

平成9年度厚生省心身障害研究
「不妊治療の在り方に関する研究」

排卵誘発と着床環境
(分担研究：多胎妊娠の予防に関する研究)

分担研究報告書

研究協力者：滋賀医科大学医学部産科婦人科学教室 野田洋一

はじめに

卵胞の発育、排卵、受精、卵管における胚の発育、着床という一連の現象を経てはじめて妊娠が成立するが、この中で最も未解明の点が多いのは着床機構であろう。難治性不妊症に対する治療として急速に普及している体外受精胚移植をみても採卵成功率は92.8% (24,138/26,081)、移植回数/採卵回数は76.1%と良好であり、種々の問題点を包含しているとはいえ、着床までの過程はほぼ克服できているといえる。その一方で、移植当たりの妊娠率は22.1%にとどまっており(日産婦報告、1997)、しかも複数個の胚を移植していることを考えると、移植された胚の90%以上は着床に至っていない現状である。このように着床機構の解明は臨床的にも大きな命題であるにもかかわらず、未解明の点が多い主要な理由のひとつは適当な着床モデルの実験系が確立していないことであろう。胚を扱う必要があるのでヒトでの実験は施行困難であり、われわれは発生学の領域で幅広く研究されているマウスを用いて以下の検討を行い、まず着床機構の基礎的な解析を行った。

- I. 胚の存在による子宮内膜の胚受容能の変化についての検討
- II. 子宮内膜微小環境の修飾による胚受容能の変化についての検討
- III. *in vitro*培養胚の質的变化の検討(体外受精胚移植における着床不全の胚側の原因の検討)
- IV. 子宮内膜間質細胞*in vitro*脱落膜化系とこれを用いた着床モデルの確立(子宮内膜と胚の相互作用の検討)

方法と結果

I. 胚の存在による子宮内膜の胚受容能の変化についての検討

胚の存在そのものが受精卵の着床に影響を与えるかどうかを検討するために、マウス(ICR)を用いて以下の検討を行った。①交配翌日に子宮卵管移行部で両側卵管結紮を行い卵管内に胚の存在するマウス(卵管結紮妊娠マウス)、②偽妊娠マウス、③両側卵管結紮後交配を行ったマウス(卵管結紮非妊娠マウス)④両側卵管結紮後交配を行った偽妊娠マウス(卵管結紮偽妊娠マウス)の4種をrecipientとして、Day 4の胚を子宮内膜内あるいは子宮腔内に移植し、4群のrecipientにおける着床率(着床胚数/移植胚数)と妊娠率(妊娠個体数/移植個体数)を比較検討し、表1および2の結果を得た。すなわち、卵管内に胚が存在する場合(卵管結紮妊娠マウス)は存在しない場合に比べてimplantation windowが前後に拡大した。子宮内膜組織のPCNA免疫染色により、卵管結紮妊娠マウスはそれ以外のrecipientより間質細胞のPCNA陽性率が著明に高く、卵管内の胚が子宮内膜に作用して胚受容能を促進することが明らかとなった。

表1 子宮内膜内移植

	卵管結紮妊娠マウス		偽妊娠マウス		卵管結紮非妊娠マウス		卵管結紮偽妊娠マウス	
	着床率 (%)	妊娠率 (%)	着床率 (%)	妊娠率 (%)	着床率 (%)	妊娠率 (%)	着床率 (%)	妊娠率 (%)
Day 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	20.8	41.7	18.3	35.0	18.1	33.3	16.7	30.0
3	72.2	91.7	55.0	90.0	56.9	83.3	52.5	90.0
4	59.7	100.0	50.0	85.0	50.0	91.7	45.8	75.0
5	20.8	50.0	8.3	25.0	9.7	33.3	6.7	25.0
6	9.7	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表2 子宮腔内移植

	卵管結紮妊娠マウス		偽妊娠マウス		卵管結紮非妊娠マウス		卵管結紮偽妊娠マウス	
	着床率 (%)	妊娠率 (%)	着床率 (%)	妊娠率 (%)	着床率 (%)	妊娠率 (%)	着床率 (%)	妊娠率 (%)
Day 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	11.1	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	58.3	83.3	51.7	80.0	54.2	75.0	52.5	80.0
4	56.9	75.0	50.8	75.0	54.2	66.7	53.3	70.0
5	25.0	41.7	3.3	10.0	4.2	4.2	4.2	5.0
6	8.3	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

II. 子宮内膜微小環境の修飾による胚受容能の変化についての検討

子宮内膜内微小環境を修飾することにより胚着床率が改善するか否かを明らかにするためにマウス(ICR)において胚と各種生理活性物質との子宮内膜内共移植を試みた。移植には胚盤胞を用い、受卵雌には8~10週齢の同系偽妊娠マウスを用いた。生理活性物質はヒスタミン、プロスタグランジンE₂、プロゲステロン、hCGについて検討したが、ヒスタミン(100 μ M)との共移植でDay2受卵雌の着床率が改善(31.5%)し、implantation windowが前方に拡大した。マウス子宮内膜間質細胞の培養系にヒスタミンを添加(100 μ M)したところ脱落膜化の過程には何等影響が認められず、また孵化胞胚培養系にヒスタミン添加(100 μ M)を行ってもトロフォブラストの発育には何等影響が認められなかった。一方、胚・ヒスタミン共移植後の子宮内膜には著明な間質の浮腫が認められた。以上より着床率改善の機序はヒスタミンによる脱落膜化修飾作用あるいは胚発生促進効果を介したのではなく血管透過性亢進の機序を介した微小環境の変化によるものと考えられた。本研究により胚・生理活性物質の内膜内共移植によって着床率が改善される実験的根拠が得られた。

III. in vitro培養胚の質的变化の検討(体外受精胚移植における着床不全の胚側の原因の検討)

マウス胚のin vitro発生停止の原因を明らかにする目的で、受精後の第一、第二細胞周期における胚の超微形態・ミトコンドリア(MT)の挙動・構造ならびにATP量について検討した。過排卵処理マウスから排卵卵子を回収・媒精し、受精卵を実験に供した(vitro胚)。ローダミン123染色と共焦点レーザー顕微鏡(CLMS)を用いたMTの胚内分布の観察、

透過型電子顕微鏡 (TEM) による超微形態の観察、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応によるATP量の測定を経時的に行い、さらに5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) によるS期の同定を行い、*vivo*胚と比較した。*vitro*胚では受精卵の99%が2細胞期で発生停止した。*vivo*胚、*vitro*胚ともにMTは細胞周期に従い胚内を移動し、*vitro*胚では変性MTの経時的増加が認められた。胚内ATP量は*vivo*胚では時間経過に従い減少するのに対し、*vitro*胚では増加傾向を認めた。2細胞期*vitro*胚ではBrdU陽性細胞が74.8%を占め、超微形態学的にM期の特徴的所見は認めず、CLMS下でM期直前に特徴的な細胞膜直下のMT集合像がhCG投与66時間後の胚の54.3%に認められ、*vitro*胚では主として第二細胞周期S期以降M期直前に発生停止しており、MTが形態学的に障害を受けていることがことが明らかとなり、さらに細胞内ATP量の維持機構も破綻していることが示された。これらのことより、体外受精胚移植における着床不全の原因として培養胚側の因子も関与していることが示唆された。

IV. 子宮内膜間質細胞*in vitro*脱落膜化系とこれを用いた着床モデルの確立(子宮内膜と胚の相互作用の検討)

着床の過程で重要な役割を果たす子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化の現象を解析するために、マウスにおける*in vitro* 脱落膜化モデルの作成を試みた。未熟マウスよりESCを回収・培養し、培養液中にestradiol (E, 0.1nM)、progesterone (P, 100nM)を加え脱落膜化を誘起した。EとPの添加によりESCは、紡錘形から円形の大型細胞へと変化すると同時に、脱落膜蛋白の一つであるデスミンの産生能を有するに至った。また細胞質内には粗面小胞体の発達を認め、高い蛋白合成能を有する細胞に変化したことが示唆された。これらの変化は妊娠脱落膜細胞で観察されるものと同様であり、マウスにおける*in vitro*脱落膜化モデルの作成に成功したと考えられた。

着床過程における胚と子宮内膜間質細胞との相互作用を検討する目的で、*in vitro*マウス脱落膜化モデルを用いて胚の発育およびtrophoblastの子宮内膜間質への浸潤様式を観察した。4週令のマウス子宮内膜間質細胞を回収し、培養液中にestradiol (E₂, 0.1nM) およびprogesterone (P, 100nM)を加え脱落膜化を誘起した。E₂+P添加により細胞が肥大、多核化し、デスミンの発現を認め、超微形態学的に細胞質に粗面小胞体とミトコンドリアの発達、グリコーゲン顆粒の増加など脱落膜化を示唆する変化が認められた。培養9日目にこの子宮内膜間質細胞上に妊娠マウスから回収したblastocystを静置し共培養を行った。さらにE₂+P添加または非添加の条件下でblastocystをwellに直接静置し単独培養を行い、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて経時的に培養胚の発育および間質細胞とのinteractionを比較検討した。その結果、性ステロイドの添加の有無にかかわらず単独培養胚は培養12日目には剥離、脱落するのに対し、共培養胚は増殖を続け、子宮内膜間質細胞はtrophoblastのoutgrowthおよび胚の生存の維持に促進的に働いていることが示された。また共培養においてE₂+P添加群は無添加群 (対照群) に比して胚の面積が有意に増大し、E₂+P添加による脱落膜の誘起は胚のoutgrowthに対して促進的に働いていることが示唆された。超微形態学的に対照群ではtrophoblastが間質細胞の間に浸潤している像を認めるのに対し、E₂+P添加群では*in vivo*と同様にtrophoblastと間質細胞との境界が明瞭であり、trophoblastが間質細胞の間に浸潤している像は認められなかった。このように脱落膜は胚の増殖を促進する一方、trophoblastの浸潤を制御することが*in vitro*の着床モデルにおいて示された。さらに対照群の間質細胞においても共培養によりE₂+P添加群で認められた脱落膜変化が観察され、胚から脱落膜化促進因子が放出されている可能性が示された。

考 察

体外受精胚移植法をはじめとするAssisted Reproductive Technologies (ART) は難治性不妊症の治療法として急速に普及しつつあるが、卵巣刺激による多数の卵胞の同時発育や卵巣過剰刺激症候群、あるいは複数胚の移植に伴う多胎妊娠の頻発という問題点を残し

ている。これらを防止するためには卵巣刺激法の改良も必要であるが、その背景には胚の着床率が低いという根本的な克服すべき問題が存在することを忘れてはいけない。着床機構の解明が重要であるゆえんである。着床機構の研究を阻む因子として適当な着床モデルが存在しないことが大きい。われわれはまずこの着床モデルの作製とともに着床機構の基礎的検討を行った。

まず、implantation windowが胚の存在そのものによって、あるいはヒスタミンによる子宮内膜微小環境の修飾によって拡大あるいは移動させうることを明らかにした。体外受精胚移植においては通常受精後2日目というimplantation windowから逸脱した時期に胚移植が行われており、このことが胚の着床率が低い一因と考えられているが、本研究はこの問題を解決する端緒となりうるものと考えられる。

次に、胚の着床率が低い原因として胚側の問題も存在することをvitro胚とvivo胚の間のミトコンドリアの形態とATP産生の面から明らかにした。体外受精胚移植法における胚培養法の改良に新たな視点を提供するものと考えられる。

さらに、着床の本態とも考えられる胚と子宮内膜との相互作用をマウスを用いた着床モデルを作製することにより検討した。これにより、脱落膜化が胚の発育ばかりか、絨毛細胞の増殖様式をも制御していることが明らかとなり、脱落膜化の意義の解明に大きく寄与するものと考えられる。本モデルを用いて今後着床機構の解明がさらに進むものと期待される。

今後着床機構からみた多胎妊娠の防止について、臨床的検討も含めてさらに研究を進展させていく予定である。

文 献

1. 和久田晃司、喜多伸幸、石紅、高倉賢二、野田洋一：マウス卵管内胚の存在が子宮内膜増殖能に及ぼす影響。産婦人科の進歩 48:254-257, 1996
2. 喜多伸幸、和久田晃司、廣瀬雅哉、高倉賢二、野田洋一：マウス着床後初期胚周囲脱落膜組織における増殖能の検討。産婦人科の進歩 48:258-260, 1996
3. 石川弘伸、高倉賢二、山出一郎、林嘉彦、後藤栄、廣瀬雅哉、野田洋一：マウス子宮内膜間質細胞を用いた*in vitro*脱落膜化モデルの作成。産婦人科の進歩 49:193-204, 1997
4. 林嘉彦、高倉賢二、山出一郎、石川弘伸、石紅、後藤栄、和久田晃司、野田洋一：マウスにおける子宮内膜内微小環境修飾による着床率の改善。産婦人科の進歩 49:516-527, 1997
5. 廣瀬雅哉、喜多伸幸、石紅、高倉賢二、野田洋一、岡部英俊：マウス胚発生能に及ぼす体細胞との共培養の効果と胚発育促進因子同定の試み。産婦人科の進歩 49:528-542, 1997
6. Wakuda K, Takakura K, Kita N, Shi H, Hirose M, Noda Y: Embryo-dependent induction of embryo receptivity of mouse endometrium. J Reprod Fertil (in press)
7. 石紅、後藤栄、廣瀬雅哉、増田善行、高倉賢二、野田洋一、藤宮峯子、前田敏博：In vitroマウス着床モデルによる脱落膜細胞・胚相互作用の解析。産婦人科の進歩 (in press)
8. 後藤栄、高倉賢二、野田洋一：不妊症治療と多胎の防止。産婦人科治療 (in press)



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



はじめに

卵胞の発育、排卵、受精、卵管における胚の発育、着床という一連の現象を経てはじめて妊娠が成立するが、この中で最も未解明の点が多いのは着床機構であろう。難治性不妊症に対する治療として急速に普及している体外受精胚移植をみても採卵成功率は92.8%(24,138/26,081)、移植回数/採卵回数は76.1%と良好であり、種々の問題点を包含しているとはいえ、着床までの過程はほぼ克服できているといえる。その一方で、移植当たりの妊娠率は22.1%にとどまっており(日産婦報告、1997)、しかも複数個の胚を移植していることを考えると、移植された胚の90%以上は着床に至っていない現状である。このように着床機構の解明は臨床的にも大きな命題であるにもかかわらず、未解明の点が多い主要な理由のひとつは適当な着床モデルの実験系が確立していないことであろう。胚を扱う必要があるのでヒトでの実験は施行困難であり、われわれは発生学の領域で幅広く研究されているマウスを用いて以下の検討を行い、まず着床機構の基礎的な解析を行った。

- . 胚の存在による子宮内膜の胚受容能の変化についての検討
- . 子宮内膜微小環境の修飾による胚受容能の変化についての検討
- . in vitro 培養胚の質的变化の検討(体外受精胚移植における着床不全の胚側の原因の検討)
- . 子宮内膜間質細胞 in vitro 脱落膜化系とこれを用いた着床モデルの確立(子宮内膜と胚の相互作用の検討)