
 結論 ; IVF妊娠成立ヒト血清でもマウスの胚発育を促進し得なかった。  
 一部の HSAとすべての BSAは促進し得た。
- 48) Sera from woman with unexplained infertility inhibit both mouse and

- capacity of early bovine embryos. Weimar KE, Mol Reprod Dev 30:330,1991  
結論 ; 牛において顆粒膜細胞や卵管細胞との共培養は胚発育に有効。
- 11) Improvement of in vitro fertilization and early embryo development in mice by co-culture with human fallopian tube epithelium. Goldberg GM, Am J Obstet Gynecol 165:1802,1991  
結論 ; ヒト卵管上皮共培養はマウス胚発育にとっても有効。
- 12) Co-culture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. Menezo Y, Hum Reprod 7 suppl:101,1992  
結論 ; Vero cellsとの共培養はヒト着床不全患者には無効であった。
- 13) Evaluation of Vero cell co-culture system for mouse embryos in various media. Lai YM, Hum Reprod 7:276,1992  
結論 ; マウス胚発育に有効。development inhibitor の除去だろう。
- 14) Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell co-culture. Bongso A, Fertil Steril 58:569,1992  
結論 ; ヒトにおいて有効。embryotrophic factor releasing & detoxication だろう。
- 15) Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with oviductal epithelial cells originating from different stages of the estrous cycles. Thibodeaux JK, J Dairy Sci 75:1448,1992  
結論 ; 牛において、黄体期の卵管上皮細胞との共培養は有効。
- 16) Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilised in vitro and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. Xu KP, J Reprod Fertil 94:33,1992  
結論 ; 牛において、胚発育に有効。
- 17) Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. Yeung WS, Hum Reprod 7:1449,1992  
結論 ; ヒトにおいて、胚発育に有効。
- 18) Evaluating an in vitro culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co-culture. Thibodeaux JK, Reprod Fertil Dev 4:573,1992  
結論 ; 牛において、胚発育に有効。
- 19) Protein-free oviduct-conditioned medium for complete bovine embryo development. Mermillod P, Vet Rec 4:130,1992
- 20) Co-culture for embryo development:is it really necessary? Bavistar B, Hum Reprod 7:1339,1992  
結論 ; 共培養と通常の培養法の胚の質は同程度であった。



human embryo growth in vitro. Dokras A, Fertil Steril 60:285,1993

結論；原因不明不妊患者血清は、ヒト・マウス両胚の発育を阻害する。

### 3. その他の培養条件

49) Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos.

Umaoka Y, Molec Reprod Develop 31:28,1992

結論；マウスにおいて、5%酸素下で卵・胚を扱えばその培養効率は高い。

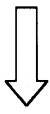
50) Effect of visual light on in vitro embryonic development in the hamster.

Umaoka Y, Theriogenology 38:1043,1992

結論；ハムスター胚において、1,600 luxと70 luxの比較では、70 lux下操作で胚発生効率が低い。

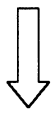
51) Evaluation of environmental factors affecting embryo development in vitro. Noda Y, 日産婦誌 44:960,1992

結論；細胞内活性酸素濃度は胚細胞障害の指標となりえる。それは DCHF-DA を用い蛍光強度で測ることができ、5%酸素下で最も低い。またL-Cystein と thioredoxin は胚発育を促進し細胞内活性酸素濃度を低下させた。



## 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:体外受精に際し,着床・生育の可能性が高い良好な胚(受精卵)を選別して少数個子宮内に移植すれば,多胎の防止が可能である。また胚の質が向上すれば,多数個の胚を移植することにより妊娠率を高めるという必要性がなくなる。そこで,ヒト胚の質を向上させるために現在世界でどのようなアプローチがなされているかを明らかにするために最近5年間の文献的考察を行なった。共培養,培養液,その他,に分類し検討した。

共培養では,卵管上皮細胞との組合せが胚発育に最も効果があるようであった。どんな因子がその本体であるかは,未だ正確には解明されていなかった。培養液に関しては,添加血清中の胚発育阻害因子が問題であった。ヒト血清アルブミン添加のみでも十分発育するとの報告もあった。その他に関しては,酸素毒性と光の胚発育阻害効果を指摘するものがあった。以上より,胚の質を向上させるための研究として,卵管上皮細胞より産生される胚発育促進因子の検出と,培養液添加ヒト血清中の胚発育阻害因子の除去(あるいは発育必須因子の抽出・添加)が期待されていることが判明した。