

インドメサチンによるラット着床遅延卵子について

辻 井 弘 忠

信州大学農学部 家畜育種・繁殖学研究室

緒 論

ラット、マウスおよび霊長類では、黄体ホルモンの影響を受けて着床準備の出来た子宮内膜上皮に胚盤胞が定着すると、そこを中心に多核で大型の上皮様の細胞が増殖して脱落膜細胞を形成する。胚盤胞はこの脱落膜に取り囲まれて着床する。この着床開始の第一段階は、胚盤胞に近接した子宮内膜の部分の血管透過性が亢進することが知られている¹⁾。

プロスタグランジンは上述の脱落膜反応および着床に重要な子宮内膜の血管の透過性を高める働きをなしている²⁾。一方、プロスタグランジン合成阻害剤のインドメサチン³⁾は、子宮内膜の血管の透過性を高めるのを阻止すること⁴⁾、また着床を遅延させることが知られている^{2,5,6)}。しかし、インドメサチンによる着床遅延は着床部位の出現が遅いこと、妊娠期間がほんのわずかに延びることから推察されているにすぎない^{2,5)}。また、インドメサチンによる着床遅延卵子については形態など不明な点が多い。そこで、本実験は、インドメサチンによって着床遅延が誘起されるかどうか、また子宮浮遊卵子が存在するかどうかを検討した。

材料および方法

当研究室で育成繁殖している Wistar 系成熟ラット（体重220～250 g）を使用した。飼育条件は、室温、20±1℃、照明は12L:D（午前6時点燈）、餌は市販の固形飼料（オリエンタル酵母工業MF）を用い、餌、水は自由摂取とした。実験に使用した雌は、膣垢検査により4日周期を2回以上繰り返した未経産を用いた。交配は発情前期像を示した夕方、雄と一晚同居させた。翌朝スミア中に精子を見つけた日を妊娠1日目とした。

実験1 12匹の雌を用い、Phillips and Poyser の方法に従って、妊娠3日と4日の午前9時と午後5時の計4回 0.7ml の polyethylene glycol に溶解したインドメサチンを体重当り3 mgを皮下投与を行ない⁵⁾、妊娠7日目に剖検した。

実験2 単一投与で着床遅延が誘起するかを各濃度で検討を行なった。総計71匹を用いて、妊娠5日目の午前9時にインドメサチン1匹あたり0.5, 1, 2, 3, 4, 10mgの各濃度を約0.2mlの胡麻油に溶解したものを、妊娠5日目の午前9時に単一皮下投与を行なった。剖検は妊娠7日目に行なった。

実験3 14匹を用いて投与日の検討を行なった。実験2と同様にインドメサチン2 mgを妊娠4日目と妊娠5日目の各午前9時に単一投与を行ない両者を比較した。妊娠7日目に剖

検した。

実験4 20匹を用いてインドメサチン投与後の着床時期について検討を行なった。実験2と同様インドメサチン2mgを単一投与し、妊娠6日から9日までを24時間隔で調べた。

実験5 6匹を用いてエストロジェンの影響をみた。実験2と同様インドメサチン2mgを単一投与、妊娠7日目にエストロン4 μ g⁷⁾を投与し、30時間後⁷⁾の妊娠8日目の午後3時に剖検した。

実験6 16匹を用いて溶媒投与ならびに実験2と同様インドメサチン2mg単一投与群の各々の妊娠期間、産仔数ならびに胎児重量を調べた。分娩のチェックは、朝と夕方の2度行なった。

各群とも剖検は午前10時頃行なった。剖検15分前に生理食塩水溶解の1%ポンタミンスカーブルー溶液を体重100g当り0.5ml大腿静脈に注入した。剖検時子宮に青く染った部位を着床陽性部位(P・B反応)として数えた。その後子宮重量ならびに黄体数を調べた。採卵はK.R.P液を用い、卵管子宮接合部を切り、子宮頸管側に10ccの注射器に接続したガラス製の採卵ピペットを挿入し、10数回注射器の空気で子宮内に圧力をかけた後、子宮上端部を切って灌流した。灌流液は実体顕微鏡下で観察した。

結 果

実験1 結果を表1に示した。12匹のうちすでに3匹の子宮に卵子の接着部位に小さなふ

Table. 1. Effect of indomethacin treatment (3 mg/kg subcutaneously at 9:00 h and 17:00 h on days 3 and 4) on 'dye reaction' sites and recovery of blastocysts in rats.

No. of rats	No. of dye reaction sites	No. of recovery of blastocysts	No. of corpus luteum	Uterine wt on Day 7 (mg)
12	6.4 \pm 5.7	2.8 \pm 3.8	12.3 \pm 0.9	227.1 \pm 67.3

(Mean \pm S.D.)

くらみが出現していた。またP・B反応で1個体で6.4個の着床反応がみられた。採卵数は2.8 \pm 3.8であった。

実験2 結果を表2に示した。単一投与0.5mgおよび1mgの場合、妊娠7日目着床はすでに起こり、採卵は不能であった。2mgおよび3mg単一投与の場合、死亡率が約12%。P・B反応で1匹当り約6、採卵数1匹当り2であった。4mgおよび10mgでは死亡率が38, 47%とかなり高く、その反面P・B反応ならびに採卵数も1匹当り1とかなり低かった。インドメサチンの投与量の増加につれ死亡率が高まったが、P・B反応は減少した。しかし採卵数の増加はみられなかった。インドメサチン2mgまたは3mgの単一投与によっても、実験1と同様の効果をあげることが判った。

実験3 結果を表3に示した。妊娠4日目と5日目とを比較すると、P・B反応ならびに

Table 2. Effect of concentration of indomethacin on 'dye reaction' sites and recovery of blastocysts in rats on day 7 of pregnancy.

Dose (mg/rat)	Mortality (%)	No. of dye reaction sites	No. of recovery of blastocysts	No. of corpus luteum	Uterine wt (mg)
0.5	0/8	11.0±1.4	0	13.0±0.8	254.3±43.8
1	0/10	7.7±3.8	0	12.5±1.0	235.2±35.1
2	2/17 (11.7)	6.2±4.4	2.0±2.2	11.8±1.1	195.3±46.5
3	1/8 (12.5)	5.6±2.1	2.1±1.2	12.4±0.9	215.2±39.5
4	5/13 (38.0)	1.3±1.3	1.3±1.9	12.5±0.7	220.7±37.8
10	7/15 (46.6)	1.0±0.9	1.2±2.2	11.9±0.8	213.6±28.9

(Mean ± S. D.)

Table 3. Pregnancy on day 7 in rats as influenced by indomethacin treatment (2 mg) on day 4 and day 5.

Time of injection	No. of rats	No. of dye reaction sites	No. of recovery of blastocysts	No. of corpus luteum	Uterine wt (mg)
Day 4	7	7.4±4.7	1.7±1.7	11.8±1.5	210.6±61.8
Day 5	7	5.6±2.1	4.1±1.2	12.4±1.0	215.2±39.5

(Mean ± S. D.)

Table 4. Time course for the effect of indomethacin (2mg) on 'dye reaction' sites and recovery of blastocysts in rats.

Time of autopsy (day)	No. of rats	No. of dye reaction sites	No. of recovery of blastocysts	No. of corpus luteum	Uterine wt (mg)
6	5	1.0±1.1	8.8±1.9	11.9±1.3	205.0±27.1
7	5	4.0±2.0	3.2±1.7	12.4±1.0	207.0±53.3
8	5	12.5±0.6	2.2±1.1	12.7±1.0	203.8±35.2
9	5	12.6±0.5	0	12.9±0.7	273.8±43.2*

*P<0.05 (Mean±S. D.)

採卵数も統計的に有意差がみられなかったが、妊娠5日目の方が、P・B反応が低く採卵数が多かった。

実験4 結果を表4に示した。インドメサチン投与後、子宮の着床部位のふくらみは経時的に多く、また大きくなった。特に妊娠8日目には、着床部位がはっきりと観察された。P・B反応は、妊娠8日目から急激に増加した。採卵数は妊娠6日で8.8、7日で3.2、8日で2.2、9日で0と妊娠7日以降減少した。子宮重量は妊娠8日目が他と比べて有意に重かった。

図1は、妊娠3日目に卵巣除去、その後 progesterone 2mg/0.2cc を連日皮下投与して着床遅延誘起を起させ妊娠8日目に採卵した⁸⁾もので、未だ胚盤胞の時期であった。

図2は、溶媒のみを注射し妊娠6日目に採卵した卵子で、卵子の一部分で着床が開始していた。

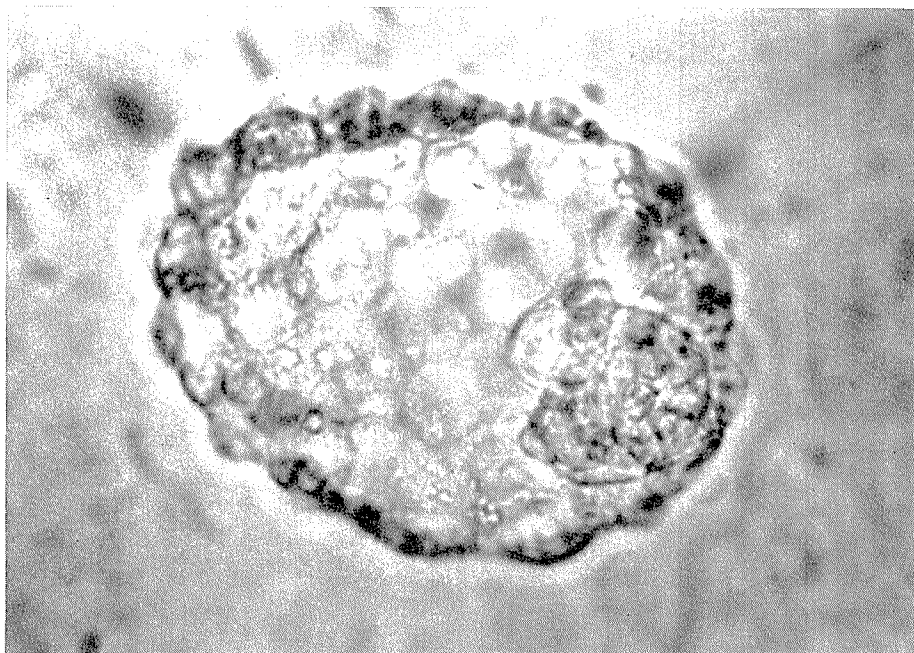


Fig. 1 Delayed-implantation rat blastocyst on day 8 of pregnancy.
Ovariectomized, progesterone-treated rat. $\times 400$.

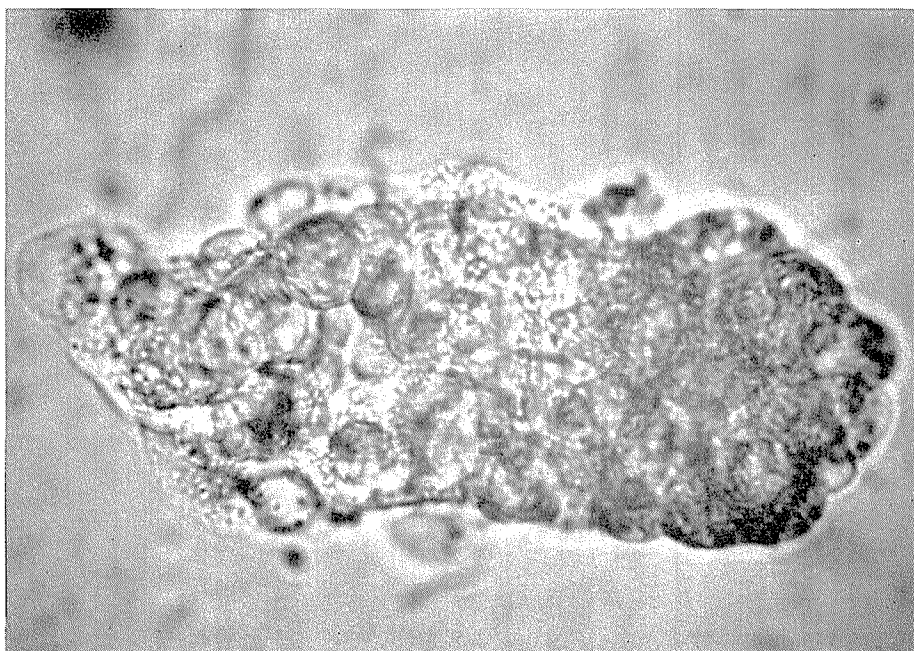


Fig. 2 The embryo on the morning of day 6 of pregnancy in oil treated
rat. A part of the embryo started on the implantation. $\times 400$.

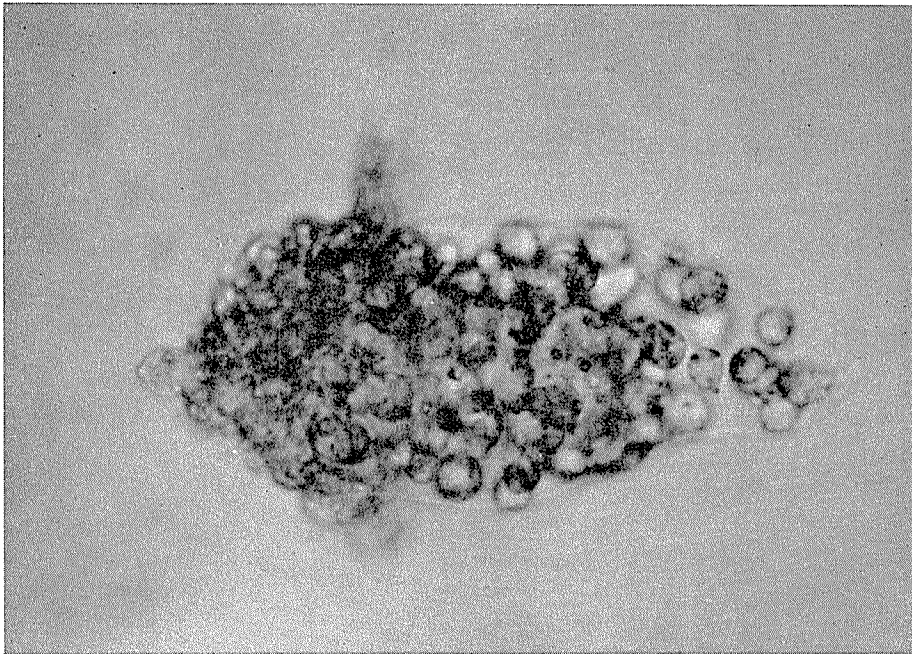


Fig. 3 Delayed-implantation rat blastocyst treated with indomethacin on 7 day of pregnancy. The embryo had a full of adhesive and fragile article. $\times 400$.

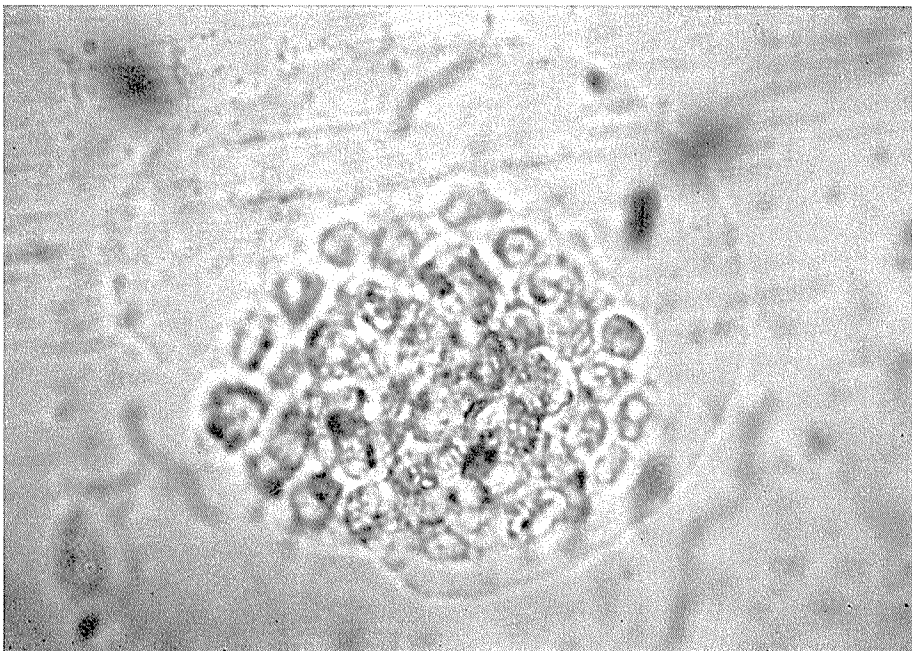


Fig. 4. Delayed-implantation rat blastocyst treated with indomethacin on 8 day of pregnancy. The blastocyst was developing for the shedding. $\times 400$.

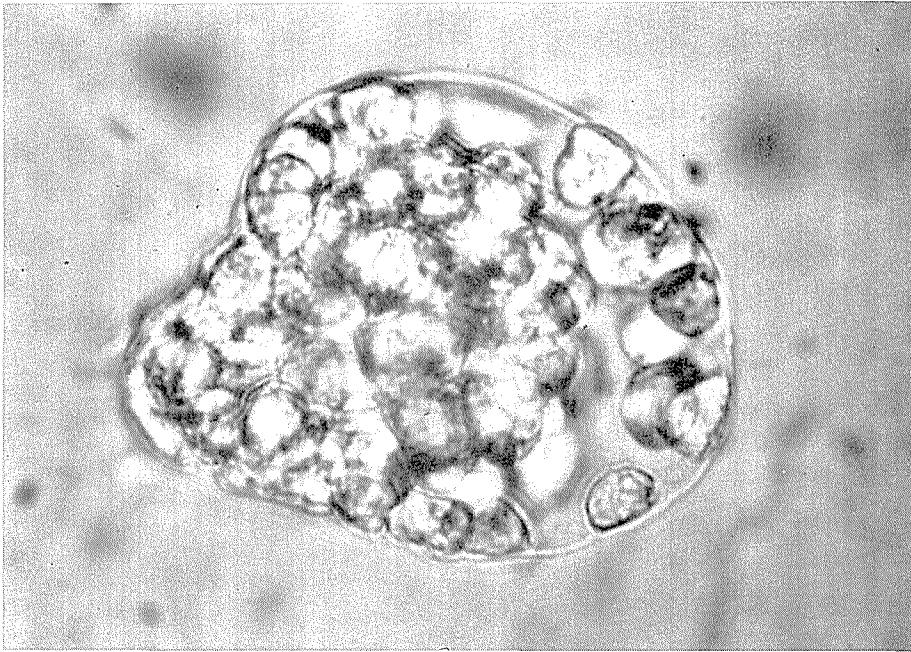


Fig. 5 Delayed-implantation rat blastocyst treated with indomethacin on 8 day of pregnancy. Cells of the blastocyst existed separately. $\times 400$.

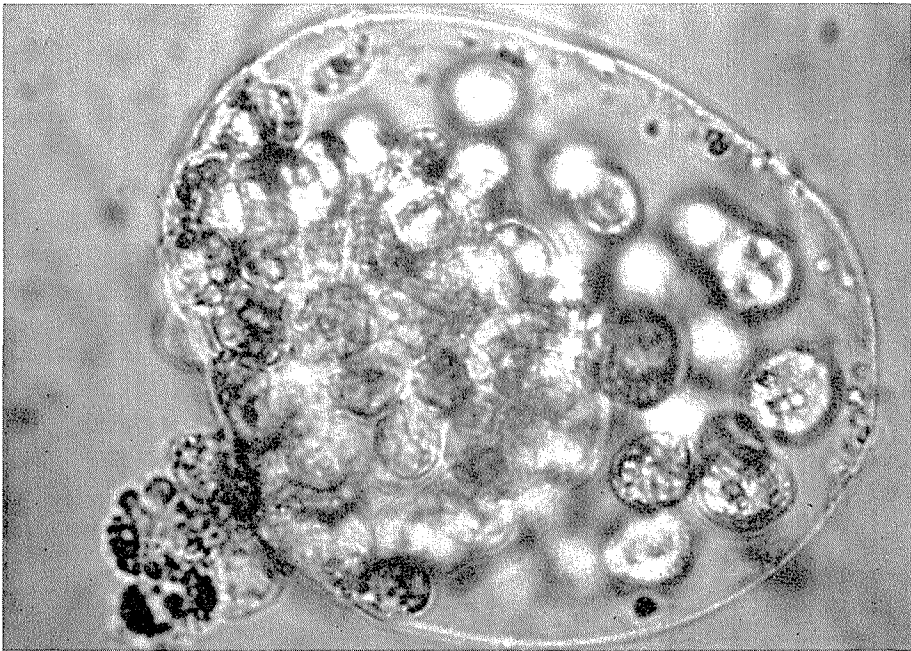


Fig. 6 Delayed-implantation rat blastocyst treated with indomethacin on 8 day of pregnancy. The blastocyst in process of hatching. $\times 400$.

図3は実験4で得られた妊娠7日目の卵子で、栄養膜細胞がバラバラの状態で存在した。

図4, 5, 6は実験4で得られた妊娠8日目の卵子で図3と同様栄養膜細胞がバラバラに存在し、図1および2とは異なった形で、非常に粘着性に豊み、こわれやすい卵子であった。図4は、透明帯剥離の前段階によくみられる卵細胞が片寄っている図ともみられる。図5および6は、透明帯剥離の段階のハッチングとも見られた。

実験5 結果を表5に示した。インドメサチン投与のものにエストロン4 μ g投与すると、

Table 5 Effect of estrone on the implantation sites of indomethacin treated rats.

Treatment	No. of rats	No. of dye reaction sites	No. of implantation sites	No. of corpus luteum	No. of recovery blastocysts	Uterine wt. (mg)
Indomethacin	5	12.5 \pm 0.6	3.4 \pm 1.6	12.7 \pm 1.0	2.2 \pm 1.1	203.0 \pm 35.2
Indomethacin + Estrone ^a	6	10.5 \pm 0.4	10.6 \pm 1.6*	13.0 \pm 0.8	0	281.6 \pm 49.2*

*P<0.05

(Mean \pm S. D.)

^a4 μ g given s.c. in oil at 9:00 h on Day 7.

子宮の着床部位は肉眼的にもあきらかとなった。子宮重量も有意に重かった。着床数は10.6と黄体数よりやや少なかった。

実験6 結果を表6に示した。妊娠期間はインドメサチン投与の方がわずかであるが対照

Table 6. Effect of indomethacin on day 5 of pregnancy on variables measured at parturition.

Treatment	No. of rats	Duration of pregnancy (days)	Litter size	Birth weight (g)
Sesame oil	8	22.4 \pm 0.2	13.0 \pm 1.1	6.21 \pm 0.44
Indomethacin ^a	8	23.4 \pm 0.3*	10.2 \pm 2.8*	5.17 \pm 0.87*

^a 2 mg/Kg given sc in oil at 9:00 h on Day 5.

* P<0.05, compared with control.

より有意に長かった。またインドメサチン投与群は、対照に比べて産仔数ならびに胎児重量が有意に少なかった。

考 察

Kennedy²⁾ および Phillips and Poyser は⁵⁾, インドメサチンを妊娠ラットに投与すると、正常妊娠と比べて着床部位の出現が遅いこと、また着床部位の重さが軽いこと、妊娠期間がわずかに長くなることから着床遅延が誘起されたと報告しているが、一方、インドメサチン投与日の妊娠6日目の朝方すでに着床部位が出現することを報告している²⁾。したがって、妊

娠7日前後子宮浮遊の着床遅延卵子が存在するかどうか疑問であった。本実験の結果、少数ではあるが、子宮浮遊の着床遅延卵子を観察した。

Kennedy²⁾ および Phillips and Poyser⁵⁾ は、インドメサチンを2回もしくは4回分注投与したが、2 mg 単一投与でも同等の効果を有した。しかし、本実験においてインドメサチン4 mg 以上になると死亡率が高まることから、2回位の分注の方が望ましいかもしれない。

妊娠ラットにインドメサチンを投与すると妊娠6日頃から一部着床、一部子宮内浮遊といった状態の着床遅延で、同一子宮内全部が子宮内浮遊卵子を有する着床遅延でなかった。仮りに(黄体数) - (P.B反応数) = (子宮浮遊卵子数) とみなしてもかなり低いと考えられる。また本実験の採卵数、Kennedy²⁾, Phillips and Poyser⁵⁾ および本実験の妊娠期間の長さからみてもインドメサチン投与による着床遅延は、妊娠6日目の着床時期が約1~2日遅れる程度であった。

インドメサチン投与によって妊娠7, 8日目に採卵できた卵子は、他の方法で誘起した着床遅延卵子と形態を異にしていた⁶⁾。また、同一子宮内で一方は着床、他方透明帯剝離の状態と卵子の発育段階が相当幅があると考えられる。実験5でエストロン投与した場合の着床数が黄体数より2~3低いこと、分娩時の胎児数も正常妊娠より3匹程低いことから、妊娠7, 8日で採卵できた2~3個の卵子は、正常な胎児として成長しうるについては疑問である。

インドメサチン投与によって産れた仔の重量は、正常分娩と比べて小さく、離乳時も非常に小さかった。門間ら^{9,10)} は、妊娠末期のラットにインドメサチンを投与すると、4時間後には経胎盤性動脈管収縮が認められ、動脈管閉鎖が続くと胎仔死亡率が高まること、胎生期動脈管閉鎖が起ると、出産後に新生仔の肺高血圧持続症となって現われると報告している。これらのことから妊娠ラットにインドメサチンを投与すると正常な仔は産れないと思われる。

本実験でP・B反応による着床部位の判定の際、着床部位が子宮角全体に均等に出現しなかった。一部子宮頸管の近くに着床部位がかたまっているのがみられた。Phillips and Poyser⁵⁾ も同様な現象を報告している。これはインドメサチンによって、着床時の卵子が子宮内で行う間隔どり(Spacing)が阻害されたためであろうといわれている^{2,3,5)}。

インドメサチン投与によるプロジェステロンへの影響について、Kennedy²⁾ は低下を認めなかったと報告、一方 Phillips and Poyser⁵⁾ は低下したと報告している。さらにプロジェステロンの低下はインドメサチンの投与量によること。またインドメサチンの卵巣への直接作用もしくは、黄体刺激ホルモン抑制によるものと推察している⁵⁾。実験6において、エストロゲン投与するとほぼ正常な着床が観察された。また、これと同様にプロジェステロン4 mg投与した場合もほぼ正常な着床が観察された。これらからインドメサチンによる着床遅延誘起は、単に子宮内膜の血管の透過性を高めるのを阻止する以外に卵巣機能への直接的作用も考えられた。

摘 要

妊娠ラットにインドメサチンを投与すると着床遅延が誘起されると報告されている。しかし、着床遅延卵子の存在について疑問を持った。そこで Phillips and Poyser の方法ならびに単一投与による方法で妊娠 7 日目の子宮浮遊卵子について観察を行なった。Phillips and Poyser の方法ならびにインドメサチン 2 または 3 mg, 単一投与の妊娠 7, 8 日目, 子宮内ですでに着床が始まっていたが, 2~3 個の子宮浮遊の着床遅延卵子を得た。また得られた卵子は異常な形態をしていた。

引 用 文 献

- 1) Psychoyos, A., Handbook of Physiology. Vol. II. p. 187-215. Greep, R.O. ed., American Physiological Society, Washington, 1973.
- 2) Kennedy, T.G., Biol. Reprod., 16 : 286-291. 1977.
- 3) Vane, J.R., Nature, 231 : 232-235. 1971
- 4) Kennedy, T.G., Biol. Reprod., 20 : 560-566. 1979.
- 5) Phillips, C.A. and N.L. Poyser, J. Reprod. Fert., 62 : 73-81. 1981.
- 6) Holmes, P.V. and B.J. Gordashko, Embryol. exp. Morph., 55 : 109-122. 1980.
- 7) Tsujii, H., S. Sugawara and S. Takeuchi, Jap. J. Zootech. Sci., 43 : 91-96. 1972.
- 8) Takeuchi, S., S. Sugawara and J. Takahashi, Tohoku J. Agr. Res., 19 : 39-49. 1968.
- 9) 門間和夫・西原重剛・太田八千雄・上村 茂, 小児科臨床, 33 : 1877-1883. 1980.
- 10) Momma, K. and H. Takeuchi, Prostaglandins, 26 : 631-643. 1983.

Studies on the Delayed Implantation of Blastocysts in the Rat Treated with Indomethacin.

By Hirotada TSUJII

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Fac. Agric., Shinshu Univ.

Summary

Indomethacin was an inhibitor of prostaglandin synthesis. Kennedy (1977), Phillips and Poyser (1981) reported that the indomethacin administration in rats during early pregnancy caused a delay in implantation. However, they did not flush the uterine horns and the study group were implanted on the 6th day of pregnancy according to uterine dye sites. The purpose of this study is to determine whether or not embryos recover from delayed implantation when treated with indomethacin.

Wistar rats were housed under temperature- and light-controlled conditions (lights on 06:00–18:00 hr) with free access to food and water. All rats used had demonstrated regular 4-day cycles. The Pontamine Sky Blue dye was injected into the which vein under anaesthesia. The rats were sacrificed 15 min. later and examined for 'dye reaction' sites. The uterine horns were flushed with K. R. P. The uterine 'dye reaction' sites were indicative of the implantation sites. Exp 1, the rats were injected s.c. with indomethacin 3 mg/kg at 9:00 h and 17:00 h on day 3 and 4 of pregnancy as described by Phillips and Poyser. Exp 2–6, the rats were injected s.c. with indomethacin 2 mg at 9:00 h on day 5 of pregnancy.

According to the results, the rats demonstrated implantation in the uterine horn on the 6 day of pregnancy with uterine dye sites. A few delayed implanted blastocysts were recovered from uterine horns (Table 1–4). The recovered embryos were abnormal in form (Fig. 3–6) compared with the ovariectomized, progesterone-treated rat (Fig. 1). The length of pregnancy was slightly but significantly longer in the single dose indomethacin treated rats (Table 6). Indomethacin administration produced a significant effect on the proportion of rats with uterine dye sites, litter size and birth weight (Table 4 and 6). Therefore indomethacin effect may be mediated by inhibition of ovarian steroidogenesis and increase in the permeability of endometrial capillaries at the blastocyst implantation sites.