

平成7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」

胚一体細胞共培養は妊娠率を向上させることができるか
(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 産科婦人科教室 廣瀬雅哉、喜多伸幸、石紅
高倉賢二、野田洋一

要約 : 多胎妊娠を予防し且つ高い妊娠率を得るためには、in vivoにより近い発生能を有する胚を少数移植することが望ましく、これをうるため培養法の改善が求められる。今回、われわれは初期胚培養法として数種の体細胞を用いた胚の共培養を試み、より高い胚発生効率が得られるか、また、その後の着床現象にいかなる効果をもたらすかについて動物実験モデルを用いた検討を行った。胚はマウス前核期胚を用い、ウサギ卵管上皮細胞、同子宮内膜上皮細胞、ヒト皮膚線維肉腫細胞樹立株、同脂肪肉腫細胞樹立株、マウス腹腔マクロファージ、モルモット腹腔マクロファージとの共培養を試みた。胚培養に0.3%BSA加BWWを用い、基本培養条件は37.0℃、5%CO₂ in airとした。腹腔マクロファージはマウス、モルモットの種にかかわらずcontrolに比しDay 5の胚盤胞率が有意に高値を示したが、その他の共培養系ではcontrolと同程度、或いはそれ以下であった。しかしモルモット腹腔マクロファージの条件付け培地では、逆に胚発育は抑制された。また、子宮腔内移植によって共培養の着床率に及ぼす効果を検討したが、有意な差は認められなかった。したがって現在のところマクロファージとの共培養は胚発育においてはその形態的改善をもたらすが、個体としての発生能を向上させるまでには至らず、今後の課題として共培養条件の詳細な検討や、胚発育促進因子の解析などが必要であると考えられた。

見出し語 : マウス、初期胚、共培養、マクロファージ、胚移植

はじめに

初期胚はIn-vivoでは卵管上皮細胞に囲まれて存在し、極めて効率よく発育するがin-vitroでは高率に胚発育停止、遅延を生じる。これは受精から着床に至る過程において卵管が胚にとって至適な生育環境を提供しているのに対し、in-vitroではそれが損なわれているためであると考えられる¹⁾。in-vitroでの胚発育を成功させることを目的とした研究は、主に卵管内環境や子宮内環境を解析し^{2)~8)}それを模倣^{9),10)}、それを修飾していく試み^{11)~14)}を中心として行われてきた。また、培養液の組成のうち、電解質^{15),16)}、浸透圧¹⁷⁾、エネルギー源^{18),19)}、アミノ酸²⁰⁾、核酸前駆物質²¹⁾、Growth factor²²⁾などの添加、組成変更が胚発育に及ぼす影響についても検討されてきた。他方in-vitroの胚ではin-vivoの胚発生条件より高濃度の酸素下で発育を続けることから培養条件の酸素濃度を下げることや、EDTAなどのキレート剤添加により胚培養成績が向上する事実からin-vitro胚は酸化的ストレス²³⁾にさらされている事が明らかになったり、また培養液中に出現するアンモニア²⁴⁾などの胚発育阻害因子が同定されるなど、in-vitroで見られる胚発生阻害の原因を同定しこれを解決する試みもなされてきた。

これらの試みとともに、Whittinghamら²⁵⁾の器官培養に端を発した体細胞を用いた共培養が卵管内環境や子宮内環境をin-vitroに持ち込む一つ的手段として試みられ、in-vitroにおいて良好な胚発育をもたらすことが数多くの研究によって示されている。しかし、これらの研究により共培養によって得られる種普遍的な胚発生促進物質(embryotropic factor)の存在や、胚発生阻害物質の除去作用(detoxification)などの存在が示唆されてはいるものの未だ同定されるには至っておらず、Bavister²⁶⁾のように共培養の効果そのものに疑問を呈する意見もある。またすでに胚-体細胞共培養はヒトのAssisted reproductive technology (ART)の一部としても使用されている^{27)~29)}が、その有用性は十分には示されておらず、同時にウイルス感染や、崩壊した核内物質の胚への混入など問題点を残していることも事実である。

今回、数種の体細胞を用いた胚の共培養を試み、より高い胚発生効率を得られるか、

またその後の着床現象にいかなる効果をもたらすかについて動物実験モデルを用いた検討を行った。

実験材料および方法

I、各種体細胞の回収と調整

1、マウス前核期胚の回収

5週齢雌マウス（Institute of Cancer Research、ICR、日本クレア）にpregnant mare serum gonadotropin（PMSG、セロトロピン、帝国臓器）5IU/animalを腹腔内投与し、その48時間後にhuman chorionic gonadotropin（hCG、ゴナトロピン5000、帝国臓器）5IU/animalを腹腔内投与後、成熟雄マウス（ICR、日本クレア）と同居、交配させた。翌朝膈栓を確認したマウスの卵管をhCG投与17時間後に摘出し、scratch法にて前核期胚を回収、0.1%Hyaluronidase（Sigma co. Type1-S, EC3.2.1.35）-D-PBS（PBS、日水製薬）にて卵丘細胞を除去、PBSにて洗浄後、それぞれの培養条件で1 wellあたり10~20個ずつ導入し培養に供した。

2、ウサギ卵管上皮細胞および子宮内膜上皮細胞の回収

2.5kg~3kgの雌ウサギ（日本白ウサギ、紀和実験動物）より両側卵管と子宮体部を摘出、PBSで数回洗浄後、実体顕微鏡下に卵管周囲結合組織を除去後、長軸方向に切開し内腔を開き、PBSで数回洗浄後、2~3mm角に細切、0.25%Trypsin（Difco co. EC3.4.21.4）-PBS中で37°C、60分間反応させた。軽くpipettingし、浮遊する組織細片を回収、1000rpm、5分間遠心分離し、PBSで遠心分離、洗浄を2回繰り返した。10%Fetal calf serum（FCS）-Eagle's Minimal Essential Medium（MEM、Gibco co. Penicillin G, Storeptomycin添加）で細胞浮遊液を作製し、100mm Petri dish（Nunc. co.）に播種した。60分後に培養液を回収することにより純度の高い卵管上皮細胞の集団を回収した。MEMで3回洗浄し10%FCS-MEMで細胞浮遊液を作製、 5×10^5 cell/mlの濃度で24well

dish (Falcon co. 3847) に1mlずつ播種した。3日後にconfluentに達した段階で Biggers-Whitten-Whittingham medium³⁰⁾ で4回洗浄し、0.3% bovine serum albumin (BSA, Sigma co. No.A4378) -BWWで置き換え、mineral oil (Nacalai tesque inc.Specially prepared, 8020-83-5) 0.5mlで覆い、基本培養条件下で翌日の胚培養開始まで一晩平衡化させ、翌日の胚培養に供した。子宮体部からの子宮内膜の回収も同様に行った。なお、本研究におけるすべての培養液の調整には、nano pure water (E pure, Barnstead社) を用いた。また基本培養条件は、37℃、100%湿度、5%CO₂ in airとした。

3、ヒト皮膚線維肉腫細胞、ヒト脂肪肉腫細胞の調整

ヒト皮膚線維肉腫樹立細胞株、ヒト脂肪肉腫樹立細胞株を継代培養し、0.1%trypsin-0.02%EDTA-PBSで剥がし、MEMで1回洗浄し、トリパンブルーで細胞数を計数し、10%FCS-MEMで細胞浮遊液を作製、 5×10^4 cells/mlの濃度で24well dishに1mlずつ播種した。4日後にほぼconfluentに達した段階でBWWで4回洗浄し、0.3%BSA-BWWで置き換え、mineral oil 0.5mlで覆い、基本培養条件下で翌日の胚培養開始まで一晩平衡化させ、胚培養に供した。

4、マウス腹腔マクロファージの回収

8週から10週ICR系雌マウスにPBSを1ml腹腔内投与し、18~24時間後に頸椎脱臼にて屠殺、皮切後MEM 8~10mlを腹腔内に注入、これを回収した³¹⁾。遠心後MEMで1回洗浄し、10%FCS-MEMで細胞浮遊液を作製、細胞数を計数した。 1×10^6 cells/mlの濃度で24well dishに1mlずつ播種する。コントロール用のwellにも10%FCS-MEMを入れておいた。基本培養条件下で2時間前培養し、非接着性細胞を除去するためにBWWで4回洗浄し、0.3%BSA-BWWで置き換え、mineral oil 0.5mlで覆い、基本培養条件下で翌日の胚培養開始まで一晩平衡化させ、翌日の胚培養に供した。

5、モルモット腹腔マクロファージの回収

Kakinuma³²⁾の方法に則り行った。すなわち、300~400gモルモット（雌；紀和実験動物）に1%カゼイン（Merck co. No2242）生理食塩水30ml腹腔内投与、14~18時間後に0.01%ヘパリン加生理食塩水を腹腔内に注入、これを回収した。マウス腹腔内マクロファージと同様の処理を行い、胚培養に供した。

II、胚一体細胞共培養

すでに述べた方法によって回収された胚及び体細胞を用いた共培養を以下の如くに行った。

1、各種体細胞の示す共培養効果

回収し一晚基本培養条件下におかれたウサギ卵管上皮細胞、子宮内膜上皮細胞、ヒト皮膚線維肉腫細胞、ヒト脂肪肉腫細胞、マウス及びモルモット腹腔マクロファージのそれぞれに1 well当たり10~20個の前核期胚を導入し共培養を行った。効果は胚の形態において行い、hCG投与後17時間で培養を開始し、48、72、96、120、及び144時間の時点で光学顕微鏡下に判定した。なお、I-2~5の実験で播種する細胞数は、予備実験にてBWW-BSA交換時における細胞数がおよそ 1×10^5 cells/wellとなるように設定した。また、以下の1~5の実験に供したモルモット腹腔マクロファージの回収はすべてI-5に述べた方法によった。

2、播種する細胞数の差による胚発育促進効果

これまでに述べた方法によってモルモット腹腔マクロファージを回収し、播種する細胞数を0（コントロール）、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 及び 5×10^6 cells/wellとし、ここにマウス胚を導入して共培養を行いその効果を胚の形態で判定した。

3、共培養が胚の細胞周期に及ぼす影響

モルモット腹腔マクロファージを 5×10^6 cells/wellで24 well dishに播種し、hCG投与

後17時間に回収した前核期胚との共培養に供した。共培養した後、hCG投与後96時間の時点で胚を回収した。コントロール、共培養により得られた胚、及びin-vivoより回収した胚のそれぞれを構成する細胞数をTarkowski³³⁾の方法により計数、比較した。

4、新鮮条件付け培地での胚培養

モルモット腹腔マクロファージを 5×10^6 cells/well で0.3%BSA-BWWを用いて24 well dishに播種し、翌日、前核期胚回収30分前に上清を回収、条件付け培地として胚培養を行った。

5、凍結条件付け培地での胚培養

モルモット腹腔マクロファージを 5×10^6 cells/well で0.3%BSA-BWWを用いて24 well dishに播種し、hCG投与24時間後、48時間後、72時間後にそれぞれ回収し、 -80°C で保存した。これを胚回収前日に解凍し、基本培養条件下に一晩平衡化させ胚培養に供した。

III、子宮腔内胚移植

1、ICR系8週齢以上の成熟雌マウスと同系精管結紮雄マウスとを自然交配させ、膣栓確認日を偽妊娠日齢1日マウスと定義し、偽妊娠日齢3日マウスをRecipientとした。

2、胚移植はBeatty³⁴⁾、McLaren³⁵⁾らの方法に準じて行った。即ち、Recipientをpentobarbital sodium 30mg/kg (Nembutal;Dinabot co., Osaka,Japan)にて麻酔後、背部小切開創より左右のuterine hornを体外に引き出す。その後実体顕微鏡下にutero-tubal junctionと連続する子宮腔内に27ゲージ針にて小孔を通じ、同部よりガラスピペットにて少量の培養液 ($\sim 5\mu\text{l}$) と共に胚を移植した。尚、Recipientの個体差による影響を棄却するために、同一Recipientの左右の子宮角に対し、コントロール胚、共培養胚をそれぞれ3個ずつ移植し10日後に脱落膜腫及び胎児の存在を検証して着床率を比較検討した。

3、培養液は0.3%BSA-BWW、0.3%BSA- α MEMを用い、前核期から培養液のみで4日間培養した胚（コントロール）と同期間モルモット腹腔マクロファージと共培養を行った胚を移植胚として実験に供した。尚、同一培養条件下においても胚の発生段階に相違が認められるため、実体顕微鏡下に発生が良好なものから上位60%の胚を移植胚として選択した。

結果

I、ウサギ卵管上皮細胞、子宮内膜上皮細胞との共培養

卵管上皮細胞との共培養では胚発育はすべてのstageにおいてコントロールと有意差はなく（ χ^2 -test）、子宮内膜上皮との共培養ではDay 3における4cell stage以上の胚の割合（4cell rate）（ $p < 0.05$ ）とday5におけるblastocyst以上の胚の割合（blastocyst rate）（ $p < 0.01$ ）はコントロールに比し有意に低値であった（ χ^2 -test）（表1）。

II、ヒト皮膚線維肉腫細胞、ヒト脂肪肉腫細胞との共培養

Day 3における4cell rateおよびDay5におけるblastocyst rateはヒト皮膚線維肉腫細胞、ヒト脂肪肉腫細胞ともにコントロールに比し有意に低値であった（ χ^2 -test、 $p < 0.001$ ）（表2）。

III、マウス、モルモット腹腔マクロファージとの共培養

Day5におけるblastocyst rateはマウス腹腔マクロファージとの共培養で84.5%(109/129)、コントロールで36.8%(49/133)とマウス腹腔マクロファージとの共培養で有意に高値であった（ χ^2 -test、 $p < 0.001$ ）。また、モルモット腹腔マクロファージとの共培養でもblastocyst rateはモルモット腹腔マクロファージとの共培養で77.8%（123/158）、コントロールで32.0%（40/125）と腹腔マクロファージとの共培養で有意に高値であった（ χ^2 -test、 $p < 0.001$ ）（表3）。播種する細胞数を変えて共培養を行うと

blastocyst rateはコントロールと比較して 1×10^5 cells/mlでは87.4%、 5×10^5 cells/mlでは164.8%、 1×10^6 cells/mlでは197.1%と用量依存的に上昇した (χ^2 -test、 $p < 0.01$)。また、細胞数を 5×10^6 cells/mlとするとblastocyst rateは389.4%となり (図1)、wellの底面に安定的にほぼ同数のマクロファージを接着させるために以後の実験では播種する細胞数を 5×10^6 cells/mlに設定した。

Day4 (hCG投与後96時間後) における胚を構成する細胞数を計数したところ、コントロールでは 18.7 ± 7.2 (n=20)、共培養では 29.5 ± 7.9 (n=21)、同一時刻に子宮を灌流して得られたin-vivo胚では 40.8 ± 8.8 (n=8) と有意差がみられた (ANOVA、 $p < 0.05$) (図2)。

新鮮条件付け培地での胚培養を行ったところblastocyst rateは4.1% (3/72) とコントロール (18/72、25.0%) に比し有意に低値であった (表4)。凍結条件付け培地を用いた胚培養ではいずれもblastocyst rateはコントロールに比し有意に低値であった (χ^2 -test、 $p < 0.001$) (表5)。

IV、子宮腔内胚移植

同一時刻のIn Vivo子宮腔内より回収したIn Vivo胚を移植した場合、胚並びに個体あたりの着床率はそれぞれ75/142(52.8%)、20/23(87.0%)であった。BWWを用いて培養したcontrol、共培養胚の胚並びに個体あたりの着床率は、それぞれ2/54(3.7%)・2/54(3.7%)、2/18(11.1%)・1/18(5.6%)であり両群間に有意差は認められなかった。又、 α MEMを用いた場合も、それぞれ9/33(27.2%)・11/33(33.3%)、6/11(54.5%)・5/11(45.4%)と有意差は認められなかった (表6)。

考察

今回の研究により、マウス、及びモルモット腹腔マクロファージとの共培養がマウス初期胚体外培養に対して促進的な効果を示し、子宮内膜上皮細胞、ヒト皮膚線維肉腫

細胞、ヒト脂肪肉腫細胞との共培養では抑制的な効果を示し、ウサギ卵管上皮細胞との共培養では促進も抑制もされなかった。これまでさまざまな動物種の初期胚と各種体細胞との共培養が試みられてきた³⁶⁾。マウス初期胚ではreproductive tract由来の細胞を用いた研究^{37)~42)}、non-reproductive tract由来の細胞を用いた研究⁴³⁾があり、その他の動物種ではウシ胚^{44)~46)}、ブタ胚⁴⁷⁾、ヤギ胚⁴⁸⁾、ヒツジ胚⁴⁹⁾、ヒト胚^{50)~52)}を用いた研究がある。これらの報告によるとreproductive tract由来であるなしに関わらずある種の体細胞との共培養が胚発育促進効果をもたらすこと、それがほとんど動物種の組み合わせに無関係に認められ、種普遍的な現象であることも明らかにされている。今回の結果は腹腔マクロファージとの共培養がマウス由来でもモルモット由来であっても同様に胚発育促進効果を示す事が明らかにされ、また同時に促進効果の認められない細胞も逆に抑制効果をもたらす細胞のある事も明らかになった。

マウス腹腔マクロファージとの共培養についてはすでに本田ら⁵³⁾がその胚発育促進効果を報告している。われわれは胚発育促進効果を認めたモルモット腹腔マクロファージの共培養についてさらに詳細に検討した。条件付け培地に関するこれまでの報告では促進効果を認めるとするもの^{54)~56)}とないとするもの^{57),58),38),42)}があるがマウス初期胚ではいずれも条件付け培地では胚発育促進効果は認められていない。モルモット腹腔マクロファージの新鮮条件付け培地でもマウス胚発育促進効果はなくむしろ胚発育は抑制された。このことはモルモット腹腔マクロファージを用いた共培養は胚発育促進効果を得るにはある一定以上のviable cellsと共存する必要がある、それがなくなるとむしろ胚発育は阻害されるという特徴があるといえる。このことから、胚発育を促進させる機構を以下のものと推定することができよう。すなわち、第1にviable cellが存在するときのみ基本的培養環境が変わる、たとえばO₂濃度の低下が生じている場合が考えられる。しかしこれはヒト皮膚線維肉腫細胞の共培養においては全く胚発育は促進されず、モルモット腹腔マクロファージの細胞数をこれの半数にしてもある程度の胚発育促進効果を認めたことから否定的である。

第2に極めて不安定な胚発育促進物質をマクロファージが放出している場合が考えら

れる。われわれはウサギ卵管上皮細胞においてすでにこの用件を満たす胚発育促進物質としてアミノ酸であるCysteinを同定している⁴²⁾が、胚発育促進因子が不安定な物質であるならばその同定は容易でないことは想像に難くない。実際、共培養における胚発育促進因子としては条件付け培地で胚発育促進効果の見られたウシ胚と卵胞顆粒膜細胞との共培養ではtissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) が胚発育促進物質として同定されているにすぎない⁵⁹⁾。

第3の可能性として、in vitroで胚培養を行う際に胚から培養環境下へ放出される代謝産物をマクロファージが貪食し一種の解毒作用を行っていることが考えられる。

現時点ではこれらの何れもが議論の域を出ない。

共培養に関する多数の研究の中で共培養が形態的な胚発育改善効果のみならず、着床率、妊娠率の向上に寄与するかどうかを検討した報告は数少ない。Sakkas³⁷⁾らはマウスの2細胞と同種の卵管細胞との共培養で、Gandolfi&Moor⁴⁹⁾はヒツジ胚と同種の卵管上皮細胞との共培養で着床率の向上を報告している。また、ヒトの胚においてはBongsoら¹⁹⁾がヒト卵管上皮細胞、Menezoら²⁸⁾がVero cellを用いて、Wiemerら⁶⁰⁾はウシ子宮線維芽細胞を用いて妊娠率の向上を報告している。今回、共培養によって得られるマウス胚の形態的な胚発育促進効果が着床率の向上をもたらすかどうか検討を試みたところ、共培養による着床率の向上は認められなかった。これは、従来胚の形態の良否が、移植後の着床率や胚の発生効率を左右すると考えられてきた歴史的事実に大きく反する結果であり、一見奇妙に見える。これはマウス胚にのみ見られる現象であるのかどうか、或いは移植のタイミングが悪いためか不明だが、今後この理由を検討するに値するものと考えている。したがって、現段階ではこの共培養系をヒト体外受精に導入することは時期尚早であると考えられる。

参考文献

- 1)Noda Y., "Embryo development in vitro"
1992 Assist. Reprod. Reviews 2:9-15
- 2)Hamner C.E., Williams W.L., "Composition of rabbit oviduct secretions."
1965 Fertil. Steril. 16:170-176
- 3)David A., Brackett B.G., Garcia C.R., Mastroianni L., "Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the Fallopian tube "
1969, J. Reprod. Fertil. 19:285-289
- 4)Iritani A., Gomes W.r., VanDemark N.L., "Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes."
1969 Biol. Reprod. 1:72-76
- 5)Tucker E.B., Schulz G.A., "Temporal changes in proteins of oviduct and uterine fluids during the preimplantation period in the rabbit."
1977 Biol. Reprod. 17:749-759
- 6)Borland R.M., Biggers J.D., Lechene C.P., Taymor M.L., "Elemental composition of fluid in the human fallopian tube."
1980 J. Reprod. Fertil. 58:479
- 7)Leese H.J., "The formation and function of oviduct fluid "
1988, J. Reprod. Fertil. 82:843-856
- 8)Fischer B., Bavister B.D., "Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits"
1993 J. Reprod. Fertil. 99:673-679
- 9)Kille J. W., Hamner C.E., "The influence of oviductal fluid on the development of one cell rabbit embryos in vitro."
1973 J. Reprod. Fertil. 35:415-423
- 10)Quinn P., Kerin J.F., Warnes G.M., "Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid"
1985, Fertil. Steril. 44:493-497
- 11)Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G., "Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium."
1983 Biol. Reprod. 28:235-247
- 12)Kane M.T., "Bicarbonate requirements for culture of one-cell rabbit ova to blastocysts."
1987 Biol. Reprod. 12:552-555
- 13)Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR "Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro."
1991 J-Reprod-Fertil. 92(1): 125-31
- 14)Hallden K., Li J., Carney E.W., Foote R.H., "Increasing carbon dioxide from five percent to ten percent improves rabbit blastocyst development from cultured zygotes"
1992 Mol. Reprod. Dev. 33:276-280
- 15)Whitten W.K., "Culture of tubal ova."
1956 Nature 177:96
- 16) Whitten W.K., "Culture of tubal ova."
1957 Nature 179:1081-1082
- 17)Brinster R.L., "Studies on the development of mouse embryos in vitro I. The effect of osmolality and hydrogen ion concentration "
1965 J. Exp. Zool. 158:49-57

- 18) Brinster R.L., "Studies on the development of mouse embryos in vitro II .The effect of energy sources."
1965 J. Exp. Zool. 158:59-68
- 19)Biggers J.D.,Whitten W.K., and Whittingham D.G., "The culture of mouse embryos in vitro, in: Methods in Mammalian Embryology (J. C. Daniel, Jr.,ed.), Freeman, San Francisco, 86-116
- 20) Daniel J.C.Jr., "Studies on the growth of 5-day old rabbit blastocysts in vitro."
1965 J. Embryol. Exp. Morphol. 13:83-95
- 21)Kane M.T.,Foote R.H., "Culture of two-and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media."
1970 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133:921-925
- 22)Colver R.M.,Howe A.M.,McDonough P.G.,Boldt J.,"Influence of growth factors in defined culture medium on in vitro development of mouse embryos."
1991 Fertil. Steril. 55:194-199
- 23)Noda Y., Matsumoto H., Umaoka Y., Tatsumi K., Kishi J., Mori T., "Involvement of superoxide radicals in mouse 2-cell block phenomenon"
1991 Mol. Reprod. Dev. 28:356-360
- 24)Gardner D.K., Lane M., "Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture"
1993 Biol. Reprod. 48:377-385
- 25)Whittingham D.G., Biggers J.D., "Fallopian tubes and early cleavage in the mouse "
1967, Nature Lond. 213:942-943
- 26)Bavister B.D., "Co-culture for embryo development: is it really necessary?"
1992, Hum. Reprod., 7:1339-1341
- 27)Bongso A.,NgS.C.,FongC.Y.,Anandakumar., Carshall B., Edirisinghe R.,RatnamS.S."Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture"
1992, Fertil. Steril. 58:569-574
- 28)Menezes Y., Hazout A., Dumont M., Herbaut N., Nicollet B., "Co-culture of embryos on Vero cells and transfer of blastocyst in human"
1992, Hum. Reprod. 7:101-105
- 29)Wiemer K.E., Hoffman D.I., Maxon W.S., Eager S., Muhlberger B., Flore I., Cuervo M.," Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells"
1993 Hum. Reprod. 8:97-101
- 30)Biggers J.D., Whitten W.K., Whittingham D.G., "The culture of mouse embryos in vitro. "
1971 Method in Mammalian Embryology (Daniel J.C. ed.) 86-116
- 31)Mannel D.N., Moore R.N., Mergenhagen S.E., "Macrophage as a source of tumoricidal activity(tumor necrotizing factor)"
1980 Infection Immunity 30:523-530
- 32)Kakinuma K., "Improved method for obtaining polymorphonuclear leukocytes from guinea pig"
1968 Jap. J. Exp. Med. 38:165-169
- 33)Tarkowski A.K.,"An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs"
1966, Cytogenetics, 5:394-400
- 34)Beatty RA., "Transplantation of mouse eggs"
1951, Nature, 168:995
- 35)McLaren A., and MichieD., "Studies on the transfer of fertilized mouse egg to uterine foster- mothers. I.Factors affecting the implantation and survival of native and transferred eggs"
1956, J. Exp.Biol. 33:394-416
- 36)Kane M.T., Carney E.W., Ellington J.E., "The role of nutrients, peptide growth factors and coculture in

- development of preimplantation embryos in vitro "
- 1992, *Theriogenology* 38:297-313
- 37)Sakkas D., Trounson A.O., Kola I., "In vivo cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in coculture with oviduct cells"
- 1989, *Reprod. Fertil. Dev.* 1:127-136
- 38)Goldberg J.M., Khalifa E.A., Friedman C.I., Kim M.H., "Improvement of in vitro fertilization and early embryo development in mice by coculture with human fallopian tube epithelium."
- 1991 *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165:1802-1805
- 39)Noda Y., Narimoto K., Umaoka Y., Natsuyama S., Mori T., "Analysis of oviduct-derived embryonic growth stimulator activity"
- 1993, *Int. J. Fertil.* 38:57-64
- 40)Freeman MR, Bastias MC, Hill GA, Osteen-KG "Coculture of mouse embryos with cells isolated from the human ovarian follicle, oviduct, and uterine endometrium."
- 1993 *Fertil-Steril.* 59(1): 138-42
- 41)Morishige K, Kurachi H, Amemiya K, Adachi H, Adachi K, Sakoyama Y, Miyake A, Tanizawa O
"Menstrual stage-specific expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in human oviduct epithelium and their role in early embryogenesis."
- 1993 *Endocrinology.* 133(1): 199-207
- 42)Noda T., Goto Y., Natsuyama S., Hirose M., Mori T., "Cystein as an embryonic growth factor in co-culture with oviductal cells"
- 1994 *Serono Symposia* 599-607
- 43)Ouhibi N., Hamidi J., Guillard J., Menezo Y., "Coculture of 1-cell mouse embryos on different cel supports"
- 1990, *Hum. Reprod.* 5:737-743
- 44)Camous S., Heyman Y., Mexiou W., et al "Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles."
- 1984 *J. Reprod. Fertil.* 72:479
- 45)Goto K., Iwai N., Takuma Y., Nakanishi Y., "Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers"
- 1992 *J. Anim. Sci.* 70:1449-1453
- 46)Sparks A.E.T., Gwazdaukas F.C., McGilliard M.L., "Culture of one-cell bovine embryos in explanted mouse oviduct and bovine oviductal epithelial cells"
- 1992 *Theriogenology* 37:587-594
- 47)Pavasuthipaisit K., Lhuangmahamongkol S., Tocharus C., Kitiyanant Y., Prempre P., "Porcine oviductal cells support in vitro bovine embryo development"
- 1994 *Theriogenology* 41:1127-1138
- 48)Prichard J.F., Thibodeaux J.K., Pool S.H., Blakewood E.G., Menezo Y., Godke R.A., "In-vitro co-culture of early stage caprine embryos with oviduct and uterine epithelial cells"
- 1992, *Hum. Reprod.* 7:553-557
- 49)Gandolfi F., Moor R.M., Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells "
- 1987, *J. Reprod. Fertil.* 81:23-28
- 50)Bongso A., Ng S.C., Sathananthan H., Ng P.L., Rauff M., Ratnam S.S."Improved quality of human embryos when co-culture with human ampullary cells"
- 1989, *Hum. Reprd.* 4:706-712.
- 51)Menezo Y.J.R., Guerin J.F., Czyba J.C., "Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells"

- 1990, Biol. Reprod. 42:301-307
- 52)Yeung W.S.B., Ho P.C., Lau E.Y.L., Chan S.T.H., "Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system"
1992, Hum. Reprod. 7:1144-1149
- 53)Honda R.,Matsuura K.,Fukumoto Y.,Kawano T.,Okamura H.,"In-vitro enhancement of mouse embryonic development by co-culture with peritoneal macrophage."
1994 Human Reproduction 9:692-696
- 54)Heyman Y., Menezo Y., Chesne P., Camous S, Garnier V., "In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles"
1987, Theriogenology 27:59-68
- 55)Rexroad C.E.Jr, Powell A.M., "Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles"
1988, Theriogenology 29:387-397
- 56)Eyestone W.H., First N.L., "Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium"
1989, J. Reprod. Fertil. 85:715-720
- 57)Kuzan F.B., Wright R.W., "Observation on the development of bovine morulae on various cellular and acellular substrata."
1982 J. Anim. Sci. 54:811-816
- 58)Allen R.L., Wright R.W.Jr., "In vitro development of porcine embryos in coculture with endometrial cell monolayers or culture supernatants"
1984 J. Anim. Sci. 59:1657-1661
- 59)Sato T., Kobayashi K., Yamashita S., Kikuchi M., Sendai Y., Hoshi H., "Tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMP-1) produced by granulosa and oviuct cells enhances in vitro development of bovine embryo"
1994, Biol Reprod. 50:835-844
- 60)Wiemer K.E., Cohen J., Amborski G.F., Wiker S., Wright G., Munyazaki L., Godke R.A.,"In-vitro development and implantation of human embyos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells"
1989, Hum. Reprod. 4:595-600

表 1

Total embryos	Trials	2 cell stage embryo on day2(%)	4cell stage embryo on day3(%)	blastocyst on day5(%)
oviductal cell † 76	4	73(96.1)	62(81.6)	23(30.3) ^{N.S.}
endometrial cell † 69	4	68(98.6)	51(73.9) [*]	11(15.9) ^{**}
control ‡ 59	4	55(93.2)	53(89.8)	22(37.3)

* p<0.05 ** p<0.01 (χ^2 test)

† 5×10^5 /well

‡ BWW+0.3%BSA

表 2

Total embryos	Trials	2 cell stage embryo on day2(%)	4cell stage embryo on day3(%)	blastocyst on day5(%)
Dermatofibrosarcoma † 119	4	106(89.1)	61(51.3) ^{***}	15(12.6) ^{***}
Liposarcoma † 94	4	83(88.3)	55(58.5) ^{***}	11(11.7) ^{***}
Control ‡ 106	4	98(92.5)	95(89.6)	51(48.1)

*** p<0.001 (χ^2 test)

† 5×10^4 /well

‡ BWW+0.3%BSA

表 3

	Total embryos	Trials	2 cell stage embryo on day2(%)	4cell stage embryo on day3(%)	blastocyst on day5(%)
Mouse macrophage †	129	4	124(96.1)	119(92.2)	109(84.5) ^{***}
Control ‡	133	4	123(92.5)	111(83.4)	49(36.8)
Guinea-pig macrophage †	158	4	143(90.5)	140(88.6)	123(77.8) ^{***}
Control ‡	125	4	112(89.5)	99(79.2)	40(32.0)

*** p<0.001 (χ^2 test)

† 1×10^6 /well

‡ BWW+0.3%BSA

表 4

	Total embryos	Trials	2 cell stage embryo on day2 (%)	4cell stage embryo on day3 (%)	morula on day4(%)	blastocyst on day5(%)
Co-culture †	68	5	65(95.6)	62(91.2) ^{***}	62(91.2) ^{***}	49(72.1) ^{***}
Fresh conditioned medium ††	72	5	71(98.6)	48(66.7)	24(33.3)	3(4.1) ^{***}
Control ‡	72	5	71(98.6)	38(52.8)	32(44.4)	18(25.0)

*** p<0.001 (χ^2 test)

† Macrophage 5×10^6 /well

†† Conditioned for overnight

‡ BWW+0.3%BSA

表 5

Total embryos	Trials	2 cell stage embryo on day2 (%)	4cell stage embryo on day3 (%)	morula on day4(%)	blastocys on day5(%)
24h † 66	4	58(87.9)	46(70.0) [*]	22(33.3) ^{***}	1(1.5) ^{***}
48h † 69	4	63(91.3)	45(65.2) [*]	27(39.1) ^{***}	1(1.4) ^{***}
72h † 68	4	61(89.7)	36(52.9) ^{***}	21(30.9) ^{***}	0 (0) ^{***}
Control ‡ 69	4	68(98.6)	60(87.0)	51(73.9)	34(49.3)

* $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ (χ^2 test)

† Each medium was collected after conditioned by macropage for 24h,48h,72h, respectively and freezed until applied for experiments

‡ BWW+0.3%BSA

表 6

	Inplantation rate/embryo	Pregnancy rate/mouse
In vivo	75/142(52.8%)	20/23(87.0%)
α -MEM	control 9/33 (27.2%)	6/11(54.5%)
	co-culture 11/33 (33.3%)	5/11(45.4%)
BWW	control 2/54 (3.7%)	2/18(11.1%)
	co-culture 2/54 (3.7%)	1/18(5.6%)

Day 4 embryo/Day 3 recipient, 3 embryos/uterine horn

图 1

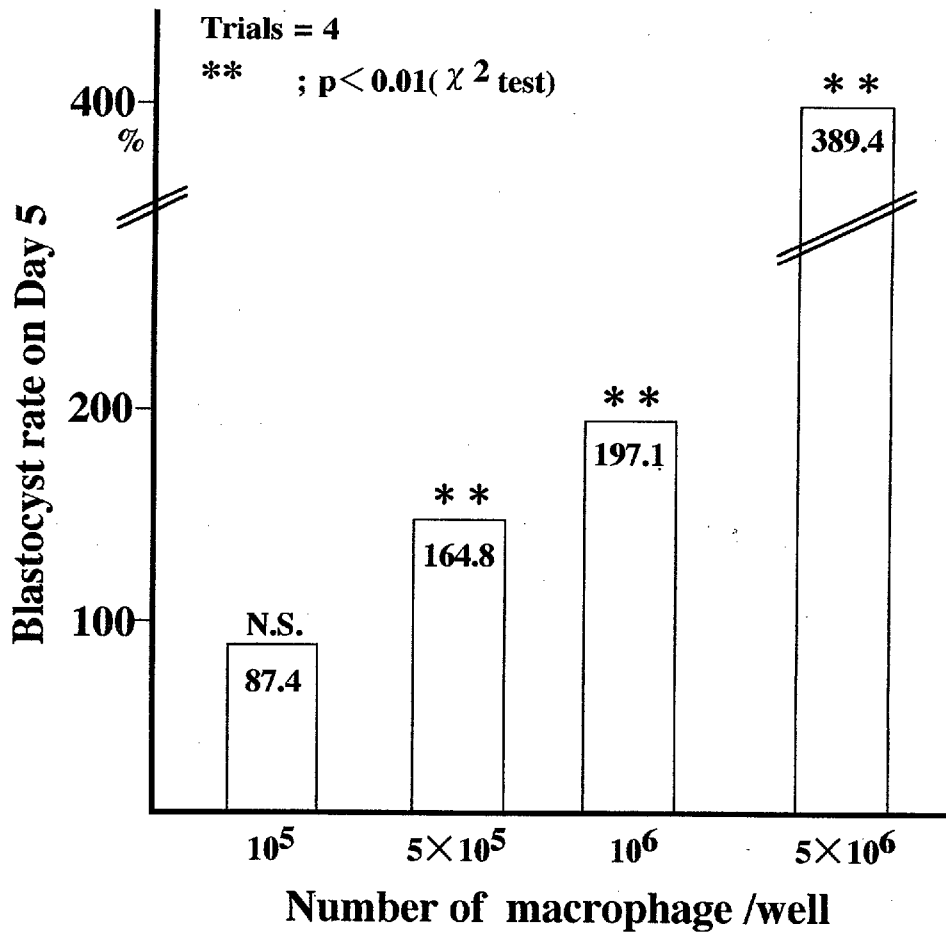
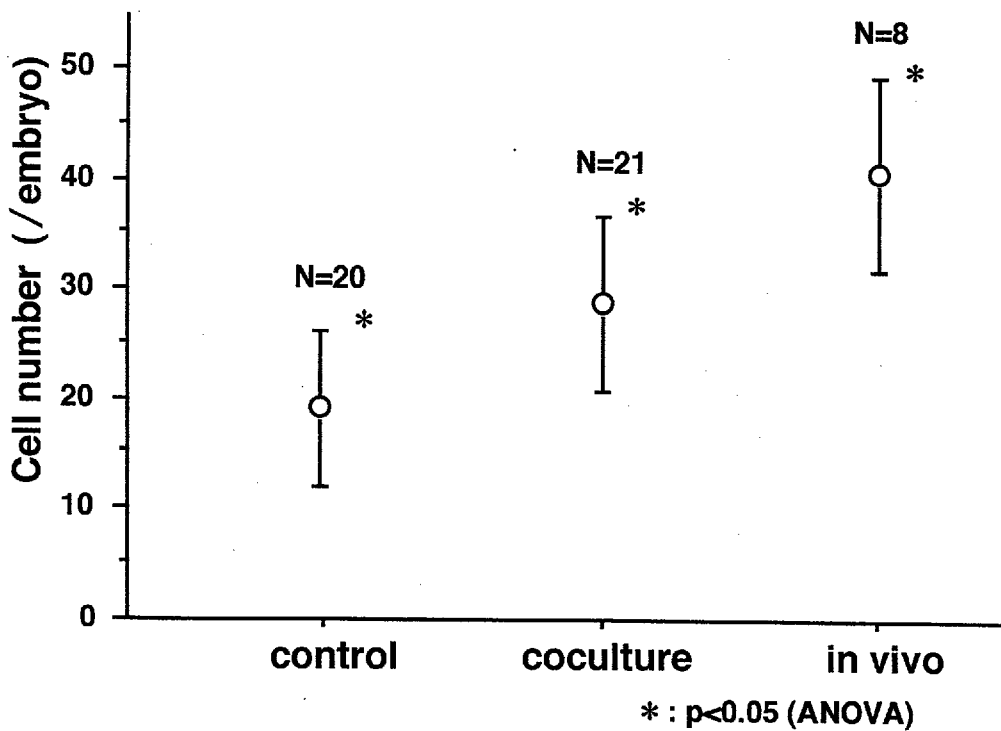


图 2





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 :多胎妊娠を予防し且つ高い妊娠率を得るためには、in vivo により近い発生能を有する胚を少数移植することが望ましく、これをうるため培養法の改善が求められる。今回、われわれは初期胚培養法として数種の体細胞を用いた胚の共培養を試み、より高い胚発生効率を得られるか、また、その後の着床現象にいかなる効果をもたらすかについて動物実験モデルを用いた検討を行った。胚はマウス前核期胚を用い、ウサギ卵管上皮細胞、同子宮内膜上皮細胞、ヒト皮膚線維肉腫細胞樹立株、同脂肪肉腫細胞樹立株、マウス腹腔マクロファージ、モルモット腹腔マクロファージとの共培養を試みた。胚培養に 0.3%BSA 加 BWW を用い、基本培養条件は 37.0 、5%CO₂ in air とした。腹腔マクロファージはマウス、モルモットの種にかかわらず control に比し Day 5 の胚盤胞率が有意に高値を示したが、その他の共培養系では control と同程度、或いはそれ以下であった。しかしモルモット腹腔マクロファージの条件付け培地では、逆に胚発育は抑制された。また、子宮腔内移植によって共培養の着床率に及ぼす効果を検討したが、有意な差は認められなかった。したがって現在のところマクロファージとの共培養は胚発育においてはその形態的改善をもたらすが、個体としての発生能を向上させるまでには至らず、今後の課題として共培養条件の詳細な検討や、胚発育促進因子の解析などが必要であると考えられた。