

氏名・(本籍)	喜多伸幸(兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士(論)第268号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成12年6月7日
学位論文題目	マウス初期胚・マクロファージ共培養が移植後の胚発生効率に及ぼす影響
	審査委員 主査 教授 工藤 基
	副査 教授 瀬戸 昭
	副査 教授 野田 洋一

論文内容の要旨

【目的】

卵管内或いは子宮内で発育する初期胚は、極めて良好な発生を遂げるが、*in vitro* では stage specific な発生停止、遅延を生じることが知られている。この現象は特にマウスなどのげっ歯類に顕著に認められ、胚が *in vivo* の環境から提供されるべき種々の胚発生促進因子の欠如、或いは酸化的ストレスに代表される *in vitro* の環境によって胚が遭遇する様々なストレス因子によるものと解されている。そのため、*in vitro* における胚発生の向上を目的として、浸透圧の調整、エネルギー源、アミノ酸、核酸前駆物質、血清、Growth factor などの添加などにより *in vivo* 環境を再現する培養液組成の検討や、各種体細胞との共培養が試みられている。これら培養液組成の調整あるいは共培養が胚発生効率に及ぼす影響についてはこれまで数多く検討されているが、*in vitro* で共培養した胚の子宮内移植後の発生能を詳細に検討した報告はない。われわれはヒト体外受精-胚移植法の成績向上を目的とした基礎的研究の一環として、マウス初期胚とモルモット腹腔マクロファージとの共培養により、高い胚発生効率を得られることをすでに報告しているが、今回この系を用いて *in vitro* で良好に発育した胚が移植後の発生能を有しているかどうかを胚移植実験を行って検討し、また同時に共培養 *in vitro* 胚の超微形態を *in vivo* 胚と比較検討を行った。

【方法】

5週齢 ICR 系雌マウスに PMSG、hCG にて過排卵処理し同系成熟雄マウス交配させ、前核期胚を回収し実験に供した。1) 胚培養-基本培養液は 0.3%BSA+BWW あるいは 0.3%BSA+ α -MEM(control 群)を用いた。共培養には、カゼイン投与にて集積したモルモット腹腔マクロファージ(M ϕ)を回収、 5×10^6 cells/ml に調整した後、それぞれの基本培養液に feeder layer として用い(co-culture 群)、control 群、co-culture 群の4条件下にて前核期胚を培養した。2) 胚の発生能-疑妊娠日齢3日雌マウスを Recipient とし、1) の条件下にて4日間培養した胚を移植胚として子宮腔内に移植した。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、実体顕微鏡下に発育良好なものから上位60%を移植胚として用いた。3) 胚の超微形態-1) の条件下にて4日間培養した胚を透過型電子顕微鏡にて観察し、ミトコンドリアの変性率(クリステの消失、ミエリン形成)、さらにミトコンドリアの機能的状態を反映するマトリックスの electron density を解析した。尚、2)、3) においては同一時刻の子宮腔内より回収した *In vivo* 胚とも比較検討した。

【結果】

control 群における胞胚率は32.0% (40/125; BWW) および48.1% (26/54; α -MEM) であつたのに対して co-culture 群ではそれぞれ77.8% (123/158; BWW)、85.2% (52/61; α -MEM) と有意に改善された ($p < 0.001$)。しかし、引き続き偽妊娠マウスに移植を行っても co-culture 群 (3.7%、2/54; BWW、33.3%、11/33; α -MEM) は、control 群 (3.7%、2/54; BWW、27.2%、9/33; α -MEM) に比して有意な着床率の改善を示さず、さらに、*in vivo* 胚の高い着床率 (52.8%、75/142) にははるかに及ばなかった。見かけの発生効率の改善と、これに伴わない低い

着床効率のギャップの原因を検索するため行った透過型電子顕微鏡による胚の超微形態学的検討では、胚発育促進効果が認められた共培養胚においても、また基本培養胚においても、in vivo 胚と比しミトコンドリアは高率に変性所見（クリスタの崩壊、ミエリン形成）を呈しており、さらにその electron dense matrix が高度に淡明化していることから、ミトコンドリアの機能的障害の存在を示唆する所見が得られた。

【考 察】

本研究によって共培養により見かけ上の形態形成が加速され胚発生が改善されたにもかかわらず、ミトコンドリアの変性を指標とした超微形態学的視点からは、初期胚培養に共培養系を導入してもその変性や機能障害を抑制することが困難であることが明らかとなった。そのため、現段階ではヒト体外受精・胚移植に直ちに臨床応用する前に、ミトコンドリアの変性を可及的最小限に止めるようなさらなる培養系の確立が急務であると考えられる。しかし、移植後の発生能を予測すべく、胚の glucose uptake、pyruvate uptake の測定、glycolytic activity の検討あるいは ATP の定量的解析など、代謝的側面から胚の質的評価を検討した研究も集積されつつあり、それらと併せて本研究で得られたミトコンドリアの変性を指標とした超微形態学的知見は、今後妊娠率の向上を目指した培養環境改良の試みの中で有用な情報を提供するものと考えられる。

【結 論】

胚発育促進効果をもたらす共培養系を導入しても、着床率の改善には至らなかった一因として、ミトコンドリアの変性・機能障害の関与が示唆される実験的根拠が得られた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト体外受精・胚移植法の成績向上を目的とした基礎的研究の一環として、マウス初期胚・モルモット腹腔マクロファージ共培養系を用い、in vitro 胚発生ならびに胚移植後の発生能を bioassay にて検討し、さらに超微形態学的視点からその生物現象を解析したものである。

その結果、共培養により実体顕微鏡レベルでの見かけ上の胚発生は加速されるも in vivo 胚の高い着床率を再現するに至らず、これらの超微形態学的比較検討から、in vitro 胚においてはミトコンドリアが著明に変性していることが確認され、in vitro 環境下の酸化的ストレス等によるミトコンドリアの機能障害がその一因であると推察され得る知見が得られた。

以上の結果より、本研究で得られたミトコンドリアの変性を指標とした超微形態学的知見は、体外受精・胚移植法の成績向上を目指した各種培養環境改良の試みに対し非常に有用な情報を提起するものと考えられ、本論文は博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

なお、本学位申請者は、平成12年5月15日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。