

平成8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学婦人科学教室
野田洋一

要約

性成熟期婦人においては、視床下部-下垂体-卵巢-子宮内膜機能連関と呼ばれるように、中枢に制御されている卵巢から分泌された性ステロイドにより周期的に形態的・機能的分化を繰り返し、子宮内膜は妊卵の着床に備えている。排卵誘発周期においてはこの精緻な機能連関が作動せず、特にゴナドトロピン療法においては卵巢から過剰なエストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲンが産生され、妊卵の着床環境を提供する子宮内膜は自然周期とは異なる形態的・機能的状況となっているものと考えられる。本研究においては以下の方法により、排卵誘発周期における着床環境を検討する予定であるが、本年度においては①②について知見が得られた。

- ① マウスにおける *in vitro* 子宮内膜脱落膜化実験系の確立
- ② 脱落膜化に作用する生理活性因子の検討
- ③ 各種性ステロイド濃度下における脱落膜化の形態的・機能的差異の検討、
- ④ *in vitro* 子宮内膜脱落膜化実験系の上で胚を共培養し、胚発育・脱落膜化・胚と子宮内膜の相互作用の検討。

排卵誘発周期における着床環境を検討する上で重要なマウスにおける *in vitro* 子宮内膜脱落膜化実験系を確立した。また、ヒスタミンが子宮内膜内胚移植実験系において *implantation window* をより早い方向に拡大することを見いだした。今度これらの系を用いて③④の検討を行う予定である。

見出し語

マウス子宮内膜間質細胞、脱落膜化、性ステロイド、ヒスタミン

研究方法

性成熟期婦人においては、視床下部-下垂体-卵巢-子宮内膜機能連関と呼ばれるように、中枢に制御されている卵巢から分泌された性ステロイドにより周期的に形態的・機能的分化を繰り返し、子宮内膜は妊卵の着床に備えている。排卵誘発周期においてはこの精緻な機能連関が作動せず、特にゴナドトロピン療法においては卵巢から過剰なエストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲンが産生され、妊卵の着床環境を提供する子宮内膜は自然周期とは異なる形態的・機能的状況となっているものと考えられる。臨床的にも排卵誘発周期において着床率は低い傾向にあるとの報告もある。本研究においては以下の方法により、排卵誘発周期における着床環境を検討している。

- ① マウスにおける *in vitro* 子宮内膜脱落膜化実験系の確立
- ② 脱落膜化に作用する生理活性因子の検討
- ③ 各種性ステロイド濃度下における脱落膜化の形態的・機能的差異の検討、
- ④ *in vitro* 子宮内膜脱落膜化実験系の上で胚を共培養し、胚発育・脱落膜化・胚と子宮内膜の相互作用の検討。

本年度は上記①②について研究成果が得られた。③④については検討中である。①②の

研究方法を以下に示す。

① マウスにおける *in vitro* 子宮内膜脱落膜化実験系の確立

1. マウス子宮内膜間質細胞の回収

ICR系未熟マウス(4~5週令)より無菌的に子宮を摘出し、洗浄の後細切し、0.25% collagenase type I加PBSにて37℃、60分処理し、ピペティングにて子宮内膜細胞を回収する。30 μ mおよび10 μ mポリエステルメッシュにて回収細胞を濾過し、得られた子宮内膜由来細胞を10%チャーコール処理FCS-Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)に浮遊させ、24穴プラスチックディッシュに播種し、以後の実験に共した。

2. 子宮内膜間質細胞純度の検討

1で得られた子宮内膜由来細胞をLab-Tek Chamber Slideにて培養し、24時間後に4℃アセトン・メタノール固定の後、上皮細胞のマーカーとしてサイトケラチンを、間質細胞のマーカーとしてビメンチンをそれぞれ免疫組織染色を用いてその発現を検討した。

3. 透過型電子顕微鏡による超微形態の観察

1で得られた子宮内膜由来細胞を35mmディッシュ上に培養し、その超微形態を*in vivo*の子宮内膜間質組織と比較した。

4. エストラジオール(E2)、プロゲステロン(P)添加培養による脱落膜化の検討

1で得られた子宮内膜由来細胞をE2/P無添加群、E2 0.1nM単独添加群、P 100nM単独添加群、E2 0.1nM/P 100nM添加群に分けて24穴ディッシュにて培養し、顕微鏡および電顕により形態変化を観察し、脱落膜化の機能マーカーとしてデスミンの発現を免疫組織染色により検討した。

② 脱落膜化に作用する生理活性因子の検討

1. 胚の回収

4~6週令のICR系雌マウスをPMSG 5IU、hCG 5IUの48時間間隔腹腔内投与で過排卵誘起し12~18週令の成熟雄ICRマウスと交配させ翌朝膣栓を確認し(Day1)実験に用いた。hCG後94~98時間に摘出した子宮をCa²⁺(-)Mg²⁺(-) Phosphate Bufferd Saline:PBSにてflushし、35mmディッシュ上に胚盤胞を回収した。

2. 胚移植法

8~10週令の成熟ICR系雌マウスを同系の12~18週令の成熟精管結紮雄マウスと一晩同居させ翌朝膣栓を確認したものを受卵雌として用いた(膣栓確認日=偽妊娠Day1)。受卵雌をネンブタール30mg/kgにて麻酔し背部に切開を加え子宮を露出させ、腔内移植法では実体顕微鏡下で眼科用ピンセットにて子宮卵管接合部を把持し27ゲージ注射針を子宮腔内へ挿入し抜去後、予め用意したガラスマイクロピペットを用いて少量の移植用培養液(10%FCS加 α MEM)とともに胚を移植した。子宮内膜内移植法では27ゲージ注射針を子宮腔と平行に子宮内膜内へと挿入後に抜去し少量(3~5 μ l)の移植用培養液(10%FCS加 α MEM)とともに胚を子宮内膜反間膜側に移植した。移植胚数は各子宮角に一個とした。移植後8日目に脱落膜腫および胚の存在を形態学的に確認し着床の有無を決定した。実験3。

3. 各種生理活性物質の共移植に及ぼす影響

各種生理活性物質の共移植に及ぼす影響を調べた。用いた生理活性物質はヒスタミン(100 μ M)、プロスタグランジンE2(PGE2、10 μ M)、P(100nM)、hCG(50IU/ml、500IU/ml)である。着床率改善の確認を容易とする為受卵雌にはDay2およびDay5の偽妊娠マウスを使用した。一側子宮角は胚・生理活性物質共移植を、他側子宮角は生理活性物質を含まない培養液で内膜内移植を行い着床率を比較した。

4. *in vitro*内膜細胞の増殖ならびに脱落膜化に与えるヒスタミンの影響

前述の方法によって回収された子宮内膜由来細胞を96穴プラスチックディッシュ上にDMEM(10%FCS, 100U/ml penicillin-G, 100mg/ml streptomycin)を基本培養液として1.5 \times 10⁵cell/mlの濃度で播種し(接着する細胞は約10⁴個/well) 5%co2 in air 37℃の条件下で培養を開始した(対照群)。あわせてE2(0.1nM)、P(100nM)を添加した系での培養も行い比

較した (E/P 添加群)。さらに両系に培養開始日よりヒスタミン $100\mu\text{M}$ を添加したものを培養しヒスタミンの培養内膜細胞に対する影響を調べた。培養液は48時間毎に全量を交換し、24時間毎に trypsin 処理、トリパンブルー染色にて細胞数を計数し形態を観察した。脱落膜化のマーカーとして知られるデスミンの発現の有無を抗デスミンマウスモノクローナル抗体を一次抗体としたLSAB法(labeled streptavidin biotin method)にて検定した。

5. 栄養外胚葉の拡がりに与えるヒスタミンの影響

hCG 後94~98時間に胚盤胞を回収し培養実験に用いた。培養液は10%FCS加 α MEM を用い4well dish上で培養液500 μl 中に胚を3個静置し5%co2 in air 37°C中で培養を開始した。これを対照群とし培養液にヒスタミン $100\mu\text{M}$ を含む群(ヒスタミン添加群)も同様に培養した。各実験は5回を行い培養開始後24時間後、48時間後に位操作顕微鏡にて形態を観察した。24時間後には全てでhatchingがおこなっているのを確認した。位操作顕微鏡の写真画像処理装置IBAS-1(KONTRON社, Germany)にて処理し面積を求め両群の栄養外胚葉の拡がりを比較した。

6. ヒスタミン・胚共移植後の子宮内膜の形態

Day2 受精卵へヒスタミン・胚共移植を行い1,6,12,24,48時間後に屠殺し子宮を摘出した。4%中性ホルマリンにて固定後パラフィン包埋し4 μm の切片を作製しH.E染色にて観察した。

7. 子宮内 mast cellの局在と数

妊娠子宮のDay2~Day5の mast cellの数と子宮内分布をQuick Toluidine Blue Methodにて調べた。標本は子宮角中央、子宮角遠位部1/3、子宮角近位部1/3の3箇所とし10%Formalin固定後15 μm の子宮横断面凍結切片を作製しToluidine Blueにて染色した。これら3箇所の mast cell数に明らかな差がないことを確認したので3箇所の平均 mast cell数を求めた。

結果

① マウスにおけるin vitro子宮内膜脱落膜化実験系の確立

1. 子宮内膜間質細胞純度の検討

今回の方法により得られた子宮内膜由来細胞の96.4%にビメンチンの発現が認められ、サイトケラチン陽性細胞は3.6%にとどまり、子宮内膜間質細胞の純度は96%以上であり、子宮内膜上皮細胞の混入率は4%以下と考えられた。電顕的にもほとんどの回収細胞でin vivoの子宮内膜間質細胞と同様の特徴(核細胞質比が大きく、クロマチンが核膜の内側に凝集し、大型の核小体を有する)が認められた。

2. E2、P添加培養による脱落膜化の検討

ステロイド非添加群とE2 0.1nM単独添加群では培養10日目に約10倍の細胞数になったが、P 100nM単独添加群およびE2 0.1nM/P 100nM添加群では細胞数の増加は2倍にとどまった。

ステロイド非添加群とE2 0.1nM単独添加群の細胞は紡錘状を呈し細長い細胞質を持ち、線維芽細胞様の形態を示し、21日間の培養期間中に形態変化は認められなかった。一方、P 100nM単独添加群およびE2 0.1nM/P 100nM添加群では培養5~6日目より一部に細胞質の肥大した大型の細胞が出現し始め、培養14日後には核・細胞質ともに肥大した円形的大型細胞が多数出現した。デスミン染色を行ったところ、ステロイド非添加群とE2 0.1nM単独添加群では培養14日目の細胞までデスミン陽性細胞の出現を認めなかったが、E2 0.1nM/P 100nM添加群では、小型細胞および円形大型細胞にデスミン陽性細胞の出現を認めた。さらに、デスミン陽性細胞数の経時的変化を観察するため、培養3、5、7、14日目の培養細胞を回収し細胞塗抹標本作製し、デスミン染色を行い細胞の形態を確認するとともに陽性細胞数を算定した。ステロイド非添加群では全培養期間中、デスミン陽性小型細胞は10%以下、デスミン陽性大型細胞は5%以下であった。これに対してE2 0.1nM/P 100nM添加群ではまずデスミン陽性小型細胞が培養3日目から5日目にかけて20%強に増加

し、7および14日目には10数%に減少した。デスミン陽性大型細胞は培養5日目から増加し始め、培養7日目にはデスミン陽性小型細胞より多数を占め約30%にまで増加した。一方、デスミン陰性小型細胞の比率は減少し、全構成細胞の55%にまで低下した。

脱落膜化を促進する物質として報告のあるEGF、IGF-I、PGE₂をE2 0.1nM/P 100nM添加培養に加え、デスミン陽性細胞数を経時的に算定した。これらの生理活性物質の添加によってデスミン陽性細胞の出現パターンはE2 0.1nM/P 100nM添加群と同様であったが、培養14日目に得られたデスミン陽性大型細胞の出現率は3因子とも約40%に達しE2 0.1nM/P 100nM添加群よりも高率であった。デスミン陽性の小型細胞の出現はデスミン陽性大型細胞の出現に先立って認められ、やはりこれもE2 0.1nM/P 100nM添加群と同様のパターンを示した。最終的に得られたデスミン陽性細胞の比率は60%に達した。一方デスミン陰性小型細胞は約40%にまで低下した。

4~5週齢未熟マウスの子宮内膜間質細胞の超微形態を透過型電子顕微鏡にて観察したところ、辺縁の不整な核を有し、細胞質の乏しい細胞であることが示された。核内のクロマチンは核膜内側に凝集して存在する傾向が認められた。また、細胞間結合は認められず、細胞密度も疎であった。この形態は回収し培養に供した子宮内膜由来細胞の主たる構成細胞と極めて類似の構造を示した。一方妊娠7日目の子宮内膜間質細胞、すなわち脱落膜細胞は類円型の緊満化した核を有し、核内のクロマチンは核内全体にびまん性に存在していた。また細胞質は著しく肥大し、粗面小胞体の発達拡張、ライソゾーム、ミトコンドリアの発達、グリコーゲン顆粒の増加を認め、細胞間にはギャップ結合を認めた。これに対して培養14日目の細胞ではステロイド非添加群の細胞は7~10層に多層化したものの細胞質に乏しく、核も不整形で核内のクロマチンが核膜内側に凝集する傾向が認められ、細胞間結合は認められなかった。一方E2 0.1nM/P 100nM添加群の培養14日目の細胞を検討したところ、細胞は2~3層に多層化したにすぎなかったが、円形大型細胞には*in vivo*の脱落膜細胞と同様に細胞質は肥大し粗面小胞体の発達拡張を認め、細胞間結合を思わせる細胞膜上の変化を認めた。

以上の結果より本研究では従来報告のなかったマウスにおける*in vitro*脱落膜化の系の確立に成功したものと考えられた。培養子宮内膜間質細胞は卵巣ステロイドホルモンの添加により、紡錘形から円形的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、*in vitro*において脱落膜化の一端が再現できたと考えられた。

② 脱落膜化に作用する生理活性因子の検討

1. 子宮内膜内移植と子宮腔内移植の着床率の比較

胚着床率はDay2では腔内移植0.0% (0/22)、内膜内移植18.2% (4/22)、Day3では腔内移植50.0% (8/16)、内膜内移植42.9% (6/14)、Day4では腔内移植37.5% (6/16)、内膜内移植35.7% (5/14)、Day5では腔内移植0.0% (0/14)、内膜内移植8.3% (1/12)、Day6では腔内移植0.0% (0/8)、内膜内移植18.2% (0/8)であった。Day2 受卵雌においては内膜内移植でのみ着床率が成立した。

2. 各種生理活性物質の共移植に及ぼす効果

Day2受卵雌ではヒスタミン (100 μM)で着床率40.0% (2/5)と対照群0.0% (0/5)と比べ着床率改善傾向を認め、プロゲステロン (100nM)では共移植群、対照群とも着床率11% (1/9)でありhCG (50IU/ml)では対照群のみ着床率14% (1/7)であった。Day5受卵雌では共移植群、対照群とも着床は成立しなかった。共移植により対照群と比べ着床率改善効果が確認されたのはヒスタミン (100 μM)のみであった。

3. 胚・ヒスタミン内膜内共移植

Day2受卵雌で共移植31.5% (17/54)と対照群10.0% (3/30)に較べ有意に着床率の改善を認めた。他では有為差は認められず、Day3は共移植53.6% (15/28)、対照群40.0% (12/30)、Day4は共移植30.8% (8/26)、対照群40.0% (8/20)、Day5は共移植12.5% (2/16)、対照群

15.0% (3/20)であった。

4. 子宮内間質細胞とヒスタミンとの共培養

内間質細胞は17日間の培養で基本培養液中では約10倍に増殖したがこれにE2 0.1nM/P 100nMを加えて培養すると細胞増殖は約2倍ととどまった。この培養系にそれぞれヒスタミンを添加しその影響をみたがヒスタミンは培養子宮内間質細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。対照群では全期間中デスミン陽性小型細胞は10%以下、デスミン陽性大型細胞は5%以下であったが、これにヒスタミンを添加しても変化はなかった。E2 0.1nM/P 100nM添加群ではまずデスミン陽性小型細胞が培養3日目から5日目にかけて20%強に増加しそれより漸減すること、およびデスミン陽性大型細胞は培養5日目より増加し培養7日目には約30%にまでなることが確認されたが、これにヒスタミン添加してもその傾向に変化はなかった。

5. ヒスタミン添加胚培養実験

ヒスタミン(100 μ M)を胚盤胞培養系に添加しhatching率、栄養外胚葉の拡がり対照群と比較した。栄養外胚葉の拡がり対照群で24時間後 $2.92 \times 10^{-2} \text{mm}^2$ 、であり48時間後には $9.51 \times 10^{-2} \text{mm}^2$ と約3倍に拡大したがヒスタミン添加による有意な変化はなかった。

6. 共移植後の子宮内膜の形態

Day2受卵雌ではヒスタミン・胚共移植後1~12時間に移植部位の反間膜側を中心として一過性の間質浮腫を認めた。H.E染色では移植後48時間以内では脱落膜化は確認できなかった。

7. 子宮内mast cellの局在と数

mast cellは子宮内では9割以上が漿膜、筋層に存在し子宮内膜内には少量のみ存在するが、子宮横断面での平均mast cell数はDay2 98、Day3 88、Day4 71、Day5 40と妊娠の経過とともに減少することが確認された。特に子宮内膜内mast cellは妊娠の経過とともに消失していることが確認された。

考察

本研究①ではマウスの子宮内間質細胞の分離・回収および培養を行い、これまで報告のなかった*in vitro*脱落膜化モデルの確立に成功した。1匹のマウス子宮より平均 6.0×10^5 個の細胞が回収できた。回収された細胞のうちサイトケラチン陽性細胞が平均3.6%、ビメンチン陽性細胞が平均96.4%であったこと、また超微形態学的検討の結果*in vivo*における子宮内間質細胞に類似の構造を示し、血管内皮細胞の特徴であるWeibel-Palade顆粒やマクロファージの特徴である多数のライソゾームを認めなかったことから、目的とした子宮内間質細胞が回収できたものと判断された。4つの異なる条件下で子宮内間質細胞を培養したところ、いずれも4日目にconfluentに達したが、P非添加群が約10倍に細胞数が増加したのに対し、P添加群では2倍にしか増殖しなかった。また対照群の細胞が7~10層に多層化したのに対してP添加群では2~3層に多層化したのみであった。このようにPによって細胞増殖および多層化の抑制が認められた。

位相差顕微鏡により経時的な形態変化の推移をみたところ、E2/P無添加群およびE2 0.1nM単独添加群では培養期間中常に紡錐形の線維芽細胞様の形態を示したが、E2 0.1nM/P 100nM添加群およびP 100nM単独添加群では培養5~6日目より一部に大型の細胞が出現し始め、核・細胞質ともに肥大した円形大型細胞が経時的に増加した。子宮内膜における脱落膜化に際して、子宮内間質細胞は敷石状の大型細胞へ変化することが知られており、本研究で観察された培養細胞の大型化はいわゆる脱落膜化の一環である可能性が考えられ、さらに形態的に脱落膜化したと考えられた円形大型細胞が脱落膜細胞としての機能を有しているかどうかを確認するため、脱落膜蛋白として知られているデスミンの発現が免疫染色により認められ、機能的にもデスミン産生能の観点からは脱落膜化が起きていることが確認された。

細胞塗抹標本作製しデスミン陽性細胞の出現の推移を経時的に観察した結果、デスミ

ン陽性大型細胞の出現に先立って、まずデスミン陽性小型細胞が出現し、これが減少に転じた後にデスミン陽性大型細胞が増加することが明らかとなった。さらに詳細な検討を要するものの、この結果はデスミン陽性小型細胞がその後大型細胞へと経時的に変化するものと解釈することが可能であろうと考えられた。子宮内膜における脱落膜化の過程はこれまで主として形態学的に検討されてきたが、デスミン陽性小型細胞の出現とその機能的特徴についてはこれまで報告がなく、本研究で認められたデスミン陽性小型細胞からデスミン陽性大型細胞への転換は、脱落膜化の過程をさらに詳細に解析する方法を提供し得たことになろう。また透過型電子顕微鏡像で超微形態を調べると、*in vitro*で得られたデスミン陽性大型細胞には細胞質の肥大、粗面小胞体の発達拡張、ミトコンドリアの発達、細胞間結合を思わせる細胞膜上の変化が確認され、高い蛋白合成能を有する細胞に変化していることが示された。これらの所見はこれまで子宮内で出現することの知られている脱落膜細胞の特徴と類似のものであった。

以上の結果より、本培養系における円形大型細胞は形態的および機能的に脱落膜細胞の特徴を備えていることが確認され、従来報告のなかったマウスにおける*in vitro*脱落膜化モデルの確立に成功したと考えられた。

近年、脱落膜化細胞はプロラクチン、IGFBP-1、TGF- α 、TNF- α 、GM-CSF、IL-1 β 、IL-6、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲンIV、デスミンなど種々の蛋白を産生し、また細胞間結合を形成して細胞間情報交換をさかんに行っている細胞であることが明らかとなってきている。本培養系で得られた脱落膜化様細胞においては、これらの蛋白産生についてはデスミンについてのみ検討を行っただけであり、また細胞間結合に関しても、これを示唆する変化は認められたものの完全な形では確認することができず、機能的にも*in vivo*の脱落膜化とは異なっている可能性が示された。今回の実験ではデスミン陽性細胞を指標としたいわゆる脱落膜化は21日間の培養中最大で約60%の細胞に認めた。子宮内では子宮内膜間質細胞全体の中でどの程度の細胞が脱落膜化するかは詳細にはわかっていないが、一般的にはより広範囲に出現すると理解されている子宮内での脱落膜化に比べると低い値にとどまっているのではないとも考えられる。子宮内の脱落膜細胞をとりまく環境には、胚や子宮内膜上皮細胞が存在し、さらに多数のサイトカインあるいは成長因子を分泌していると考えられる免疫担当細胞をはじめとする諸種の細胞が存在し、それらが複雑なネットワークを形成しながら脱落膜化を進行させていると考えられている。脱落膜化という生物現象に対する理解を深めるためには、本培養系で十分に検討がなされていないこれらの諸因子の脱落膜化に及ぼす影響の検討が不可欠であり、今後の課題として残されている。

本研究②でヒスタミン・胚内膜内共移植法により偽妊娠Day2 受卵雌で高い着床率が得られ、内膜内共移植法で着床率の改善が得られることを示す実験的根拠を得た。

ヒスタミンは分子量111.15の生理活性アミンでありL-ヒスチジンの脱炭酸化反応で生成される。その生物的作用機序はH1、H2、H3の各レセプターを介して発揮されるものであり、H1レセプターが刺激されるとホスホリパーゼCが活性化しセカンドメッセンジャーとしてイノシト-ル三リン酸およびジアシルグリセロールが産生され、H2レセプターが刺激されるとアデニル酸シクラーゼが活性化しセカンドメッセンジャーとしてcAMPが産生される。H3レセプターについて詳しくは解っていない。ヒスタミンは生体内ではmast cellにほとんどが貯蔵されていることが知られている一方、微量だが種々の組織で産生されることも知られている。子宮内では血管内皮、血管平滑筋、子宮平滑筋、およびT細胞、好酸球、好塩基球、好中球、マクロファージなどの免疫担当細胞にヒスタミンレセプターが存在することが知られている。また、Deyら(1979)はラビット子宮内膜にH1レセプター、胚盤胞にはH2レセプターが存在することを明らかにしたが、子宮内膜を構成するそれぞれの細胞に如何なるヒスタミンレセプターが存在するのかは今尚明らかとなっていない。今回得た実験結果からDay2受卵雌でヒスタミンとの共移植で着床率が向上することが明らかとなった。ヒスタミン・胚共移植により"implantation window"は早い時期に向かって拡大したともいえよう。本実験で投与したヒスタミン量は子宮角のヒスタミン総量(Padilla、

1990)の1/3~1/6量に相当するがこの作用機序を考えるにあたって従来のレセプターの局在からすると子宮平滑筋の収縮もしくは弛緩、血管透過性の亢進、子宮内膜に対する直接作用、あるいは胚へ直接作用、免疫担当細胞への作用が考えられる。子宮内膜間質細胞の増殖、脱落膜化に及ぼすヒスタミンの影響を培養系を用いて調べたがヒスタミン(100 μ M)は子宮内膜間質細胞の増殖に何等影響を及ぼさず、脱落膜細胞の指標となるデスミン陽性細胞の出現にも何等影響を及ぼさなかった。このようにヒスタミンが内膜内間質細胞に直接作用して脱落膜化に寄与している根拠は得られなかった。用いた実験条件下ではヒスタミンの添加は胚発生に影響を及ぼさなかった。胚・ヒスタミン共移植後の子宮の形態を1、6、12、24、48時間後のH.E標本にて調べたが脱落膜化が促進されているという証拠は得られず、間質の浮腫が認められたのみであった。一方、血管の透過性の亢進および浮腫が妊娠が成立する過程で確認されることは古くから知られており、着床部位での血管透過性の亢進はラット、マウス(Finn, 1967)、モルモット(Orsini, 1971)、ハムスター(Orsini, 1963)など種々の齧歯類において確認されることから、妊娠成立のために普遍的に必要な条件であると推測される。Abrahamsohn(1983)は血管透過性の原因である"血管内皮細胞の窓"および"血管内皮細胞間の間隙"がラット着床部位において確認出来ることを電子顕微鏡を用いて明らかにしている。血管透過性の亢進が胚着床部位に局限して生じていることはこの現象には胚からの何らかの物質が関与していること(Kennedy, 1983)を推測させる。胚から産出され直接的に血管透過性亢進作用を有する物質としてはヒスタミン(Dey, 1980)、エストロゲン(Gadsby, 1980)、プロスタグランジン(Bronson, 1978; Sananes, 1981)、胚由来ヒスタミン分泌因子(Cocchiara, 1992)が報告されている。これらが如何にして胚着床部位に血管透過性の亢進をひきおこすかについては詳しくは解っていない。妊娠子宮では分泌顆粒を内蔵するmast cellが減少することを今回確認したが同様の報告が多数なされている(Hore, 1988)。この現象は着床過程でmast cellがこの分泌顆粒を放出したことを示すものと理解されており(Mckercher, 1973; Ashton, 1972)、本研究では改めて着床現象へのヒスタミンの関与が重要である事が示されたといえる。すなわち、本実験で投与されたヒスタミンは子宮内膜内のヒスタミンレセプターと結合し血管透過性の亢進をもたらし、その結果血管内から種々の物質、遊走細胞などが移行し、間質細胞の状態、脱落膜化の過程などが修飾されたものと理解する。

文献

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、1997（印刷中）

Abstract

Ovulation induction, especially gonadotropin therapy, may induce extraordinarily high concentrations of sex steroids in both serum and endometrium during the period of implantation. Our aim is to elucidate the effect of this condition on the embryo implantation. As a first step, we have done two studies in 1996, that is ① ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* DECIDUALIZATION SYSTEM IN MICE and ② CO-TRANSFER OF BIOACTIVE SUBSTANCES TO ENHANCE IMPLANTATION RATE IN MOUSE INTRA-ENDOMETRIAL EMBRYO TRANSFER.

① ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* DECIDUALIZATION SYSTEM IN MICE

Aim of the study : Our knowledge on the mechanism of implantation is still limited. Progress in understanding the mechanism of implantation has been hampered by the complexity of cellular interaction between early embryos and endometrial stromal cells (ESCs). Although *in vitro* system of implantation will contribute to study such complex biological phenomena *in vivo*, it is ethically impossible to use human embryos. Therefore,

the establishment of animal models is mandatory to study the mechanism of implantation. As a first step, we have established the *in vitro* decidualization system in mice.

Materials and Methods : ICR female mice (4-5 weeks old) were used. Uterine horns were aseptically removed and were minced into cubes. The minced samples were digested with 0.25% collagenase for 60 min. at 37°C and were pipetted into separate endometrial cells from uterine muscle layer. The epithelial cells were removed by filtration through two layers of 10µm and 30µm nylon meshes. Purified ESCs were seeded on plastic dishes at a density of 1×10^5 cells/cm² in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics. For induction of decidualization, estradiol (E, 0.1 nM) and progesterone (P, 100 nM) were added into medium during culture period.

Results and Conclusions : Immunocytochemical analyses using cytokeratin and vimentin antibodies revealed that purity of collected ESCs was more than 95%. ESCs cultured with E and P proliferated to confluency on the 4th day of culture. Morphological transformation into large and decidual-like cells was observed as early as on the 5th to 7th day of culture with E/P or P alone. Ultrastructurally, these cells developed abundant amounts of rough endoplasmic reticulum during the transformation. Desmin staining revealed decidual change of cultured ESCs. These findings indicate that mouse ESCs in culture respond to ovarian steroids and show morphological and functional changes that are similar to those associated with decidualization *in vivo*. This *in vitro* decidualization model in mice will provide us the new strategy for studying the interaction between the embryo and endometrium.

② CO-TRANSFER OF BIOACTIVE SUBSTANCES TO ENHANCE IMPLANTATION RATE IN MOUSE INTRA-ENDOMETRIAL EMBRYO TRANSFER

Aim of the study : Since Shelesnyak reported the pivotal role of histamine in endometrial stromal decidualization in 1952, histamine has been said to be one of the decidualization inducers. Peri-implantation embryos secrete the histamine-releasing factor and increase the histamine concentration in the local milieu surrounding themselves, thus facilitating the decidualization. In the present study, we evaluated the effect of the co-transfer of histamine on the implantation rate in intra-endometrial mouse embryo transfer.

Materials and Methods : Mouse blastocysts (ICR strain) were recovered on day 4 of pregnancy and were transferred together with histamine (100µM) into the endometrium of the pseudopregnant mice (histamine group). As controls, intra-endometrial transfers without histamine were also performed simultaneously (control group). One blastocyst was transferred into each uterine horn using a glass micropipette. The implantation rates were evaluated 8 days after embryo transfer.

Results and Conclusions : In pseudopregnant day 2 recipients, significantly higher ($p < 0.05$) implantation rate was obtained in histamine group (31%) than in control group (10%). There was no significant difference in pseudopregnant day 4 recipients. In conclusion, the intra-endometrial embryo transfer together with histamine improves the implantation rate of pseudopregnant day 2 recipients, suggesting that histamine may widen the "implantation window". Study to clarify the mechanism of this improvement by histamine is now on the way. So far, histamine has no effect on the blastocyst development *in vitro* in terms of hatching rates and trophoectoderm outgrowth. Marked stromal edema was found around the embryos transferred with histamine. Histamine may enhance implantation not by the direct effect on embryos but by the modification of the local milieu surrounding 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

性成熟期婦人においては、視床下部-下垂体-卵巣-子宮内膜機能連関と呼ばれるように、中枢に制御されている卵巣から分泌された性ステロイドにより周期的に形態的・機能的分化を繰り返し、子宮内膜は妊卵の着床に備えている。排卵誘発周期においてはこの精緻な機能連関が作動せず、特にゴナドトロピン療法においては卵巣から過剰なエストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲンが産生され、妊卵の着床環境を提供する子宮内膜は自然周期とは異なる形態的・機能的状況となっているものと考えられる。本研究においては以下の方法により、排卵誘発周期における着床環境を検討する予定であるが、本年度においては(1)(2)について知見が得られた。

(1) マウスにおける *in vitro* 子宮内膜脱落膜化実験系の確立

(2) 脱落膜化に作用する生理活性因子の検討

(3) 各種性ステロイド濃度下における脱落膜化の形態的・機能的差異の検討、

(4) *in vitro* 子宮内膜脱落膜化実験系の上で胚を共培養し、胚発育・脱落膜化・胚と子宮内膜の相互作用の検討。

排卵誘発周期における着床環境を検討する上で重要なマウスにおける *in vitro* 子宮内膜脱落膜化実験系を確立した。また、ヒスタミンが子宮内膜内胚移植実験系において *implantation window* をより早い方向に拡大することを見いだした。今度これらの系を用いて(3)(4)の検討を行う予定である。