不妊症対策としての経頸管的胚移植に関する基礎的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 本保, 喜康 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8293

金沢大学十全医学会雑誌　第101巻　第1号　26－33　(1992)

不妊症対策としての経頸管的胚移植に関する基礎的研究

金沢大学医学部公衆衛生学講座（主任：岡田　晃教授）
本　保　喜　康

（平成4年1月7日受付）

ヒト体外受精および胚移植 (Human in-vitro fertilization and embryo-transfer, ヒト IVF-ET) における低成功率 (10－20%) の原因の一端を解明するために，BDF_1雌マウスの胚を，ヒト体外受精胚と同様に経頸管的に偽妊娠ICR雌マウスの子宮へ移植した．26ゲージの腰椎穿刺針を改造した胚移植用器具内に1.0－1.5μlの培養液と共に5－15個の胞胚を浮遊し，交尾後第3・1/2日目のレシピアントマウス（3・1/2日レシピアント）の子宮下部へ移植すると，最良の着床率64% (126/198) を得た．この着床率は，経腹壁的に子宮腔へ胚を移植した諸文献における着床率 (70－75%) および本実験で経腹壁的に卵管内へ胚移植した際の着床率56% (85/150) に比し大差がない．これに対し3.0μl以上の培養液に浮遊して3・1/2日レシピアントに移植した胞胚の着床率は0% (0/104)，1.0－1.5μlの培養液に浮遊し2・1/2日レシピアントに移植した2細胞期胚から桑実胚の着床率は0.7% (1/137) と低値であった．次いでインジゴカルミンで青色に染色し胚を浮遊しない培養液を同様な条件で子宮内へ注入して一時間後に観察すると，培養液は子宮口より流出していた．また3－4細胞期胚を2・1/2日レシピアントに経頸管的に移植し，交尾後第4日目の早朝に子宮内を還流 (flush 法) すると，移植胚の10% (3/30) のみが回収された．すなわち着床率急低下の原因として移植胚の殆どが着床前に子宮腔から排出されることが示唆された．次いで，レシピアントマウスの腹腔内へβ_2Stimulant であるリトドリン (ritodrine) を注入し，子宮収縮抑制を試みた．2－4細胞期胚と2・1/2日レシピアントの組み合わせで，リトドリンを使用または使用しない場合の着床率は，各々0% (0/46)，および1% (1/89) であった．一方，8－16細胞期胚と3日早朝レシピアントの組み合わせでは，リトドリンを使用または使用しない場合の着床率は各々9% (7/75)，および0% (0/90) であった．後者の組み合わせではリトドリンの効果が認められた ($p<0.05$)．以上の実験結果により，2－8細胞期のヒト体外受精胚移植後にある割合の胚が子宮腔から排出されると考えられた．このことがヒトIVF-ET法における低成功率の一因であるとするならば，母体への子宮収縮抑制剤投与がヒトIVF-ET法の成功率を改善する一策である可能性がある．このような薬剤の検索を更に進める上で，経頸管的胚移植のマウスモデルが有用と考えられた．

Key words mice, embryo transfer, ovum implantation, beta adrenagic receper agonist

両側卵管閉塞による不妊症の婦人に対し，従来は卵管移植またはマイクロサージャリィ (microsurgery) による卵管接合[1]が唯一の治療方法であった．しかしこの治療法は卵管腔が広範囲に癒着した婦人には適用できにくい[2]．そこでこのような婦人にも適用できる治療法としてヒト体外受精および胚移植法 (Human in-vitro fertilization and embryo transfer, ヒト IVF-ET 法)[3]が普及しつつある．しかしこの治療法の成功率が10－20%にすぎない現状[4]では，公衆衛生学見地からは不妊症対策としてのヒトIVF-ET法が完成しているとは言いがたい．したがってこの治療法の成功率の向上を計ることが重要な課題である．

ところでヒトIVF-ET法の低成功率の原因は移植胚の低着床率にある．またこの低着床率は，母体のホルモン環境，移植胚の質，胚移植の時期などにおける難点[5][6]や，胚体外培養中の発生遅延による胚・子宮内膜間の位相のずれ[7]などに原因があるとされる．加うるに頸管を通して子宮腔へ移植（経頸管的胚移植）されたヒト胚が着床を開始するまでの子宮との相互作用が未解明という問題も考えられるが，この問題を調べるには動物モデルが必要である．すなわち，動物モデルにおける経頸管的移植胚の着床率と，卵管内への経腹壁的移植（経腹壁的卵管内移植）および子宮壁を貫いた子宮腔への経腹壁的移植（経腹壁的子宮内移植）胚の着床率とを比較検討することによって，問題解明の糸口が見いだされる可能性がある．

さてマウス子宮の頸管は狭小ではあるが，経頸管的胚移植で良好な着床率を得たというMoler ら[8]の報告に着目し，本研究では経頸管的胚移植モデルとしてマウスを選択した．まずマウス胚経頸管的移植における最適条件を決定し，その際の着床率を経腹壁的移植胚の着床率と比較した．さらに最適条件以外での移植胚の着床率低下の原因について移植胚の子宮内動態という観点から解明を試み，この低着床率が薬物投与によって改善される可能性を検討した．これらの実験結果に基づき，ヒトIVF-ET法における低着床率の原因と対策について，移植ヒト

Abbreviations: GIFT, gamate intra-fallopian transfer; HCG, human chorionic gonadotropin; IVF-ET, in-vitro fertilization and embryo transfer; m-W medium, modified Whittingham's medium; PGs, prostaglandins; PMS, pregnant mare serum

胚の子宮内動態という観点から考察した．

材料および方法

Ⅰ．材　料

受精胚を提供するドナー (donor) として体重 10-15g の 7-8 週齢の灰黒色の BDF_1 雌マウス (三協ラボサービス，東京) を，胚移植を受けるレシピアント (recipient) として体重 10-15g の 7-9 週齢の白色の ICR 雌マウス (三協ラボサービス) を使用した．これらのマウスを人工昼夜 (昼時間 07：00-19：00，飼育室温 20℃)，自由摂餌・摂水のもとで1週間飼育した後に実験に供した．

Ⅱ．実験方法

1．マウス胚の採取

1）ドナーマウスの作製

マウス過排卵処理の常法[9]通り，16時に妊馬血清 (pregnant mare serum, PMS) (帝国臓器，東京) 5.0 I.U. を，その48時間後に絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonodortropin, HCG) (帝国臓器) 2.5 I.U. を BDF_1 雌マウスの腹腔内に注入し，同系の雄マウスと同居させた．翌朝腟栓 (Plug) 形成により交尾を確認したマウスをドナーとし，その日をそのドナーマウスの交尾後第1日目と定義した．

2）卵管内の胚の採取

常法[9]通り交尾第1日目のドナーマウス (第1日ドナー) を頸椎脱臼法で屠殺して卵管を採取し，卵管膨大部壁を解剖針で破壊し卵管内に一塊をなしているマウス胚を引き出した．

3）子宮腔内の胚の採取

常法[9]通り2，3，4，5日ドナーを頸椎脱臼法で屠殺し，卵管付きの子宮を採取して30ケージの注射針を卵管端に挿入し，修正ウィッティンガムの培養液[10] (modified Whittingham's medium, m-W medium) を卵管から子宮腔へ注入すると，マウス胚が子宮断端より流出する (flush 法)．これらの胚を培養液中に移し炭酸ガス培養器内 (37℃，5％炭酸ガス＋95％空気) で保存した．

2．マウス胚の移植

1）レシピアントマウスの作製

常法[9]通りエステルス (esterus) 期の ICR 雌マウスを精管結紮を施した ICR 雄マウスと同居させ，翌朝腟栓形成により交尾を確認し，この偽妊娠マウスをレシピアントとした．またその日をそのレシピアントの交尾後第1日目と定義した．

2）マウス胚の経腹壁的卵管内移植

常法[9]通り，レシピアントの体重 10g あたり 0.5mg のペントバルビタール (大日製薬，大阪) を腹腔内に注入して麻酔し，側背部の切開創より卵管を引き出し，胚を浮遊させたガラス細管製の移植用器具の先端を実体顕微鏡下で卵管采部より卵管膨大部に挿入し胚を移植した．

3）マウス胚の経頸管的移植

i）マウス胚の経頸管的移植に使用する器具の製作

26ゲージの腰椎穿刺針 (八光社，長野県戸倉町) を 3-5cm の長さに切断して切断面を滑らかに研磨し，滑り止めとして内針に軽く折れ目をつけた．これを経頸管的胚移植時にマウス胚を保持し移植するための器具 (経頸管的胚移植用器具) とした．マウス用の小腟鏡はパスツールピペットを利用して作製した．

ii）マウス胚経頸管的移植手技

卵管内胚移植の場合と同様の麻酔を施してレシピアントを手術台に固定する．実体顕微鏡下で胚移植用器具の内針を引きつつ 5-15 個のマウス胚を吸引した後，小腟鏡を用いて強照明下で胚移植用器具の先端を外子宮口から子宮腔へ挿入し，次いで胚移植用器具の内針を外筒に押し込んで胚を子宮腔へ移動させた (図1)．

4）移植したマウス胚の着床の判定

胚移植の10日後にレシピアントを頸椎脱臼法で屠殺し，子宮内に発生した胎仔数及びその発育状況を観察した．

3．経頸管的移植マウス胚が高率に着床する条件の検討

1）自然排卵周期 ICR 雌マウスの妊孕性

4－6匹の自然排卵周期の ICR 雌マウスと1匹の ICR 雄マウスを同居させて毎朝観察し，腟栓形成により交尾が確認された雌マウスを他のゲージに隔離した．交尾後第10日目に雌マウスを屠殺して子宮内に発生した胎仔数を確認した．

2）マウス胚の経頸管的移植に使用する器具

4・1/2日ドナーから採取した胞胚を交尾後第3・1/2日目のレシピアントマウス (3・1/2日レシピアント) (以下，このような組み合わせを4・1/2→3・1/2と記す) に，経腹壁的胚移植で使用されるガラス細管製および自案による腰椎穿刺針製の2種の胚移植用器具を用いて経頸管的に移植し着床率を比較した．なお以後のマウス胚の経頸管的移植では腰椎穿刺針製の胚移植用器具を使用した．

3）ドナーとレシピアントの組み合わせ

ドナーとレシピアントを2・1/2→2・1/2，3・0→3・0，3・1/2→2・1/2，3・1/2→3・1/2，4・1/2→3・1/2，4・1/2→4・1/2，5・1/2→4・1/2，と組み合わせて胚を経頸管的に移植し，各々の場合の着床率を求めた．

4）経頸管的胚移植用器具内に胚を浮遊させる培養液量

4・1/2→3・1/2の組み合わせを用い，1.0－1.5μl，3.0μl，および4.5μlの培養液に浮遊した10－15個のマウス胚

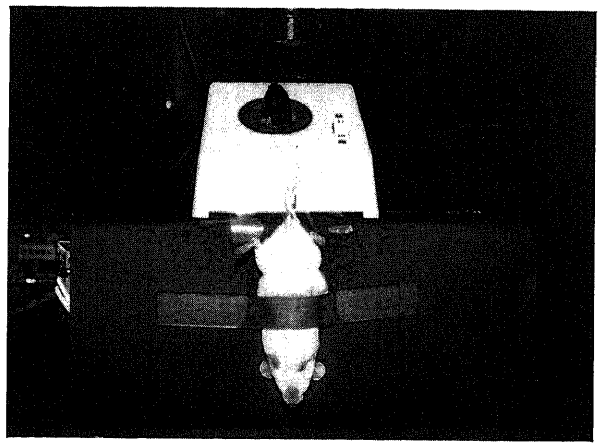

Fig. 1. Photograph of transcervical transfer of mouse embryos. Five to fifteen of BDF_1 mouse embryos are sucked in a tool made of 26-gage lumbar puncture needle with 1.0-1.5 ul of m-W medium. The cervix of the uterus of a ICR psuedo-pregnant mouse is visualized under a strong illumination with a aid of a speculum made from a Pasteur pippet. The tip of the tool trapping the embryos is inserted about 7mm into the uterine cavity via cervical canal and the embryos are expelled by depressing the plunger of the needle.

を各々18匹，4匹，4匹のレシピアントマウスの子宮下部に経頸管的に移植し，着床率を求めた．またインジゴカルミン（第一製薬，東京）で青く着色し胚を浮遊しない培養液1.0－1.5μl，および3.0μlを各々5匹の3・1/2日レシピアントの子宮下部へ経頸管的に注入し，直後に綿栓を腟腔内へ挿入した．1時間後腟腔から取り出した綿栓に付着した青色液の拡がり具合を観察した．またエステルス期のICR雌マウスを，妊孕性のあるICR雄マウスと同居させて交尾を確認し，交尾後第3日目に胚を浮遊しない培養液1.0－1.5μlおよび3.0μlを各々3匹のICR雌マウスの子宮下部へ経頸管的に注入し，このことが雌マウス自身の胚の発生に及ぼす影響を調べた．

5）経頸管的にマウス胚を移植する子宮内の部位

子宮内の部位を卵管付着部から1/3，内子宮口から1/3およびその中間部に分け，各々を子宮上部，子宮下部および子宮中部と記す．さて，4・1/2→3・1/2の組み合わせで長さ3cmおよび4cmの胚移植用器具を用いて，それぞれ子宮下部および子宮中部に5－10個の胚を移植し着床率を調べた．

4．経頸管的に移植したマウス早期胚の着床率を高めるための基礎的検討

1）2・1/2日レシピアントの子宮へ経頸管的に移植した胚と培養液の動態

2・1/2日レシピアント3匹の子宮へ30個の3－4細胞期マウス胚を経頸管的に移植し，着床開始直前の交尾後第4日の早期にこのマウスの子宮内を還流して（flush法）子宮内の胚の回収を試みた．またインジゴカルミンで青く着色し胚を浮遊しない培養液1.0－1.5μlを，2・1/2日レシピアント5匹の子宮腔へ経頸管的に注入し，直後に腟腔内に綿栓を挿入した．1時間後に腟腔から取り出した綿栓に付着した青色液の拡がり具合を観察した．比較のため3・1/2日レシピアント3匹を用いて同様の実験を行った．

2）2・1/2日および3・0日レシピアントに経頸管的に移植した胚の着床率を向上させる対策

2・1/2日および3・0日レシピアントの子宮筋の収縮を抑制して子宮腔からの移植胚の排出を防止する目的で，レシピアントの腹腔内に塩酸リトドリン（ritodrine）（キッセイ薬品，松本）3mg/kgを注入し，30分後に2・1/2日レシピアントに3－4細胞期胚，3・0日レシピアントに8－16細胞期胚を経頸管的に移植した．さらにその60分後に塩酸リトドリン3mg/kgを追加注入し，移植胚の着床率を調べた．また，同様にリトドリンを投与した2・1/2日目および3・0日レシピアントに，インジゴカルミンで青く着色し胚を浮遊しない培養液1.0－1.5μlを経頸管的に子宮腔へ注入し，その直後に腟腔内に綿栓を挿入した．約2時間後に綿栓を腟腔から取り出し，その綿栓に付着した青色液の拡がりを観察した．

3）経頸管的マウス胚移植と比較するための経腹壁的卵管内マウス胚移植

ガラス細管製の移植用器具を用いて1日レシピアント8匹の両卵管内へ合計150個の1細胞期胚を移植し着床率を求めた．

Ⅲ．統計学的検定

得られた結果は，Fisherの直接確率計算により危険率 $p=0.05$ 以下を有意差ありと判定した．

成　　績

Ⅰ．自然排卵周期雌ICRマウスの妊孕性の検討

自然排卵周期のICR雌マウスは，ICR雄マウスとの1度の交尾で94%（17/18）が妊娠し，一側の子宮に2匹から13匹；7.08±2.84（平均値±標準偏差）匹の正常なマウス胎仔が発育していた．

Ⅱ．マウス胚の経頸管的移植に用いる胚移植用器具の検討

ガラス細管製の器具を用いて移植した胚の着床率は4%（2/140），腰椎穿刺針製の器具を用いて移植した胚の着床率は64%（126/198）であった．

Ⅲ．ドナーとレシピアントの組み合わせの検討

ドナーとレシピアントの組み合わせでは4・1/2→3・1/2（64%），5・1/2→4・1/2（50%）で良好な着床率を得，3・1/2→3・1/2（36%），4・1/2→4・1/2（13%）で着床率が低下し，2・1/2→2・1/2（1%），3・1/2→2・1/2（0%），3・0→3・0（0%）では殆ど着床しなかった．またドナーの時期がレシピアントの時期よりも一日早い場合に良好な着床率を得た（表1）．なお2・1/2日レシピアントに移植した胚は殆ど着床せず，3・1/2日レシピアントに移植した胚は子宮内全体に規則正しく着床し，4・1/2日レシピアントに移植した胚は子宮下部に集中して着床するという傾向が認められた．

Ⅳ．胚移植用器具内に胚を浮遊させる培養液の量の検討

1.0－1.5μlの培養液に浮遊して移植したマウス胚の着床率は64%（126/198）であったが，3.0μl以上では着床率は0%（0/104）であった（図2）．またインジゴカルミンで着色した1.0－1.5μlの培養液を子宮内に注入した場合，観察した5個の綿栓に青色液は殆ど付着していなかったが，3.0μlでは観察した5個中4個の綿栓に相当量の青色液が付着していた．また妊孕性のあるICR雄マウスと交尾した3匹のICR雌マウスの子宮下部へ1.0－1.5μlの培養液を注入しても，その部に着床した雌マウス自身の胚の発育への影響を認めなかった．しかし3.0μlの培養液を子宮下部へ注入した3匹のICR雌マウスの内の2匹に於いて，子宮下部に着床した雌マウス自身の胚の発育は，同一子宮の他部位に着床した胚の発育に比し著しく遅延しており，且つ胚は死亡していた．

Ⅴ．経頸管的にマウス胚を移植する子宮内の部位の検討

子宮下部に移植した胚の着床率は65%（106/163）であったが，子宮下部に移植した胚の着床率は57%（20/35）であった．

Ⅵ．2・1/2日レシピアントの子宮腔へ経頸管的に移植したマウス胚の動態の検討

Table 1. The effect of combinations of post-coital stages of donor and recipient on the implantation rates of transcervically transferred mouse embryos

post-coital stages (in days) of donor (stage of embryos)	post-coital stages (in days) of recipient	implantation rate
2・1/2-day (2-4 cell)	2・1/2-day	1% (1/89)
3・0-day (8-16 cell)	3・0-day	0% (0/90)
3・1/2-day (16 cell-morula)	2・1/2-day	0% (0/40)
	3・1/2-day	36% (30/83)
4・1/2-day (morula-blast cyst)	3・1/2-day	64% (126/198)
	4・1/2-day	13% (12/92)
5・1/2-day (late blast cyst)	4・1/2-day	50% (4/8)

(/) represents (total number of implanted embryos/total number of transferred mouse embryos).

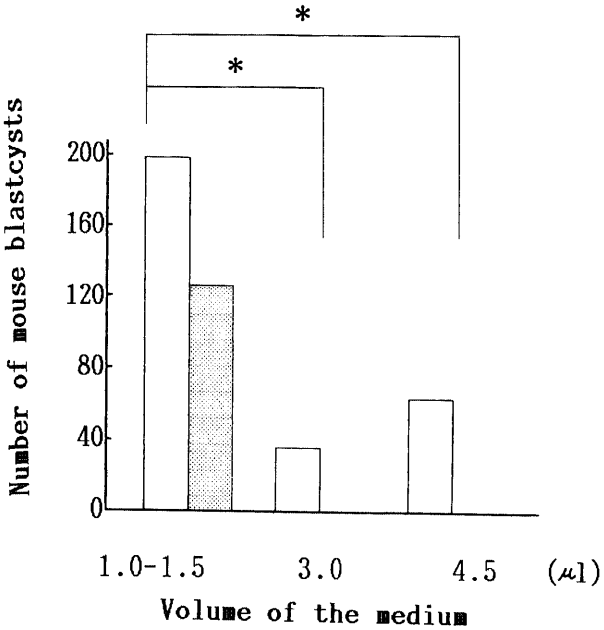

Fig. 2. Influence of volume of the medium (m-W medium) which is floating BDF_1 mouse blastcysts at the time of embryo-transfer on implantation rates. Blastcysts were sucked in the tool made of the lumbar puncture needle with different amounts of the medium and transferred transcervically to 3·1/2-day ICR recipients. □, transferred blastcysts; ▨, implanted blastcysts. *, $p<0.01$ by Fisher's exact test for fourfold tables.

2・1/2日レシピアントに移植した3－4細胞期胚の10%(3/30)が回収され，その内2個が正常な胞胚に発育していた．3・1/2日レシピアントに移植した桑実胚の60%(18/30)が正常な胞胚として回収された(図3)．また，2・1/2日レシピアントの子宮へインジゴカルミンで着色した培養液を注入した場合，全ての綿栓に相当量の青色液が付着していたが，3・1/2日レシピアントでは5個の綿栓に培養液は殆ど付着しなかった．

Ⅶ. 2・1/2日レシピアントの子宮内へ経頸管的に移植したマウス胚の着床率を向上させる対策の検討

3－4細胞期胚と2・1/2日レシピアントの組み合わせでは，リトドリンを投与しない場合の着床率は1%(1/89)で，投与した場合の着床率は0%(0/46)であった．8－16細胞期胚と3日早朝レシピアントの組み合わせでは，リトドリンを投与しない場合の着床率は0%(0/90)であったが，投与した場合の着床率は9%(7/75)であった(図4)．一方リトドリンを投与した2・1/2日および3日早朝レシピアントに，インジゴカルミンで着色した培養液を注入した場合，前者では5個中3個(60%)，後者では4個中2個(50%)の綿栓に相当量の青色液が付着した．

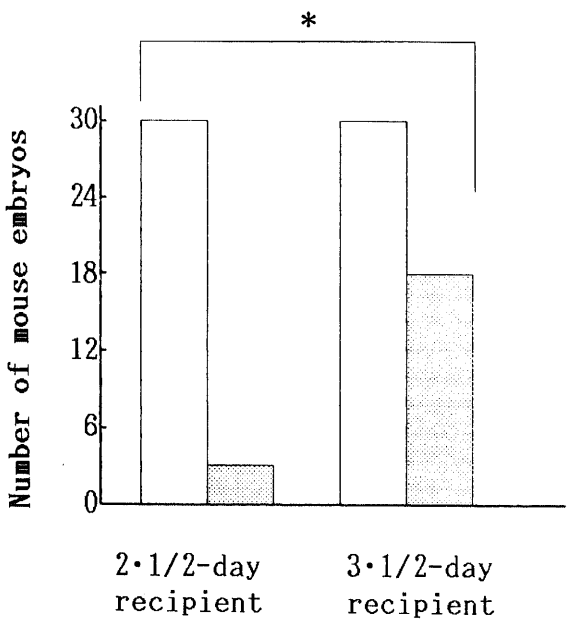

Fig. 3. Numbers of BDF_1 mouse embryos recovered from the uterine lumen of 4·1/2-day ICR recipients by flushig method. The mouse embryos were transferred transcervically to the ICR recipients one day and two days before flushing. □, transferred embryos; ▨, recovered embryos. *, $p<0.01$ by Fisher's exact test for fourfold tables.

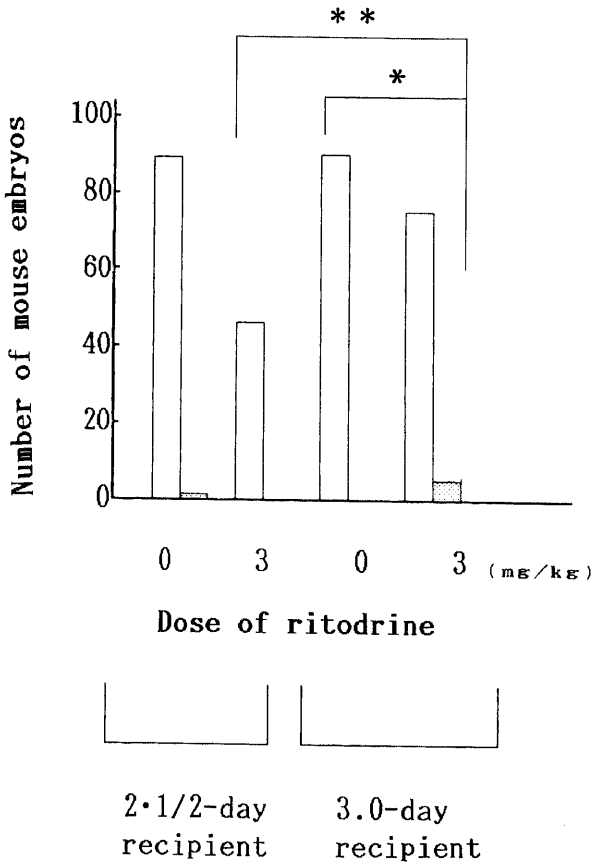

Fig. 4. Effect of ritodrine on implantation rates of BDF_1 mouse embryos. The embryos were transferred transcervically to the uterus of 2·1/2-day and 3.0-day ICR recipients injected 3mg/kg of ritodrine. □, transferred embryos; ▨, implanted embryos. *, $p<0.01$; **, $p<0.05$ by Fisher's exact test for fourfold tables.

Ⅷ．マウスにおける卵管内胚移植の検討

1日レシピアントの両卵管内へ1細胞期胚を移植すると，レシピアントの妊娠率は100％（8/8）で，移植胚の着床率は56％(85/150) であった．

考　　察

ヒト体外受精胚移植後の低着床率の最大原因は，ヒト胚体外培養の最適条件が明確でないために培養期間中に胚の発育が遅延し，子宮内膜の位相とのずれが生ずることにある[7]とされる．さて自然のヒト胚は桑実胚から胞胚期に子宮腔に達する[11]．にもかかわらず，ヒト体外受精胚が2－8細胞期に子宮腔へ移植される[12]のは，体外培養期間中の発育遅延を最小におさえるためと考えられる[7]．しかしこの早期移植ヒト胚が子宮腔内でいかなる過程を経て着床に至るかは殆ど解明されていない．このことはヒト IVF-ET 法の低成功率を改善する上での一つの隘路である．本研究では，経頸管的に移植した早期胚が着床に至る過程の一端の解明を目的としたが，そのためにはヒト以外の哺乳類における経頸管的胚移植実験を必要とした．ところで哺乳類の胚の経頸管的移植は1951年 Beatty[13]のマウスでの成功に始まり，1962年から1975年にかけてウサギ[14]，ウシ[15]，ヤギ[16]，ブタ[17]，ラット[18]，ウマ[19]，などで経頸管的胚移植による仔が出生した．経頸管的移植胚の着床率は当初2－30％程度で，経腹壁的に卵管や子宮腔へ移植した胚の着床率（60－80％）に比し低率であった．しかしウシでは経頸管的胚移植の精力的研究が行われ，現在では経頸管的移植ウシ胚の50－70％が着床するようである[20]．この意味でウシはヒト体外受精胚移植の良いモデルである．ところがウシでは胚胞を子宮内膜の位相を適合させた里親 (foster mother) に移植するため，ヒトのような2－8細胞期胚移植は殆ど行われない．そこで本研究では一般の実験室にとり格好なマウスをモデルとし，まず経頸管的移植マウス胚が高率に着床する条件を確定した．次いで経頸管的移植2－8細胞期マウス胚の子宮内動態を調べた．これらの結果は，ヒト体外受精胚移植の成功率を改善するため基礎的研究として意義が大きいと考える．以下，本実験の成績について逐次考察する．

本実験から，経頸管的に移植したマウス胚が高率に着床する条件が明らかとなった．自然排卵周期の ICR 雌マウスの妊孕性の検討から，偽妊娠 ICR 雌マウスはレシピアントに適し，一側の子宮に移植する胚の数は5－15個が適当と考えられた．また2種の経頸管的胚移植用器具の検討から，マウス胚の経頸管的移植では適切な胚移植用器具を使用することが重要と考えられた ($p<0.01$)．さらにドナーとレシピアントの組み合わせによる経頸管的移植胚の着床率の変化を調べた結果，4・1/2→3・1/2の組み合わせが最良であることなど，マウス胚の経腹壁的子宮内移植による報告[21]と良く一致した．ところで Moler ら[7]は，特殊なマイクロシリンジ内にマウス胚を浮遊して経頸管的に移植し60％の良好な着床率を得たが，これは胚を1 μl 程度の微量の培養液に浮遊して移植したことによるとした．本実験では彼らの推定が正しいことを確認した ($p<0.01$)．さらにインジゴカルミンで着色した培養液を子宮腔に注入した後に子宮口からの漏出を観察した実験の結果を考慮すると，マウス胚を3.0 μl 以上の培養液に浮遊し経頸管的に子宮に移植すると，移植胚は培養液と共に子宮腔から排除されると考えられる．また3.0 μl の培養液を注入した子宮下部に着床した雌マウス自身の胚が発生途中で死亡していたことから，胚の発育を阻害するような局所的変化が子宮内膜に生じていたと考えられる．このようにマウス胚の経頸管的移植では，移植時に胚を浮遊する培養液量を1.0－1.5 μl とする必要があるが，これはマウスの子宮腔が狭小なためと考えられる．ウシ胚の経頸管的移植では，胚を浮遊する培養液量と胚の着床率との関連を調べた報告はないようである．ウシ子宮腔の容量は非常に大きく，このような影響が認められないのであろう．ヒト IVF-ET 法では移植時に胚を浮遊する液量が着床率に及ぼす影響を調べた報告がみられ，Knutzen ら[22]はその液量が120 μl 以上では妊娠率が有意に低下するとした．また Johnston ら[23]は10－50 μl の範囲では妊娠率に有意な差がないと報告した．従ってヒトでは120 μl 以上の液に浮遊して移植した胚は子宮腔から排除される可能性がある．しかし通常では，ヒト胚は10－30 μl の液に浮遊して移植されるので臨床上の問題はないと考えられる．

また，本実験では経頸管的マウス胚移植部位として子宮下部が良いという結果を得たが，それには以下の理由が考えられる．すなわち子宮中部へ経頸管的に胚を移植しようとすると，子宮内腔に過剰な刺激が加わるために子宮内膜に局所的変化が生じ，そこに着床した胚が死亡する可能性，または子宮の蠕動が高進して移植胚が子宮腔から排除される可能性が考えられる．ウシでも，経腹壁的子宮内胚移植の最適部位である子宮上部に経頸管的に胚を移植しようとすると，移植胚の着床率が低下しかねないとする報告がある[24]．さてヒト IVF-ET 法では体外受精胚は子宮底近傍の子宮腔に移植されるが，その根拠は明らかではない．ヒト IVF-ET 法では妊娠反応の陽性のみで流産に終わる例がかなりあり[4]，その一つの原因として，胚移植操作時の過剰刺激による子宮内膜の局所的変化が考えられる．すなわち経頸管的胚移植では，胚移植操作時の子宮内膜への刺激を極力少なくするために，例えば胚移植用器具の先端を丸く滑らかに加工するなどの工夫や経頸管的胚移植に対する熟練が大切と考えられた．

さてウシ胚の経頸管的移植では，胚移植時に膣腔や子宮頸管内の常在菌が子宮腔へ持ち込まれて潜在的な子宮内膜炎を起こし，移植胚の着床が阻害されると言われてきた[25]．その対策として膣腔通過時に胚移植用器具の先端を紙で覆うと移植胚の着床率が向上した[26]とされる．マウス胚移植では膣鏡を使用し膣内の粘液に触れずに胚移植用器具の先端を外子宮口へ挿入するので，胚移植に際し膣内細菌を子宮腔へ持ち込むという危険性は少ない．しかし頸管内の常在菌は胚移植時に子宮腔へ持ち込まれるはずである．それにもかかわらず移植胚は良好に着床することから，頸管内の常在菌は問題とはならないようである．ヒト IVF-ET 法でも，膣鏡を使用して胚移植用器具が外子宮口に直接に挿入されており，且つ胚移植用器具を二重筒にすることが多く[27]膣内や頸管内の常在菌を子宮腔へ持ち込むという危険性は殆どないと考えられる．

ところで3・1/2日レシピアントに経頸管的に移植した胚は良く着床するが，2・1/2日レシピアントでは殆ど着床しない．そこで経頸管的移植胚に対する両者子宮の反応を比較検討することは有意義である．さて以前より，経頸管的胚移植の際の子宮頸管への刺激がオキシトシン (oxitocine) の分泌を促すために子宮の蠕動が増強され，移植した胚が子宮腔から排出されると言われてきた[28)~30)]．またマウス胚の経腹壁的子宮内移植の際に，子宮への過剰刺激があると子宮の強い蠕動を視認す

ることがある．このことから，本実験で2・1/2日レシピアントの子宮へ経頸管的に移植した3－4細胞期胚の90%が失われたのは，胚移植操作時の刺激によって子宮の蠕動が誘発されたためと推定される．この際のオキシトシンの役割は本実験では明らかではない．一方3・1/2日レシピアントでは経頸管的に移植した桑実胚の60%が子宮腔内に残るが，この場合には胚移植操作時の刺激では子宮の蠕動が殆ど誘発されず，オキシトシンの作用も問題でないと考えられる．ウシでは Trounson ら[31]が，経腹壁的子宮内胚移植の最適時期より3日ほど遅いエステルス (oesterus) 後第7－9日目に経頸管的胚移植を行うと着床率が向上すると報告している．ウシではエステルス前後約一週間の子宮の活動性が高く，この時期に経頸管的に移植した胚は子宮腔外へ排出され易い[32][33]が，エステルス後第5－7日目以降は子宮の活動性が低下し，経頸管的に移植した胚が子宮腔内に止まると考えられる．以上のようにウシとマウスにおいて，経頸管的胚移植では子宮の活動性が低下したと考えられる時期を選択することが重要であるという結論が一致した．なお1日レシピアントの卵管内へ1細胞期胚を経腹壁的に移植すると着床率は概ね良好 (56%) であった．このことは，子宮の活動性が高い時期は移植胚が卵管内で保持され，子宮の活動性が低下する頃に子宮腔へ輸送されたと解釈できる．この観点からも早期胚を卵管内へ移植する方法[34] (Gamate intra-fallopian transfer, GIFT 法) は合理的であるが，両側卵管閉塞による不妊の婦人には適応できない．

さて Noyes ら[35]は1日レシピアントマウスの子宮内へ移植した1－2細胞期胚が変性するとしている．本実験では，3－4細胞期胚を移植した後に回収できた3個の胚の内2個が正常な胚胞に発育しており，また2－4細胞期胚移植では正常に発育した1匹のマウス胎仔を子宮内に認めた．これらの観察により，3－4細胞期胚は1－2細胞期胚よりも子宮内環境で生き延びる能力を持つことが示唆されるが，さらに検討が必要であろう．

ところで Katayama ら[36]は，ヒト体外受精胚移植に際し母体にリトドリンなどを投与すると妊娠率が有意に向上すると報告した．ウシでも，Coulthard[37]が子宮収縮抑制剤であるクレンブテロール (Clenbuterol) を投与し着床率が向上したとしている．このように，経頸管的胚移植の際に子宮収縮抑制剤を投与すると移植胚の着床率が向上したとする幾つかの報告があるが，定説とはいえいない．そこで，子宮収縮抑制剤投与により経頸管的移植マウス胚の排出予防と着床率の向上が計れるか否かを調べる必要があろう．本実験からは2・1/2日レシピアントではリトドリンの効果を認めず，3日レシピアントではリトドリンの効果を多少認めた．このことから，リトドリンは2・1/2日レシピアントの子宮の収縮を抑制できないが，3日早朝レシピアントの子宮の収縮を多少抑制すると考えられる．しかし，リトドリン投与後にインジゴカルミンで着色した培養液を子宮腔へ注入した実験では，両者共に注入培養液の排出抑制作用を認めなかったことからリトドリンこの作用は微少であろうと考えられた．

さて，2・1/2日レシピアントマウスの子宮が経頸管的移植胚を排出する働きには，神経系およびホルモン系の関与が考えられる．β_2促進剤 ($\beta_2$stimulant) であるリトドリンが2・1/2日レシピアントの子宮へ移植した胚の排出を抑制できないことから，この時期のマウス子宮の移植胚排出作用における神経系の役割は小さいと考えられる．Siimes ら[38]はヒツジを用いた実験で，リトドリンがオキシトシンにより惹起された子宮筋の収縮を抑制すると報告している．この報告を考慮すれば，経頸管的移植胚を排出する働きにおけるオキシトシンの役割も小さいと推定される．

ところで Ham[39]はエストラディオール (estradiol) が子宮内膜細胞のプロスタグランデイン (prostaglandins, PGs) の産生を刺激すること，また Kennedy[40]および Lau ら[41]はマウス胚の着床に PGs が関わること，さらに木下ら[42]はマウス胚を子宮腔内で規則正しく配分する際に PGs が重要な役割を果たすことを示した．Batta ら[43]はラットの着床前期の子宮腔内にプロスタグランデイン E_2 を投与すると子宮腔内の胚が排出されたと報告し，千村[44]はマウス子宮筋を用い，PGs により惹起された子宮筋の収縮はリトドリンよりも，カルシュウム拮抗剤であるベラパミル (verapamil) によって良く抑制されるとした．さて，2・1/2日レシピアントの子宮はエストロゲン (estrogen) の影響を受けていること，さらにリトドリンはこの時期のマウス子宮の蠕動を抑制できないという本実験結果を勘案すると，この時期の経頸管的移植胚の排出作用への PGs などの局所ホルモンの関与が考えられる．即ちマウス胚の経頸管的移植操作中の刺激により，子宮内膜細胞などから PGs が分泌されて子宮の蠕動が昂進し，移植胚が子宮腔から排除されるという機序が想定される．とすれば2・1/2日レシピアントの子宮の移植胚排出の抑制を計るために検討すべき薬剤として，リトドリン以外にカルシュウム拮抗剤なども考えられる．

以上のように，排卵後早期の子宮腔に経頸管的に移植した胚の排出を防止する薬剤を検索することは，経頸管的移植早期胚が着床に至るまで過程を知る糸口となり，さらにヒト IVF-ET 法への応用に繋がる可能性がある．本研究で確立したマウスにおける経頸管的胚移植手技は容易で信頼性が高く，このような薬剤の検索を進める上で有用と考えられた．

結　　論

ヒト IVF-ET 法における低着床率の原因の一端を探る目的で，ヒト体外受精胚移植法である経頸管的胚移植法を用いてマウス胚を子宮腔へ移植し以下の結論を得た．

1．マウス胚の経頸管的移植における最適条件は，5－15個の胚胚を1.0－1.5μlの培養液に浮遊し，交尾後第3・1/2日目のレシピアントマウスの子宮下部へ移植することである．この場合の移植胚の着床率は64%であった．

2．3.0μl以上の培養液に浮遊して経頸管的に移植したマウス胚は全く着床せず，移植した胚の殆どが培養液と共に子宮腔から排出されたと考えられた．

3．着床期前のマウスの子宮腔下部へ，胚を浮遊しない培養液3.0μlを経頸管的に注入すると，この部に着床したマウス自身の胚の発育が遅延し且つ死亡していた．

4．このことから，ヒト体外受精胚移植の操作時に子宮腔に過剰な刺激が加わると，その部位に着床した胚の発育が遅延し，発生途中で死亡することが考えられた．

5．交尾後2・1/2日目のマウス子宮腔へ経頸管的に移植した3－4細胞期のマウス胚の殆どが着床前に子宮腔から失われた．

6．8－16細胞期マウス胚の経頸管的移植の際にレシピアントマウスにリトドリンを投与すると移植胚の着床率が多少向上

した．

7．これらのことから，ヒト体外受精胚移植後にある割合の胚が子宮腔から排出されると推定されるが，母体へのリトドリン投与によって胚の排出を多少抑制できる可能性が示された．しかしリトドリンのこのような作用は微少と思われ，従って移植胚の排出を効果的に抑制できる薬剤を動物モデルにおいて検索する必要がある．この目的を達成する上で経頸管的胚移植のマウスモデルが有用であろう．

謝　辞

稿を終えるにあたり，御懇切なる御指導と御校閲を賜りました岡田晃教授，高邑昌輔博士に深甚の謝意を表します．また終始御指導をいただいた富山医科薬科大学和漢薬研究所荻田善一教授に心から感謝の意を表します．本研究の遂行にあたり御指導御協力をいただいた富山医科薬科大学動物実験センター東条英昭助教授（現　東京大学農学部助教授），富山医科薬科大学和漢薬研究所病態生化学教室の諸先生，特に林　和子技官に謝意を表します．

なお，本論文の要旨の一部は第31回人類遺伝学会，第4回および第5回日本受精着床学会において発表した．

文　献

1) **Swokin, K.**: Beiträge zur operativen Behandlung der weiblichen Sterilität. Acta Obstet. Gynecol. Scand., **46**, (Suppl. 4), 1-20 (1967).

2) **Lauritsen, J. G., Pagel, J. D., Vangsted, P. & Starup, J.**: Result of repeated tuboplasties. Fertil. Steril., **37**, 68-72 (1982).

3) **Steptoe, P. C. & Edwards, R. G.**: Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet, **2**, 366 (1978).

4) **森　崇英，青野敏博，清水哲也，鈴木秋悦，武谷雄二，富永敏明，永田行博，野田洋一，広井正彦，八神善昭，桑原慶紀**：平成2年度生殖医学の登録に関する委員会報告．日産婦会誌，**43**, 470-476 (1991).

5) **Edwards, R. G.**: Human conception in vitro: new opportunities in medicine and research. *In* A. Trounson & C. Wood (eds.), In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 1st ed. p217-250, Churchill Lvingstone, New York, 1984.

6) **Steptoe, P. C., Edward, R. G. & Purdy, J. M.**: Clinical aspects of pregnancies established with cleaving embryos grown in vitro. Br. J. Obstet. Gynecol., **87**, 757-768 (1980).

7) **安部祐司**：マウス体外受精卵の移植成績に及ぼす環境因子と子宮内膜相関の検討．日産婦会誌，**40**, 821-827 (1988).

8) **Moler, L. T., Donahue, E. S. & Anderson, B. G.**: A Simple Technique for Nonsurgical Embryo Transfer in Mice. Lab. Anim. Sci., **29**, 353-356 (1970).

9) **館　鄰，横山峰介，館　澄江**: 初期胚の移植．哺乳動物の初期発生（妹尾左知丸，加藤淑裕，入谷　明，鈴木秋悦，館鄰編），第1版，257-275頁，理工学社，東京，1981.

10) **Whittingham, D. G.**: Culture of mouse ova. J. Reprod. Fertil., **14** (Suppl.), 7-12 (1979).

11) **Croxatto, H. B., Ortiz, M. E., Dias, S., Hess, R., Balmaceda, J. & Croxatto, H. D.**: Studies on the duration of egg transport by the human oviduct, Ⅱ. Ovum location at various intervals following luteinizing hormon peak. Am. J. Obstet. Gynecol., **132**, 629- (1978).

12) **Trousen, A. O., Leeton, J. F. & Wood, C.**: In vito fertilization and embryo transfer in the human. *In* R. Rolland, E. V. Van Hall, S. G. Hillier, K. P. Mcnatty & J. Schoemaker (eds.), Follicular Maturation & Ovulation, 1st ed. p313-322, Exerpta Medica, Amsterdam, 1982.

13) **Beatty, R. A.**: Transplantation of mouse eggs. Nature, **168**, 995 (1951).

14) **Hafez, E. S. E. & Sugie T.**: Reciprocal treansfer of cattle and rabbit embryos. J. Anim. Sci., **22**, 31-35 (1963).

15) **Sreenan J. M.**: Successful non-surgical transfer of fertilized cow eggs. Vet. Rec., **96**, 490-491 (1975).

16) **Otsuki, K. & Soma, T.**: Transfer of fertilized ova through the cervix in the goats. Bull. Natl. Inst. Anim. Ind., **6**, 27-32 (1964).

17) **Polge, C. E. & Day, B. M.**: Pregnancy follwing non-surgical egg transfer in pigs. Vet. Rec., **82**, 712 (1969).

18) **Vickery, B. H., Erickson, G. I. & Bennett, J. P.**: Nonsurgical transfer of eggs through the cervix in rats. Endocrinology, **85**, 1202-1203 (1969).

19) **Oguri, N. & Tsutusmi, Y.**: Non-surgical egg transfer in mares. J. Reprpod. Fertil., **41**, 313-320 (1974).

20) **杉江　佶**．：受精卵（胚）移植技術の最近の進歩．人工授精研誌，**8**, 70-79 (1986).

21) **McLaren, A. & Michie, D.**: Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster mothers. 1. Factors affecting the implantation and survival of native and transfered eggs. J. Exp. Biol., **33**, 394-416 (1956).

22) **Knutzen, V. & Sher, G.**: The value of uterine measurements and transfer fluid volume in pregnancy outcome in IVF. J. In Vitro Fert. Embryo Transfer., **3**, 146 (1986).

23) **Johnston, W. I. H., Speirs, L. A., Gponow, J. M., McBain, C. J. & Lopota, A.**: Clinical aspects of in vitro fertilization and embryo transfer. *In* G. P. Grosignani & L. B. Rubin, (eds.), In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 1st ed. p353-363, Academic Press, London, 1983.

24) **志村　修**：牛用受精卵移植器による非手術的移植．畜産の研，**39**, 791-792 (1985).

25) **Rowson, L. E. A., Ramming, G. E. & Fry, R. M.**: The relationship between ovarian hormones and uterine infection. Vet. Rec.,**65**, 335-340 (1953).

26) **高橋芳幸**：ウシ受精卵移植における非手術的移植に関する研究．家畜繁殖誌，**29**, 136-139 (1983).

27) **Leeton, J., Trounson, A., Jessup, D. & Wood, C.**: The technique for human embryo transfer. Fertil. Steril.,**38**, 156-161 (1982).

28) **Vandemark, N. L. & Hays, R. L.**: Uterine motility responses to mating. Am. J. Physiol., **170**, 518-521 (1952).

29) **Hays, R. L. & Vandemark, N. L.**: Effect of stimulation of the reproductive organs of the cow on the release of an oxitocin-like substance. Endocrinology, **52**, 634-637 (1953).

30) **Hays, R. L. & Vandemark, N. L.**: Effect of oxitocine and epinephrine on uterine motility in the bovine. Am. J.

Physiol., 172, 557-560 (1953).

31) Trounson, A. O., Rowson, L. E. A. & Willadsen, S. M.: Non-surgical transfer of bovin embryos. Vet. Rec., 102, 74-75 (1978).

32) Harper, M. J. K., Bennet, J. P. & Rowson, L. E. A.: A possible explanation for the failure of non-surgical ovum transfers in the cow. Nature, 190, 789-790 (1961).

33) Brand, A., Taverne, M. A. M., van der Weyden, G. C., Aarts, M. H., Dielman, S. J., Fontijne, P., Drost, M. & de Bois, C. H. W.: Myometrial activity as a possible cause of embryo expulsion. *In* L. E. A. Rowson (ed.), Egg Transfer in Cattle, 1st ed. p41-56, Commission of Europian Communities, Luxemburg. 1976.

34) Asch, R. H., Balmaceda, J. P., Ellsworth, L. R. & Wong, P. C.: Pregnancy after translaparoscopic gamate intrafallopian transfer. Lancet, 2, 1034-1035 (1984).

35) Noyes, R. W., Dickmann, Z., Doyle, L. L. & Gates, A. H.: Ovum Transfers, Synchronous and Asynchronous, in the Study of Implantation. *In* A. C. Enders (ed.), Delayed Implantation, 1st ed. p.197-211, University of Chicago Press, 1963.

36) Katayama, K. P., Rosler, M., Gunnarson, C., Halverson, M. G. & Mayer, A. M.: In vitro fertilization and embryo transfer. Wis. Med. J., 84, 9-11 (1985).

37) Coulthard, H.: The use of clenbuterol in embryo transfer recipients. Theriogenology, 17, 82 (1982).

38) Siimes, A. S. & Creasy, R. K.: Effect of ritodrine on uterine activity, heart rate and blood pressure in the pregnant sheep: Combined use of alfa or beta blockade. Am. J. Obstet. Gynecol, 126, 1003-1010 (1976).

39) Ham, E. A.: Estrogen-directed synthesis of specific prostaglandins in uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1420-1424 (1975).

40) Kennedy, T. G.: Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastcyst implantation in the rat. Biol. Reprod., 16, 286-291 (1977).

41) Lau, I. F., Saksena, S. K. & Chan, M. C.: Pregnancy blockade by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis: its reversal by prostaglandins and progesterone in mice. Prostaglandins, 4, 795-805(1973).

42) 木下勝之，石原　理，堤　治，矢野　哲，佐藤和雄，水野正彦，坂元正一：着床とプロスタグランディン．産婦の世界，36，707-712 (1984).

43) Batta, S. K. & Martini, L.: Anti-implantation effect of prostaglandins in the rat. Prostaglandins, 10, 1075-1086 (1975).

44) 千村哲朗：アラキドン酸代謝抑制物質の子宮収縮に及ぼす影響．日産婦会誌，37，2309-2314 (1985).

An Experimental Study on the Transcervical Embryo-transfer applied to Therapy of Infertile women

Yoshiyasu Hombo, Department of public health, School of medicine, Kanazawa university, Kanazawa 920－J. Juzen Med. Soc., **101**, 26－33 (1992)

Key words mice, embryo transfer, ovum implantation, beta adrenagic receper agonist

Abstract

In order to investigate a cause of the low success rate (10-20%) in human in-vitro fertilization and embryo transfer (human IVF-ET), embryos of BDF_1 mice were transferred to uterus of ICR mice by transcervical route as in human IVF-ET. The best implantation rate of 64% (126/198) was obtained when 5-10 blastcysts in 1.0-1.5 μl of a medium (modified Whittengham's medium) were transferred by a tool made of a 26 gauge lumbar puncture needle to the lower part of uterus of a recipient three and a half days after mating (3・1/2-day recipient). This rate is comparable with ones by transfer through the uterine wall in other manuscripts (70-75%) and oviductal transfer performed in this study (56%). In contrast, when blastcysts in 3.0 μl or more of the medium were transferred to 3-day recipients and 2 cell-molura in 1.0-1.5 μl of the medium were transferred to 2・1/2-day recipients, implantation rates were 0% (0/104) and 0.7% (1/137) respectively. Then the dummy transfer of the medium, dyed blue by indigocarmine, without embryos was done in the same manner. A certain amount of the medium was expelled from the cervical os in an hour. And when 30 of 3-4 cell embryos in 1.0-1.5 μl of the medium were transferred to 2・1/2-day recipients, only three embryos (10%) were recovered by flushing the uterine lumen with the medium on the fourth day after mating. These suggest that, in these two cases, most transferred embryos are expelled from the uterine cavity. In order to relax the uterine muscle, 3 mg/kg of ritodrine (β_2 stimulant) was then administered to recipients one hour before and after the transplantation. In combination of 2-4 cell embryos and 2・1/2-day recipients, implantation rates were 0% (0/46) with ritodrine and 1% (1/89) without ritodrine. By coutrast, in combination of 8-16 cell embryos and 3・1/2-day recipients, implantation rates were 9% (7/75) with ritodrine and 0% (0/90) without ritodrine. Some effect of ritodrine was observed in the latter ($p<0.05$). These findings suggests that some fraction of human 2-8 cell embryos are expelled from the uterine cavity after transplantation and the low success rate in human IVF-ET would be partly improved by administering an appropriate uterine-muscle-relaxant. This mouse model of transcervical embryo-transfer will be useful in screening such agents.