平成６年度厚生省心身障害研究
「多胎妊娠の管理及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　　滋賀医科大学　医学部
野田洋一

要約　：体外受精胚移植法やギフト法など生殖補助医療技術の進歩に伴いこれまで妊娠する事が不可能であった不妊夫婦にもわが子を得る事ができる時代になった。この事は不妊に悩む夫婦にとって大きな福音となるのであるが同時に副次的にもたらされる多胎妊娠例の増加は生まれてくる新生児に対して潜在的なリスクとなるとともにこれの治療に当たる新生児集中管理室（ＮＩＣＵ）の管理運営にも大きな影響をもたらす事になり、大きな社会問題となりつつある。　これまで、より高い妊娠率を求めて多数の胚を移植する事が行われていたが、妊娠率を下げずに移植胚数を下げるためには胚がより高い発生能を持つような新しい培養法を開発する事や、或いはより高い着床率を得るための胚移植法を開発する必要があると思われる。
そこで、ヒト胚の質を向上させるために現在世界でどの様な試みがなされているか、また胚移植後の着床率を向上させる為にどの様な試みがなされてきたのかを明らかにするため最近５年間の仕事について文献的検索を行った。
その結果、（１）これまでどの様な基本培養液をヒト胚培養に用いても本質的には培養効率は代わらず、
（２）培養効率を高くするために加えられた添加物は、血清の代わりにヒト血清アルブミンの添加のみで充分な胚発生効率の得られる事が明らかになっており、
（３）基本培養条件の設定可及的に酸素濃度を下げ、また体細胞との共培養を行う事によって何れも高い胚発生効率を得る事に成功している。
（４）胚移植法に関しては、移植用のカテーテルの形状や材質の開発、移植の部位、或いは移植時に用いる接着因子の効果などが工夫されているが、何れも胚移植後の着床率を大幅に改善する決め手とはなっていない。
（５）胚移植のタイミングや子宮内膜内胚移植なども試みられているがこれも形態良好胚を移植して場合にのみ高い着床率を得る事が判明しており単に胚移植の方法のみを改善しても着床率は向上しな

い事が明かとなった。

（６）以上をまとめると、着床率を向上させて移植胚数を減じても妊娠率が低下しない様な条件の設定は単に移植技術の開発のみならず胚培養条件の検討などとも関連して研究開発を進める必要がある事が明らかになった。

（７）この研究を通じてた数の胚を移植する必要がなくなり、ひいては多胎妊娠率の低下が達成される事が期待される。

見出し語：体外受精、培養条件、子宮内膜内移植、

研究方法：

（１）　調査期間；　１９９０年より１９９５年までの５年間

（２）　調査方法；　Medlineおよび手作業による文献検索

（３）　調査対象；　欧米及び日本の主たる生殖医学雑誌

以上の条件を満たす論文106編を選びうち精選した30編を収載した。

結果

はじめに

１９７８年、最初の体外受精児の誕生が報じられて以来、体外受精胚移植法（ＩＶＦ－ＥＴ：本法）は全世界で試みられるようになり、現在までに本法によりおよそ１０万人の児が誕生しているものと推定されている。この間本法の妊娠率向上に資するため多くの技術開発が試みられてきた。排卵誘発法の改良、胚培養法の開発、胚移植法の開発、黄体期サポートに関する様々な試み、等がそれである。

しかし近年、この様な試みがある程度の妊娠率の向上をもたらしたあと明らかになった事は、本法は決して完成された治療法ではなく、今後解決されるべきいくつかの問題を抱えていると言う事である。

それは、今なお妊娠率及び胚移植当たりの生産率が低いという事、男性因子による不妊症の治療効率の低い事であり、また高い妊娠率を求めて行われる多数の胚を移植する事による多胎妊娠率の極端に高い事である。　とりわけ多胎妊娠率の高い事は周産期医療全体に深刻な影響を及ぼしつつあり、早期にその対策の望まれているところである。

本研究における当分担研究者に与えられたテーマは「生殖補助医療技術の改善による多胎防止の研究」であるので当研究協力者は胚培養条件及び胚移植法に関してこれまで積み重ねてこられた仕事を追跡し、この領域に残された問題点を文献検索をとうして明らかにし以下に結果をのべる。

１．胚培養法の発展の歴史　　文献(1-7)

ほ乳類胚培養のこれまでの発展を省みる事は意味があると考えられるので此処に

まず簡単に述べる。

ヒト卵と精子を試験管内で反応させて生じた胚を母体に移植する事は比較的近年になって行われるようになった技術である。 1973年にde Kretzer(1)が、つづいて1976年にSteptoe and Edwards(2) がヒト胚の試験管内受精の成立と胚移植の事実を報告し、1978年になってSteptoe abd Edwards(3)が試験管内受精卵の移植による最初の出産例を報告したのがこの領域が大きく発展するきっかけとなった。

しかしヒトで最初の成功が報告される遙か以前からほ乳類胚の試験管内受精・胚移植は試みられてきていた。Heape W によって既に1891年にウサギに胚移植を行った記録が発表されている(4)。 この仕事がきっかけになって多くの科学者がほ乳類について試験管内受精及び胚培養を試みるようになったが当時培養条件等の設定が困難であり、充分な胚培養条件が得られるまでに数十年を要している。1956年Whitten(5)がchemically defined medium によってマウス胚の培養が可能である事を明らかにし、McLaren and BiggersらはHeape およびWhitten の仕事に立脚してマウス8-細胞期胚をblastocystまで培養し、これを受卵雌に移植して産子を得ている(6)。この様にして試験管内胚培養及び胚移植法によって産子が得られる事になったが試験管内で受精を成立させることはなお困難であった。

確かな根拠をともなって試験管内受精の成立した事が報告されたのは1959年にChangがウサギについて行った実験(7)が最初である。Chang は受精の成立には予め精子のccapacitation-受精能獲得-が必要である事を発見し、それまでだれも成し得なかった試験管内受精を成功させたのである。この様にして試験管内受精、胚培養及び胚移植法が何れも可能になりそれ以後ほ乳類胚の試験管内受精及び胚培養技術は大きく進展する事になった。

2．ヒト胚培養条件と培養効率

2-a 基本培養液 文献(8-11)

ヒト体外受精胚移植法(IVF-ET)による最初の出産例(3)は試験管内受精及び胚培養を完全培地であるHam's F-10 + 10% Serum(patient)で行っていたため当初Ham's F-10が主として試みられた。しかし、既にWhittennらの仕事によりchemically defined medium によってマウス等ではblastocystまで発生する事が知られていたのでヒト胚培養についても各種の培養液が試みられるようになった。

Quinnらはhuman tubal fluidの電解質組成に類似したややk^+濃度の高い培養用不完全培地、通称Quinn's HTFを開発しそれまで主流であったHam's F-10より優れた培養効率が得られる事を報告した(8)。Ham's F-10 mediumについてはその後培地に含まれているHypoxanthineが胚発生に対して阻害的に働くことが明らかになったため(9,10,11,) Eagle's MEM或いはMenezo's B2など他の培地が次第に主流を占めるようになってきている。不完全培地のなかでこれまでヒト胚培養にもちいられてきたのはEarl's solution(12)である。ベルギーのFree University のグループ(Staessenら; 1994)は長年用いてきたEarl's solutionとこれにアミノ酸及びビタミンを添加したMenezo's B2を比べた結果4-cell率、胚移植後の妊娠率、移植胚数当たりの着床率のいづれについても有意差の無い事を確認している。 この様に市販されている

多くの培地はそれぞれある程度の胚発生効率を保証することが明らかになっているが決定的に効率のよい優れた培地は定まっていない。

2-b 培養液添加物　　文献(12-13)

基本培養液に各種の生理的物質或いは生理活性をもっている物質を添加する事によって胚発生効率を改善する試みが数多くなされてきている。

タンパク質を培養液に無添加であるか或いはヒト臍帯血清、患者血清、ヒト血清アルブミン、或いは牛血清アルブミンをそれぞれの基本培養液に添加する試みが報告されているが何れにおいても胚発生効率に決定的な差異は無く、蛋白の添加は血清アルブミンが培地に存在すれば充分で、成長因子を添加すると言った意味合いでは血清の添加は不必要である(12)。Epidermal Growth factor(EGF)を培地に加えて胚発生効率の改善する報告がマウス胚でみられるが(13),ヒト胚培養においては顕著な効果は認められずまだ一般的でない。

2-3 胚培養条件の設定　　文献(14-15)

マウスを中心とした胚培養技術は大きく改良されヒトに応用されているが、in vitroにおける胚培養効率自体はヒト及びマウスでも決して高いものではなく、これは単に培養液の組成を工夫するだけでは越え難い壁がある事が既にこれまでの研究で明らかになっている。　マウス、ラット、ハムスター、ヒツジ、ウシ等これまで胚培養が試みられたあらゆるほ乳類胚について試験管内胚発生遅延或いは発育停止の現象が生ずる事が知られている。この現象は単に培養液の組成が不十分であるのみならず、胚を取り扱うin vitroの環境条件がin vivo と大きく異なるために生ずると考えられ、これまで培養条件に対する工夫が数多く試みられてきている。その一つは胚がin vitroでちょり扱われるときに生ずる酸化的ストレスから胚を保護する必要があるとするものである(14)。 Nodaらはin vitroでヒト胚を取り扱う際に終始5%酸素下でまた低照度下でこれを行いBlastocyst率が60%に達し、胚培養効率が上昇したと報告している(15)。しかしこの様に胚培養効率が上昇してもin vivoにおける発生効率には遙かに及ばずまた着床率も胚発生効率が改善された事に見合うだけの改善を示さない事も同時に明らかになっている(15)。

2-4 胚・体細胞共培養　　文献(16-24)

In vivoとin vitro の発生効率の違いがもたらされる基本的な要件の1つが体細胞の影響を受けるかどうかである事からヒト胚培養においても体細胞との共培養が試みられている(16,17,18,19,20,21,22)。　用いられたる体細胞は、Vero cell, human cumulus cell、 human endometrial cells,ヒトおよびウシ卵管上皮、等であり、何れも発生効率が上昇し、また着床率が上昇したとしているが、blastocyst率はせいぜい60%程度であり、また着床率も50%を越える事は報告をみる限りは困難なようである。さらに共培養における発生促進効果はその機序が不明で、embryotrophicに働く物質は同定されず、おそらく体細胞がdetoxicationに働くのであろうとの考えもある。また体細胞由来に胚に対してviral infection(23)が成立する可能性や、また少ないながらもnuclear materialが胚にtransferされる可能性が否定できずその臨床応用には慎重であるべきであるとの意見もある。更に体細胞を常時用意しておく事も手間がかかり煩雑である。更に加えて、ヒト胚と体細胞の共

培養については果たして本当に促進効果があるのであろうかとの抜本的疑問(23)を呈する意見もあり共培養法は今後更に検討を要する課題となっている。

3．胚移植のタイミング

ヒト胚に対する培養条件の設定は極めて重要な問題であり、これまでの項で述べた如く多方面からの試みがなされてきたが、胚自体の発生過程における生物学的特質が今なお未知の点が多く存在する事もあって、今なお充分な培養効率を達成するに至っていない。培養効率の低いことはblastocyst率がせいぜい60%程度しか得られない事によって端的に表され、またin vivo での発生に比べて細胞周期がおそく母体の子宮内膜の成熟に比べて遅れる事である。 そのために、世界で行われている胚移植のタイミングは通常媒精後40-48時間に行われる事が多く、この時の胚は2-cell或いは4-cell程度の時期であって、in vivoで進行する着床の開始まで72時間程度は子宮内で発生をつづける必要がある。 この様に早い時期に胚移植を行う理由はさきに述べた発生遅延による子宮内膜とのタイミングのずれを起こさないためにin vitroよりは少しでも環境条件の良さそうな子宮in vivoへ早く胚を戻そうとするもので、世界を見渡してもblastocystの移植を試みた報告はあるが(24)こののの時期まで待って移植をした方がよいとするラボラトリーは存在しない。この様に胚移植に関する基本的な要件が胚培養効率の低さによって規制されている。

3-1胚移植の方法　　文献(25-30)

胚移植に付いての方法で最も注目すべきは従来行われていた子宮腔内胚移植に代わって子宮内膜内胚移植が試みられるようになってきた事である。Gotoらは(25,26)マウスを用いて胚移植した後の胚の行方を詳細に調べたところ、子宮内膜の胚受容能と胚の発生時期とのタイミングがずれた場合には着床は成立しないがその場合、胚は子宮外へ排泄されている事が明らかになった。そこで子宮内膜内へ胚を移植すると従来着床の成立しなかった子宮内膜ー胚の組み合わせでも着床の成立する事を明らかにした。 この様な実験的根拠にもとづいてヒトでも子宮内膜内移植が試みられこれもある程度の成功を納めているが(27),最終的な着床率は従来の子宮腔内移植と同程度でまだ改善の余地はあるものの現在はまだ着床率を挙げる最終的な決めてとはなっていない。

その他胚移植に際しての技術改良に関しては、胚移植用のカテーテルの改良(28)や胚移植に際して用いる添加物(29)や胚移植の部位(30)などに付いて議論があるが、何れも枝葉末節の事柄と考えられるので此処では議論しない。

4．まとめ

これまで検討した事をまとめると以下の如く述べる事ができる。

ヒト胚培養は今なお不十分な技術でありそのため、培養して得られた胚の発生能が充分であるとは考えにくい。またin vitroにおける発生遅延があるためblastocystまで待って胚移植する事は出来ない。よって子宮内胚移植は生理的な発生過程を無視して媒精後４０－４８時間に移植をしている。この事が胚移植後の着床率に大きく影響を及ぼしている可能性がある。

患者の期待に答えるべくより高い妊娠率を求めて多数の胚を移植している現在の胚移植法が抜本的に改善され、これを通じて多胎妊娠の発生を極力抑える事を可能

にするためには、これまで報告のあった胚培養法のそれぞれに付いて検証すると共に着床の過程におよぼす各種体細胞の役割を解析しより合理的な胚培養、移植法を開発する必要があり、これなくしては本質的な解決にはいたらないものと考える。

厚生省班研究参考文献集

1. Transfer of a human zygote.
de Kretzer D, Dennis P, Hudson B, Leeton J, Outch K, Talbot J, Wood C,
Lancet !!: 728-729, 1973.

2. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy.
Steptoe P C, Edwards R G,
Lancet!, 880-882, 1976.

3. Birth after the reimplantation of a human embryo.
Steptoe P C, Edwards R G,
Lancet!!: 366, 1978.

4. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uteine foster-mother.
W Heape.
Proc R Soc. 48:457-458, 1891.

5. Culture of tubal mouse ova.
Whittenn W K .
Nature. 177: 96, 1956.

6. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryos.
McLaren A and Biggers J D
Nature. 182: 8770878, 1958.

7. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tube.
M C Chang.
Nature, 168: 697, 1951.

8. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid.
P Quinn, J F Kerin, G M Warness.
Fertil Steril. 44: 493, 1985.

9. In vitro deleterious effect of hypoxanthine in Ham's nutrient mixture F-10 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development.
M C Bastias, S T McGee-Belser, S H Bryan, J M Vasquez,
Fertil Steril. vol.60. 876-880, 1993.

10. A preliminary trial of human zygote culture in Ham's f-10 without Hypoxanthine.
D C Loutradis, A A Kiesslinf, K Kallianidis, K Siskos, G Creatsas,
S Michalas, D Aravantinos,
J Assist Reprod genet. 10:271-275, 1993.

11. In vitro deleterious effect of hypoxanthine in Ham's nutrient mixture F-10 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development.
M C Bastias, S T McGee-belse, S H Bryan, J M Vasquez,
Fertil Steril. vol.60. 876-880, 1993.

12. Contrlled comparison of Eagle's balanced salt solution withMenezo B2 medium for human invitro fertilization performance.
C Staessen, E Abbeel, C Janssenswillen, P Devroey and
A C Steirteghem.
Hum Reprod. vol.9. 1915-1919, 1993.

13. Preimplantation embryo development enhanced by epidermal growth factor.
R A Buyalos, X Cai.
J Assist Reprod genet. 11: 33-37, 1993.

14. Embryo development in vitro.
Y Noda.
Assisted Reprod Reviews.

15. Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's nedium under low oxygen tension and low illumination.
Fertil Steril. vol. 62. 1022-1027, 1994.
Y Noda, Y Goto, Y Umaoka, M Shiotani, T Mori.

16. Vero cell effect on in-vitro human blastocyst development: preliminary results.
Human Reprod. vol9, 1131-1135, 1994.
R Schillaci, R Ciriminna and E Cefalu.

17. Assisted hatching with or without bovine oviductal epithelial cell co-culture for poor prognosis in-vitro fertilization patients.
Human Reprod. vol.9, 1528-1531, 1994.
M J Tucker, P E Ingargiola, J B Massay, P C Morton, K E Wiemer, S R Wicker andG Wright.

18. Improved pregnancy rate sfter transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture.
Fertil Steril. vol 58.569-574, 1992.
A Bongso, B Marshall, S C-Ng, R Edirisinghe, C Y-Fong, S Ratnam, C Anandakumar.

19. Use of coculture with cumulus cells in insemination medium in human in vitro fertilization
P Quinn.
J. Asssis. Reprod. Genet. vol.11. 270-277, 1994.

20. In vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibloblast cells.
K E Wiemer, J Cohen, G F Amborski G Wright, S Wiker, L Munyakazi, R A Godke.
Human Reprod. vol.4:595-600,1989.

21. Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports.
N Ouhibi, J Hamidi, J Guillaud, Y Menezo.
Human Reprod. vol.5: 737-743, 1990.

22. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells.
Y Menezo, J-F Guerin, J-C Czyba.
Biol. Reprod. vol.42. 301-306, 1990.

23. Co-culture for embryo development: Is it really necessary?
B D Bavister.
Hum Reprod. vol.8. 1160-1162, 1993.

24. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage.
F Olivennes, A Hazout, C Lelaidier, S Freitas, R Fanchin, D Ziegler, R Frydman.
Hum Reprod. vol.9. 2367-2373, 1993.

25. Pergnancy achieved by transferring blastocysts into endometrial strma in mice.
Y Goto, Y Noda, K Narimoto, Y Umaoka, T Tokura, T Mori.
Human Reprod. 7: 681-684, 1992.

26. The fate of embryos transferred into the uterus.
Y Goto, Y Noda, M Shiotani, J Kishi, T Nonogaki, T Mori.
J Assist Reprod Genet. 10: 197-201, 1993.

27. Transvaginal-Transmyometrial embryo transfer: the Towako method; experiences of 104 cases.
O Kato, R Takatuka, R Asch,
Fertil Steril. 59.: 51-53, 1993.

28. Difficult embryo transfermanaged with coaxial catheter system.
P E Patton, E M Stoelk
Fertil Steril. 60.: 182-183, 1993.

29. Assessment of embryo transfer after in-vitro fertilization; effects of glycerol trinitrate.
A G Shaker, R Fleming, M E Jamieson, R Yates, J RTCoutts.
Human Reprod. 8: 1426-1428, 1993.

30. Non-surgical tubal embryo transfer.
R Guidetti, J P Balmaceda, T Ord, R H Asch.
Hum Reprod. vol.5.221-224, 1990.

Report of Alloted Study

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Shiga University of Medical Science
Yoichi Noda

Recently, it became possible for infertile couples, who had previously been incapable of conception to have a child by advances in assisted reproductive technologies, such as in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET) or gamete intrafallopian transfer (GIFT). Although this is a boon for the infertile couple, the secondary increase in the incidence of multiple pregnancies can pose a latent risk for the infant to be borne. In addition, these new techniques will affect the supervision and management of neonatal intensive care units (NICU) greatly, which could create a big social problem. Previously, multiple embryos had been transferred to raise the rate of pregnancy, However, the development of novel methods of culturing the embryo to an advanced stage of development or of embryo transfer methods with a high implantation rate are required in order to decrease the number of transferred embryos without decerasing the overall pregnancy rate. Therefore, studies from last 5 years were reviewed in order to summarize efforts taken to improve the quality of human embryo culture and the implantation rate after embryo transfer.

The results were as follows.

(1) There was essentially no change in the culture efficiency between the basic culture media used.

(2) Regarding additives to improve culture efficiency, it was indicated that the addition of human serum albumin instead of serum increased the efficiency of embryo development.

(3) High embyo development efficiency was obtained by decreasing the oxygen tension , or by co-culturing with somatic cells within the established range of culture conditions.

(4) Efforts have been made regarding the composition and shape of the catheter used for the transfer, the area of the transfer, and the effect of adhesive nolecules used in the transfer. However, none of these studies have led to

improved implantation rates after embryo transfer.

(5) More precise timing for the embryo transfer or intraendometrial enbryo transfer has also been attempted. High implantation rates were obtained only when a morphologically superior embryo was transferred, indicating that an improvement in the embryo transfer method by itself dose not increase the implantation rate.

(6) In short, in order to obtain an increased implantation rate with a decreased number of transferred embryos, but without a decreased pregnancy rate, it is apparent that both the development of superior transfer techniques and also studies to improve the conditions of the embryo culture are required.

(7) With this study, a decreased rate of multiple pregnancies is expected because of the decreased number of transferred embryos.

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:体外受精胚移植法やギフト法など生殖補助医療技術の進歩に伴いこれまで妊娠する事が不可能であった不妊夫婦にもわが子を得る事ができる時代になった。この事は不妊に悩む夫婦にとって大きな福音となるのであるが同時に副次的にもたらされる多胎妊娠例の増加は生まれてくる新生児に対して潜在的なリスクとなるとともにこれの治療に当たる新生児集中管理室(NICU)の管理運営にも大きな影響をもたらす事になり、大きな社会問題となりつつある。これまで、より高い妊娠率を求めて多数の胚を移植する事が行われていたが、妊娠率を下げずに移植胚数を下げるためには胚がより高い発生能を持つような新しい培養法を開発する事や、或いはより高い着床率を得るための胚移植法を開発する必要があると思われる。そこで、ヒト胚の質を向上させるために現在世界でどの様な試みがなされているか、また胚移植後の着床率を向上させる為にどの様な試みがなされてきたのかを明らかにするため最近5年間の仕事について文献的検索を行った。
その結果、
(1)これまでどの様な基本培養液をヒト胚培養に用いても本質的には培養効率は代わらず、
(2)培養効率を高くするために加えられた添加物は、血清の代わりにヒト血清アルブミンの添加のみで充分な胚発生効率の得られる事が明らかになっており、
(3)基本培養条件の設定可及的に酸素濃度を下げ、また体細胞との共培養を行う事によって何れも高い胚発生効率を得る事に成功している。
(4)胚移植法に関しては、移植用のカテーテルの形状や材質の開発、移植の部位、或いは移植時に用いる接着因子の効果などが工夫されているが、何れも胚移植後の着床率を大幅に改善する決め手とはなっていない。
(5)胚移植のタイミングや子宮内膜内胚移植なども試みられているがこれも形態良好胚を移植して場合にのみ高い着床率を得る事が判明しており単に胚移植の方法のみを改善しても着床率は向上しない事が明かとなった。
(6)以上をまとめると、着床率を向上させて移植胚数を減じても妊娠率が低下しない様な条件の設定は単に移植技術の開発のみならず胚培養条件の検討などとも関連して研究開発を進める必要がある事が明らかになった。
(7)この研究を通じてた数の胚を移植する必要がなくなり、ひいては多胎妊娠率の低下が達成される事が期待される。