

試験管内受精卵の細胞内呼吸代謝に関する基礎的研究

研究課題番号 57490001

昭和58年度科学研究費補助金(一般研究B)

研究成果報告書

昭和59年3月

研究代表者

清水 哲也

(旭川医科大学医学部教授)

はしがき

先天異常の発生は、発生時期をさかのぼるほどその頻度が高いことが明らかにな、てきている。薬剤を含めた各種環境因子の初期発生に及ぼす影響をヒトにおいて検討するには、ヒト卵子の配偶子成熟期、受精期、卵割期における環境因子の影響を検討しなくてはならない。この目的のためには、ヒト卵子を採取し、受精、卵割子で成長させるシステムが必要とな、てくる。しかし、試験管内受精卵(In Vitro Fertilization IVF)の呼吸代謝に関しては現在のところ全く不明とい、てよい。本研究は微小電極法、核磁気共鳴法によりヒト受精卵の呼吸代謝における基礎的情報をうるため、臨床ならびに動物実験を基に検討を試みたので報告する。

(1) 研究組織

研究代表者：清水哲也（旭川医科大学医学部産婦人科学 教授）

研究分担者； 石川睦男（旭川医科大学
医学部附属病院産婦人科学 講師）
： 田中邦雄（旭川医科大学
医学部附属実験実習機器センター助教授）
： 千石一雄（旭川医科大学
医学部産婦人科学 助手）
研究協力者： 浅川竹仁（旭川医科大学
医学部産婦人科学 研究生）
笠茂光範（旭川医科大学
医学部産婦人科学 助手）
柴田繁男（旭川医科大学
医学部産婦人科学 助手）

(2) 研究経費

昭和57年度	4700千円
昭和58年度	1500千円
計	6200千円

(3) 研究発表

(A) 学会誌等

1) 清水、石川、笠茂：既往帝王切妊娠の予後。
産科と婦人科, 49 (4): 333, 1982

2) 衛藤、笠茂、石川：GS-切迫流産の診断と
予後判定, 産婦人科 Mook, 20: 29, 1982

3) 千石、石川、山下、溝口、笠茂、清水：
超音波断層法による卵胞発育モニタリング
ならびに排卵時期予測, 日本産科婦人科
学会雑誌, 34: 2205, 1982.

4) 千石、石川、清水、野村：先天性副腎皮
質過形成 (21-Hydroxylase 欠損) における妊
娠、分娩例, 日本不妊学会誌 Vol.27. No3.
1982.

5) Ishikawa, Yamashita, Asakawa, Kasamo, Sengoku
Shimizu, Sekiguchi: Plasma Exchange in the

Management of Rh(D) Immunized Twin Pregnancy
Proceedings of the 2nd Symposium on Therapeutic
Plasmapheresis, Tokyo June 5th : 479, 1982

6) Ishikawa, Shimizu : Passage of drugs into the preimplantation blastocyst, Proceeding of the world congress of OB & GYN, 14, 1982

7) Asakawa, W.R. Dukelow : Alternative methods of fertilization for reproductive toxicology. Proceedings of the European Teratology Conference, 1981

8) Asakawa, Dukelow : Chromosomal analysis after in vitro fertilization of squirrel monkey oocytes (*Saimiri sciureus*) 26, 1982.

9) 林、山下、千石、牟礼、石川、清水 : 超音波断片法診断補助操作におけるひとつの試み - オバタメトロによる腎盤内臓器の同定法 - , 超音波医学, Vol 10, No 4. 1983

- 10) 清水、千石：子宮内胎児死の超音波診断。産婦治療。Vol 47. No5, 1983.
- 11) 笠茂、清水：着床周辺期 blastocyst の PGF 産生放出動態，受精・着床 '83 投稿中
- 12) 千石：ヒト卵胞発育，排卵現象に関する臨床的研究—超音波断片法と内分泌学的相関—日本不妊誌。Vol 29. No1. 1984.
- 13) 清水、笠茂：着床とプロスタグランジン。産婦人科の世界，36(1):69, 1984
- 14) 笠茂、石川、千石、山下、清水：着床周辺期における家兎子宮内膜の Prostaglandin F 産生、放出動態。日本不妊学会雑誌投稿中.
- 15) 笠茂、石川、千石、山下、清水：着床周辺期における家兎 blastocyst の Prostaglandin F 産生、放出動態。日本不妊学会雑誌投稿中

- 16) Niikawa, Ishikawa: whole-arm translocation between homologous chromosomes 7 in a woman with successive abortions. Human genetics, 63, 7, 1983.
- 17) K. Tanaka, Y. Yamada, T. Shimizu and Z. Abe: Magnetic Focusing NMR for the Selective Measurement at the Spatially Localized Point, Proc. World Congress on Medical physics and Biomedical Engineering, 24.12, Hamburg, 1982
- 18) 石川, 田中: 超音波断層法による卵胞発育の観察, 産婦人科M. K No. 20, 1982.
- 19) 石川, 清水: 薬剤投与の blastocyst (胚盤胞) への影響. 産科と婦人科. Vol 50, No. 4, 1983.
- 20) 清水, 田中: NMR-CTの原理とその現状
臨床婦人科産科(投稿中)

(B) 口答発表

- 1) 干石、石川、笠茂、清水：超音波断層法によるヒト卵胞発育状態の観察、第24回北海道不妊学会、昭和57年1月23日。
- 2) Ishikawa, Kasamo, Sengoku, Yamashita, Shimizu: Prostaglandin Synthesis in the Reimplantation Blastocyst. Third Southeast Asian and Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, '83, 5. 25.
- 3) 笠茂、干石、溝口、石川、清水：既往帝切例の分娩様式、第30回日産婦学会北日本連合地方部会、昭和57年9月10日。
- 4) 佐々木、笠茂、溝口、石川、清水：超音波断層法による Gonadotropin 療法の Monitoring.
佐々木、笠茂、溝口、石川、清水：妊娠36週で急激な肝機能障害を来した一例、第60回北海道産科婦人科学会、昭和57年9月19日

5) 浅川, 溝口, 石川, 山下, 清水: Im Vitro
での成熟卵および受精卵の染色体分析結
果について. 第34回日本産婦人科学会,
昭和57年.

6) 浅川, 清水: Im Vitroでの未成熟卵のNativatio
並びにfertilizationに関する検討. 第26回北
海道地方部不妊学会. 昭和59年.

7) 笠茂, 石川, 溝口, 山下, 清水: 着床前
Blastocystのprostoglandinの産生, 放出に関
する検討.

浅川, 清水: Im Vitroでの未成熟卵(y2ガリ)
のNativatioとその染色体分析結果につい
て. 第27回日本不妊学会. 昭和57年11月
17日.

8) 干石, 石川, 笠茂, 浅川, 山下, 清水:
超音波断層法による卵胞計測と排卵時刻
の推定. 第34回日本産婦人科学会. 昭和57年

9) 干石、石川、笠茂、溝口、山下、田中、清水：超音波断層法による排卵誘発例の monitoring. 第41回日本超音波医学会、昭和57年.

10) 干石、石川、笠茂、溝口、山下、清水：超音波断層法による卵胞発育、ならびに排卵時腹腔液の検討. 第55回日本産婦人科学会、昭和58年4月3日.

11) 笠茂、石川、干石、溝口、山下、清水：Prostaglandins と着床機構. 着床前 Blastocyst の PGF 産生放出動態. 第55回日本産婦人科学会、昭和58年4月3日.

12) 石川、干石、衛藤、笠茂、柴田、林、山下、清水：産婦人科領域における機能保存手術のための術中超音波検査. 第42回日本超音波医学会、昭和58年5月.

13) 笠茂、石川、干石、溝口、山下、清水：
着床周辺期 Blastocyst の PGF 産生放出動態
第1回日本受精着床学会、昭和58年8月
16日。

14) 笠茂、石川、清水：着床周辺期における
Blastocyst の PGF 産生、放出動態、北海道
ホルモン同好会、昭和58年11月26日

15) 田中、山田、日下部、清水、阿部：星状
焦点磁場を用いた NMR イメージングに関する
基礎的研究、第2回核磁気共鳴医学研究
会大会、1982.

16) 田中、菊池、日下部、山田、清水、阿部
磁場焦点法 NMR による緩和時間 ρ , $\text{inv}\rho$
、測定、第3回核磁気共鳴医学研究会大会
1983.

研究成果

1. ヒト卵胞発育、排卵現象に関する臨床的検討；

ヒト卵子の採取するためには、卵胞発育を正確に知る必要があり、超音波断層法によりヒト卵胞発育を観察した。不妊症患者を対象とし、超音波断層法による卵胞発育と血中 E_2 (estradiol) 値の相関ならびに超音波断層上の排卵と E_2 、LH 値の経時的関係について検討を行った。さらに、婦人科手術患者を対象とし、超音波卵胞計測値と開腹時卵胞実測値の比較検討および卵胞液中 steroid 値、腹腔液 steroid 値の測定を試み以下の結果をみ、以下の結果を得た。① 超音波断層法による卵胞の検出率は 83.6 % であり、また卵胞数と末梢血 E_2 値に相関することが認められた。② 超音波断層上の排卵は LH peak 後 24 時間以内に 69.0 %、 E_2 Peak 後 48 時間以内に 65.2 % に観察された。③ 超音波卵胞計測値と開腹時卵胞実測値との間に高い相関を認め、さらに超音波計測値 16mm

以上の卵胞はE₂, P値とも高値を示めした。

④排卵後のダグラス窩液貯留像を41.8%に認め、この時の腹腔液steroid値は高値を示めした。以上より、超音波断層法により、排卵診断、排卵時刻の精度の高い予測が可能となり、ヒト卵子採取率の向上をもたらすと考えられる。

以上の成績の詳細は添付してある以下の別刷を参照されたい。

1.石川睦男、田中邦雄、超音波断層法による卵胞発育の観察；産婦人科MOOK NO 20 75 1982. 金原出版

2.千石一雄、石川睦男；山下幸紀、溝口久富、笠茂光範、清水哲也；超音波断層法による卵胞発育モニタリングならびに排卵時期予測；日本産婦学会雑誌、34巻12号 2205 1982

3.千石一雄；ヒト卵胞発育、排卵現象に関する臨床的研究—超音波断層法と内分泌学的相関、日本不妊学会雑誌、29巻, 35, 1982.

2. blastocyst (胚盤胞) の代謝

受精卵の代謝の基礎を検討するためのモデル実験を行った。FabroやSieberらが、in vivoで投与されたcaffeine, nicotine, DDT, barbitol, thiopentalなどが着床前の家兎blastocystへ移行蓄積することを明らかにした。このblastocystへの物質移行は、分子量の大小のみならず、イオン化率、脂溶性が移行に関与する大きな因子である。今回、抗生物質と性ステロイドの家兎blastocystへの移行につき基礎的検討を加えた。性ステロイドは、最近WHOの報告にみられるとおり、経口避妊薬が誤って妊娠時期に投与される例が全世界で160,000例にのぼると推定されている。また、抗生物質の使用は、日本を始めとして膨大な量が全世界で消費されており、妊娠投与例が相当数存在すると考えられる。以上の理由より、この二種類の薬剤の着床前blastocystへの移行をみた試みである。cephalosporine系のcephotaximeはplasma中16200 cpm/ml, 子宮へはplasma中の30%, 5060

cpm/g の分布を示し、blastocyst へは 340 cpm/ml と子宮への移行が少いため plasma 比 0.02 とほとんど痕跡程度であった。一方 estradiol は plasma 中 4650 cpm/ml に対し、子宮には 3.5 倍の 16500 cpm/g と高い蓄積を示めし、blastocyst へは、1370 cpm の移行が認められ、plasma 比 0.3 と高値を示めした。この成績から in vivo で投与された estradiol は blastocyst へ高い移行を示し、cephalosporine 系薬剤はほとんど移行しないことが明らかとなった。この成績は、in vitro で両薬剤の autoradiography を行い、in vivo においても同様の成績であることを確かめた。

以上の成績の詳細は添付してある以下の別刷を参照されたい。

4. 清水哲也、石川睦男；薬剤投与の blastocyst (胚盤胞) への影響、産科と婦人科、現代基礎産科婦人科学特集号、50 巻 4 号、106, 58 年

3. 未受精卵、受精卵における呼吸代謝
ゴールデソハムスターを Day-1 に PMS を
25-30 IU注射し、その後 25 IU の HCG を
注射して、superovulation を行い、cumulus
cell をもつ未受精卵を採取した。0.1% のヒア
ルコニダーゼにより cumulus cell を除去し、
BWW medium 内で測定を行った。卵子と medium
を mineral oil によりおおい、Olympus の実体顕微
鏡下で観察を行いながら操作した。成重社製
のマイクロナニフローターでキャピラリの先
端を卵子にちかづけ、顕微鏡注射器を減圧に
して、卵子を保持する。反対側から TCP 製
の細胞内酵素分圧測定用金属電極 - Fragile
Microelectrode をマイクロナニフローターで操作
し卵子内に挿入した。酵素濃度の測定は TCP
製、ケミカルマクロセンサーシステム、
Model 1201 により行った。現在まで、卵子内
の酵素濃度測定の結果が得いたため、手技上に
多くの問題点が生じた。
校正は恒温槽内にバブラー付きの内筒を入れ、

Caの多い塩類液を満した。窒素通気をして、ゼロ点を調節し、10%酸素混合気を通気してデジタル表示を感度調節により21%、150mm Hgに合わせた。培養液中の PO_2 の濃度が3-7%に対し、未受精卵内の細胞内 PO_2 濃度は5-7%、なおおよそ培養液中より1-2% PO_2 濃度の高いことを見い出した。このことは、細胞内酸素濃度が外界の酸素濃度に影響を受けるが、平衡に達するまでに時間と要することと、ある程度の酸素濃度を維持するように働くと推定される。

試験管内受精前後の酸素濃度と試みた。 PO_2 測定用金属電極を未受精卵に挿入し、capacitated spermを注入し、受精を試みたが、未受精卵の活性低下などにより受精に至らず受精前後の PO_2 の変化をとらえることはできなかった。

以上の実験を通じて、卵子の固定、細胞内電極挿入の困難性など多くの問題を克服して卵子内の細胞内 PO_2 測定を初めて成功した。

しかし、受精前後における細胞内酸素濃度の測定は、卵子の保蔵、capacitated sperm の注入の時期など変化させる必要があることが判った。目下、この条件の変化を基に、受精前後の PO_2 測定を本格的に検討を進めている。

核磁気共鳴法による卵子の呼吸、代謝機能に関する基礎的検討

細胞内における呼吸、代謝機能、とくに細胞内 PH は細胞の置かれている状態や生理活性を知る上で必須のパラメータである。従来から細胞内の測定法として、微小電極法、色素の吸収を利用する方法、ラジオアイソトープを用いる方法などが提案され、実用されてきた。しかし、これらの方法は不安定であり、細胞膜を損傷したり、時間経過を追うことができないなどの欠点があり、何れも一長一短である。とくに、本研究テーマである試験管内受精卵細胞内の呼吸代謝機能を解明

するためには、細胞を生きたまま観察し、その機能を調べる必要がある。このような目的に対して、最近 ^{31}P 核を対象とした核磁気共鳴法 (NMR) の利用に関心が高ま、ている。本法は原理的に非破壊的測定法であることから、最近ではX線CTと同様にNMR情報を画像化する。いわゆるNMR-CT装置が開発され、臨床試験が行われている。一方、生きたままの臓器や細胞を生理学的条件下で ^{31}P -NMRを観測することにより、代謝機能を知らうとの研究も次第に多くなってきた。とくに、無機リン酸の化学シフトから細胞内PHを、また他のピークの消長からクレアチンリン酸やATPなど代謝産物の濃度変化を知ることが原理的に可能である。そこで本研究では、従来の測定法以外にNMR法を利用することにより、卵子の呼吸、代謝機能の解明するための基本的諸課題の検討を行なった。すなわち、北大工学部NMR研究室に設置されている200MHz超伝導FT-NM

R装置(バリアン社, XL-200)を借用し、家
兔2頭より採取した受精後6日目におけるbl-
astocyst 8個を10mmφ試料管を用いて ^3P -NMR
スペクトルの観測を行なった。この結果、
S/Nが悪いが α , β , γ -ATPと考えられる
三つのピークが観測された。しかし、7レア
チンリン酸、無機リン酸、糖リン酸などの
リン酸化合物によるピークの観測はできなかった。
本実験を通じて、S/Nを高めるためには
卵子の数をできるだけ多くすること、とくに
受精卵については受精後同一時期とする必要
があるのを凍結保存の必要性が生じ、そのた
めの基礎的検討も行なった。また、試料管内
での卵子の環境を一定に保つ上で、リンを含ま
ない培養液による灌流が必要であることがわ
かった。幸い、本学に超伝導FT-NMR装
置の設置が決定し、本年4月より利用可能は
見通しとなっているので、前記結果に基づいて家
兔受精卵の凍結保存を続けるとともに、目下
灌流装置及びNMR法による本格的な検討と

開始すべく順備を進めている。

まとめ

試験管内受精卵の呼吸、代謝に関しては現在のところ全く不明存のて本研究を施行した。

ヒト受精卵の呼吸、代謝における基礎的情報を得るため、臨床仔らびに動物実験を基に検討を試みた。

ヒト卵子を採取するためには、卵胞発育を正確に知る必要があり、超音波断層法によりヒト卵胞発育を観察した。その結果、超音波上の排卵とLHのpeak、 E_2 のpeakとは極めてよく連動しており、 E_2 peakの48時間後、LH peakの24時間後に排卵する事を明確にした。さらに、超音波卵胞計測値と開腹時卵胞実測値の間に高い相関が認められた。また、超音波計測値16mm以上の卵胞は E_2 , P値とも高値を示し成熟した卵子であることを示めした。以上の成績より、ヒト卵子の採取率の向上とさらに成熟した卵の採取が可能になった。

受精卵の代謝を検討するために、家兔の blastocyst (胚盤胞) への性ステロイド、抗生物質の移行を検討した。これは、試験管内受精における培養液中への抗生剤の添加は必須であり、かつ受精卵の性ステロイド代謝は発育の十分条件であるからである。結果はセファロスポリン系抗生剤の取り込みは、blastocyst / plasma (B/p) 比 0.02 とほとんど認められなかったが、性ステロイドは B/p 比 0.29 と明らかに移行と蓄積が認められた。この結果、IVF の培養液中の抗生剤の添加はあまり影響の少ないことが明らかとなった。また、子宮内における blastocyst に母体から子宮液を通して、着床前に estrogen が移行し、活発に代謝している可能性が明らかとなった。

未受精卵、受精卵における呼吸代謝をガールデッソンハムスターを用いて検討した。マイクロマニユフレターフに、卵子上に細胞内酸素分圧測定用金属電極を挿入し PO_2 の測定を行った。その結果、未受精卵内の細胞内 PO_2 濃度

は5~7%に計測され、培養液中より1~2% PO_2 濃度の高いことを見い出した。また、受精前後の細胞内酸素濃度の变化の測定に関し実験条件の設定により検討中である。

核磁気共鳴法による卵子の呼吸代謝機能に関する基礎的検討を行った。この方法は、無機リン酸の化学シフトから細胞内 pH を、また他のピークの消長からクレアチニンリン酸や ATP などの代謝物の濃度変化を知る事が原理的に可能である。今回、200MHz超伝導FT-NMR 装置(バリアン社 XL-200)を用い受精後6日目の家兎 Blastocyst 8個を10mmφ試料管を用いて ^{31}P -NMR スペクトルの観測を行った。その結果、 α , β , γ -ATPと考えられる三つのピークが観測された。しかし、無機リン酸、糖リン酸などの他のリン酸化合物によるピークの観測はできなかった。今後、受精卵の数を増加させることにより、より高精度の測定が可能なることを見い出した。

試験管内受精卵の呼吸代謝の基礎的情報を

得るため、臨床、動物実験を基に検討を行い十分なる方法論の確立をみた。しかし、ヒト受精卵へこれらの方法論を用いて呼吸、代謝を計測することは、現在のヒト受精卵使用の倫理上の問題があり、今後の課題と考える。