Studies on Implantation Traces in Rats

I. Size, Observation Period and Staining

Takashi YAMADA, Mariko HARA, Yuka OHBA,
Tadahiro INOUE and Hiroshi OHNO

*Research Center of Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.,
1-403 Yoshino-cho, Ohmiya-shi, Saitama 330, Japan.*

(Received 14 October 1983/Accepted 16 October 1984)

The implantation traces of early embryonal death and abortion in rats induced by some drugs were studied. Early embryonal death and abortion were caused by intraperitoneal injection of 15 mg/kg of busulfan on the 7th day of gestation or 40 mg/kg of 6-mercaptopurine on the 7th and 8th day of gestation. The observation period and staining of the implantation traces were investigated. 1. Early dead embryos and placentas were delivered between the 20th and 24th day of gestation. These were eaten by the dams. 2. The implantation traces of abortion or early embryonal death, and those of normal delivery were able to be identified up to the 120th day and 500th day after extraction, respectively. The implantation traces of abortion were smaller in the three experimental groups. 3. All kinds of implantation traces were stained distinctly with 10% ammonium sulfide, 0.2% sodium hydroxide and 2% potassium ferrocyanide. In this staining method, sodium hydroxide has an excellent effect on the staining of implantation traces. 4. Specimens washed in water after being stained with sodium hydroxide and fixed in formalin can be preserved without discoloration for a long period of time.

ラットの着床痕に関する研究

I. 大きさ, 観察可能日数及び染色法について

山田 隆・原 真理子・大場 由香
井上 忠広・大野 博

大正製薬株式会社総合研究所

着床痕 Implantation trace の観察は着床率 Implantation rate 及び分娩率 Delivery rate を算出する上に重要であるが, その観察法, 特徴などについて詳述した報告はみられない。著者らはラットの着床痕について

研究しているが, 今回, 薬剤により誘起した妊娠初期処置の死胚, 流産及び無処置正常分娩の着床痕について, その大きさ, 観察可能日数, 染色, 保存などに関し検討を行ったところ若干の知見が得られたので報告する。

材料及び方法

1. 動物及び飼育条件：動物はSLC：Wistar系ラットを用い、飼育は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の空調動物室で、固型飼料（オリエンタル酵母：MF）と滅菌水道水を自由に与える条件で行った。

2. 薬物処置：ラット（12週齢）の妊娠7～9日目（交尾成立日を妊娠0日とした）に、1, 4-butanediol dimethanesulfonate (Busulfan, Myleran, 東京化成)の $15 \sim 20\text{mg/kg}$ [1]を、または6-Mercaptopurine (6-MP, 半井化学)の $40 \sim 60\text{mg/kg}$ [15]をそれぞれ単一腹腔内注射した。Busulfanは5%アラビアゴム、6-MPは0.8% Carboxymethylcelluloseの水溶液に懸濁し、いずれも 100g 体重当たり 0.2ml 容量を注射した。

3. 観察：動物は無処置、妊娠初期処置の死胚及び流産の3群（1群 $40 \sim 60$ 匹）に分け、いずれも妊娠20日目、分娩後（あるいは推定妊娠満期後、妊娠22日目）7, 21, 35, 49, 120, 350及び500日目に頸椎脱臼により屠殺し（各stage 3～10匹）、子宮を摘出した。摘出した子宮は生理食塩液で洗い、肉眼的に着床痕を観察した後、固定液あるいは染色液に浸漬した。死胚及び流産の痕跡については分娩後120日目までの観察とした。着床痕については更に実体顕微鏡（日本光学, SMZ-10）に取付けた測微計測装置（コーガク社）により無固定無染色でその面積を測定した。

4. 染色及び保存：摘出子宮は生理食塩液で洗った後、10%中性ホルマリンあるいは95%エタノール液に3週間固定した。

染色は無固定のものについては10%硫化アンモニウム（10分）、0.2%水酸化ナトリウム（10分）、Benzidine（エタノール飽和溶液 100ml に氷酢酸 0.5ml を加えた液と3%過酸化水素の等量混合液、3分）、Tirmann-Schmelzer（ターンブル青、10%硫化アンモニウムで染色後1%塩酸と20%フェロシアン化カリウムの等量混合液、10分）及びElastica van Gieson（0.1%レゾルシン・フクシン液、ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液及びワン・ギーソン液、各10分）に浸漬し、行った。またホルマリン固定のものについては、10%硫化アンモニウム（10分）、0.2%水酸化ナトリウム（10分）、Gomori（ペルリン青、20%塩酸と10%フェロシアン化カリウムの等量混合液、1～2分）及びPerls（ペルリン青、2%塩酸と2%フェロシアン化カリウムの等量混合液、1～2分）、エタノール固定のものは10%硫化アンモニウム及

び0.2%水酸化ナトリウムの各液に浸漬した。固定せずに硫化アンモニウムあるいは水酸化ナトリウムで染色したものについて、更に、硫化アンモニウムで染色したものは水酸化ナトリウムに、水酸化ナトリウムで染色したものは硫化アンモニウムに各10分間浸漬し、二重染色を施した。

染色した標本は水洗後ホルマリンに入れ、約1年間保存した。

成績

1. 死胚及び流産の誘起：Busulfanの15あるいは 20mg/kg 、6-MPの40あるいは 60mg/kg を妊娠7～9日目のいずれかの日に腹腔内注射したところ、Busulfanは 20mg/kg でいずれの投与日においても母獣を死亡（50～100%）させたが、 15mg/kg では母獣を死亡させず、このうち7日目処置において100%死胚を誘起することができた。6-MPは、 40mg/kg では7及び8日目の2回処置、 60mg/kg では7あるいは8日目処置において、処置後1～11日以内に胚及び胎盤の娩出を誘起することができた（Fig. 1）。これらの成績はほぼ文献[1, 15]と一致していた。これより、妊娠初期処置の死胚誘起にはBusulfanの 15mg/kg を妊娠7日目に、また流産（妊娠19日以内に全胚ならびに胎盤が娩出されたものと定めた）の誘起には6-MPの 40mg/kg を妊娠7・8両日に単一腹腔内注射する条件を定めた。

無処置ラットは妊娠21～23日の満期で分娩した。一方、妊娠初期処置の死胚は20～24日目に娩出され[5, 6]、その娩出物は全て喰された。

Fig. 1. Rat uterus on 20th day of gestation with early death embryo (left) or abortive implantation traces (right).

Method ¹⁾	Staining solution	Color		Degree of the color in implantation trace on 21 days after delivery
		Uterus	Implantation trace	
Ammonium sulfide	10% Ammonium sulfide	Light yellow	Black	卅
Sodium hydroxide	0.2% Sodium hydroxide	Light yellow	Reddish brown	卅
Benzidine	Saturated benzidine in alcohol 3% Hydrogen peroxide	Orange-red	Reddish black	±
Tirmann-Schmelzer	10% Ammonium sulfide 20% Potassium ferrocyanide	Yellow	Yellowish green	+
Gomori ²⁾	10% Potassium ferrocyanide	Blue	Dark blue	卄
Perls ²⁾	2% Potassium ferrocyanide	White	Blue	卅
Elastica van Gieson	0.1% Resorcin-fuchsin Weigert-ironhematoxylin Van Gieson	Violet	Dark violet	±

1) Unfixed exceptin Gomori and Perls methods 2) Stained after fixation with 10% formalin

Observation : 卅 : severely stained 卄 : moderately stained + : slightly stained ± : very slightly stained

Table 1. Staining reactions in the uterus

2. 染色及び保存：Table 1に無処置の分娩後21日目の摘出子宮の染色成績を示した。染色した標本はその色調により、非常に鮮明 **severely stained**, 鮮明 **moderately stained**, やや鮮明 **slightly stained**, 不鮮明 **very slightly stained** の4段階に分け評価した。その結果、硫化アンモニウム法では子宮は淡黄色、着床痕は暗黒色、水酸化ナトリウム法では子宮は淡黄色、着床痕は赤褐色、ベンチジン法では子宮は赤橙色、着床痕はレンガ色、ティルマン・シュメルツァ法（ターンブル青）では子宮は黄色、着床痕は黄緑色、ゴモリ法（ベルリン青）では子宮は青色、着床痕は濃青色、パールス法（ベルリン青）では子宮は青白色、着床痕は青色、エラスチカ・ワンギーソン法では子宮は紫色、着床痕は濃紫色に染色されたが、着床痕色は子宮に対するコントラストから、10%硫化アンモニウム、0.2%水酸化ナトリウム、パールスの2%フェロシアン化カリウムが鮮明であった（Fig. 2, 3）。硫化アンモニウムと水酸化ナトリウムの重染色では、硫化アンモニウムで染色した後水酸化ナトリウムで染色する方がよく、その逆の手順では効果は認められなかった。アルコールあるいはホルマリンに3週間浸漬した後の染色では、硫化アンモニウム及び水酸化ナトリウムともホルマリンに浸漬したものの方がよく染色された。無処置正常分娩の痕跡と人為的に誘起した流産ある

Fig. 2. Implantation traces stained with 10% ammonium sulfide (left) or 0.2% sodium hydroxide (right) on 21st day after delivery.

いは死胚の痕跡との間では、染色結果に差はみられなかった。

染色した標本（重染色を除く）を水洗後、ホルマリン液を満した透明ガラス瓶に入れ密閉し、約1年間保存したところ、ほとんどの標本は脱色され着床痕が見えにくくなっていったが、硫化アンモニウム及び水酸化ナトリウム染色のものは、染色段階での固定の有無に関係な

く明瞭で、特に水酸化ナトリウムは鮮明に染色が保たれていた。

3. 観察可能日数：分娩後の着床痕についてその観察限界の追跡成績を Table 2 に示した。摘出子宮を生食に1分間あるいはホルマリンに3週間入れた後観察した結果、無処置正常分娩の着床痕は500日においても (Fig. 4), また、妊娠初期処置の死胚及び流産の着床痕は120

日においても肉眼的に観察が可能であった。無処置正常分娩及び死胚の着床痕はホルマリンに固定したものの方が観察しやすく、0.2% 水酸化ナトリウムに染色すれば更に判別が容易になった。

4. 面積：Fig. 5 に無固定無染色で測定した着床痕の面積を示した。無処置正常分娩、妊娠初期処置の死胚及び流産の各着床痕は、分娩後7日目では約 3 mm² で各群

Fig. 3. Implantation traces stained with 10% ammonium sulfide-20% potassium ferrocyanide (left), 2% potassium ferrocyanide (middle), 10 % potassium ferrocyanide (right) on 21st day after delivery.

Fig. 4. Implantation traces stained with 10% ammonium sulfide (left) or 0.2% sodium hydroxide (right) on 350th or 500th day after delivery.

	Immersion	Stain	Days after delivery							
			7	21	35	49	120	350	500	
Normal	Saline	Not stained	+	+	+	+	+	+	+	
		Stained	+	+++	+++	+++	+++	+	+	
	Formalin	Not stained	+	+	+	+	+	+	+	
		Stained	+	+++	+++	+++	+++	+	+	
Early death	Saline	Not stained	+	+	+	+	+			
		Stained	+	+++	+++	+++	+++			
	Formalin	Not stained	+	+	+	+	+			
		Stained	+	+++	+++	+++	+++			
Abortion	Saline	Not stained	+	+	+	+	+			
		Stained	+	+++	+++	+++	+++			
	Formalin	Not stained	+	+	+	+	+			
		Stained	+	+	+	+	+			

Saline : removed uterus immersed in 0.9% saline for a minute Stain : 0.2% sodium hydroxide
Formalin : removed uterus immersed in 10% formalin for 3 weeks
+ : detected slightly + : detected moderately + : detected clearly

Table 2. Detection of implantation traces

Fig. 5. Size of implantation traces.

間に差は認められなかったが、その後漸次小さくなり、分娩後21日目には約 1 mm^2 程度になった。分娩後21日目以降63日目まで各群ともほとんど面積に変化はみられなかったが、流産跡は縮小が急激に進み、無処置のものに比べ有意に小さかった [分娩後21日目：正常、 1.36 ± 0.27 (28), 死胚、 1.34 ± 0.28 (29), 流産、 1.11 ± 0.27 (28), 平均 $\text{mm}^2 \pm \text{S.D.}$ (着床痕数)]。無処置の着床痕は500日目においても計測可能であった。

考 察

著者らはラットの着床痕の観察法ならびにその特徴について研究しているが、今回、妊娠初期に薬物処置し誘起した死胚及び流産の着床痕ならびに無処置正常分娩の着床痕について検討した。

ラットの妊娠初期処置の死胚及び流産を誘起する薬剤についてはいくつかのものが知られているが[2, 3, 4, 10, 14, 16], 著者らは古くから胎仔毒性の研究に用いられている Busulfan [7, 8, 12] 及び 6-MP [1, 15] について文献値に従い検討した。その結果, Busulfan では 15 mg/kg/i.p. (7日目), 6-MP では 40 mg/kg/i.p. (7・8日目) が最適であることを見出した。

着床痕の観察可能日数は、無処置正常分娩のもので500日目においても、妊娠初期処置の死胚及び流産のものでは120日目においても無染色で肉眼的に識別が可能であった。Kopf ら[9]はラットの着床痕は分娩後10週目においても観察できると報告しているが、著者らの成績では更にその7倍の日数において観察可能であり、今回の実験においては着床痕の消失日は確認できなかった。しかしながら、流産における着床痕の面積は、正常分娩や死胚の着床痕に対し分娩後21日以上経過した場合有意に小さく、これは着床痕自身が7日目に見られるように

小さい傾向があるばかりでなく、子宮自体の修復も早めには起るものと推察された[5, 6]。これらから判断すれば、着床痕は子宮の修復とともに経時的に小さくなり、着床痕の大小から、正常、死胚、流産の区別もある程度可能であると考えられた。

着床痕の染色は Fe 結合に基づくものであればほとんどの方法でよいが、子宮内に対するコントラストからは硫化アンモニウム、水酸化ナトリウム及びフェロシアン化カリウムの溶液が優れていると考えられた。硫化アンモニウム、水酸化ナトリウム及びフェロシアン化カリウムは着床痕に存在する鉄と反応し、硫化鉄 FeS , 水酸化第2鉄 $\text{Fe}(\text{OH})_2$ 及びフェロシアン化鉄 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3\text{Fe}_4$ をつくり、これが暗黒色、赤褐色、青色(ベルリン青)に見えるためと考えられる。硫化アンモニウム—フェロシアン化カリウムはティルマン・シュメルツァ法(ターンプル青染色)として組織標本染色に古くから用いられている方法であるが、これを Kopf ら[9], Salewski [13]が着床痕の染色に応用していたところから、今日唯一の着床痕の染色法として汎用されている。しかし、著者らの検討では臭気、染色力などの点から必ずしも満足のいくものではなかったため、この方法以外の染色法についての開発の必要性を感じた。

硫化アンモニウム—フェロシアン化カリウム法は組織中に含まれる3価の鉄イオン(2価のイオンとして存在することは極めて少ない)を硫化アンモニウムで2価の鉄イオンに還元し硫化鉄 FeS をつくった後、2価の鉄と反応するフェロシアン化カリウムでターンプル青に発色させるものである。通常組織切片染色では硫化鉄が酸性で溶解し、フェロシアン化カリウムと反応するところから、20%のフェロシアン化カリウムに1%の塩酸を加え等容にした液が使用されている。しかし、摘出子宮をこの組織切片染色用の液に入れてもさほど着床痕は染色されないが、これに1%の塩酸を更に添加していくと濃青色に変化する。Salewski は原著でターンプル青染色と明記しながら、フェロシアン化カリウム(3価の鉄イオンと反応し、ベルリン青となる)の使用をあげており、しかも示摘塩酸濃度については触れていない。着床痕の染色には必ず Salewski 法が引用されているが、この方法を用いた研究者の多くは青染されない硫化アンモニウムのつくる黒色の硫化鉄のみを観察していることになる。

組織切片染色では切片を硫化アンモニウムで処置した後でもフェロシアン化カリウムと結合し、ベルリン青反応を呈することがあるといわれており[11], 硫化アンモ

ニウムは必ずしも組織中の鉄結合反応に十分ではない。著者らは着床痕を硫化アンモニウムと水酸化ナトリウムに反応（重染色）させると、その存在がより鮮明になることを見出した。これは硫化アンモニウムと結合しなかった鉄あるいは硫化鉄が水酸化ナトリウムと結合し、水酸化第1鉄 $\text{Fe}(\text{OH})_2$ （緑青色）をつくり、これが空気酸化され水酸化第2鉄 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ （赤褐色）になるためであると考えられる。重染色法は特に着床痕の観察において不可欠なものではないが、鮮明さ、観察の容易さの点において役立つものである。

着床痕の観察を目的とした子宮はホルマリンに固定しておくとき水酸化ナトリウムで染色しやすく、また、水酸化ナトリウム染色を施した子宮は水洗後再びホルマリンに固定しておくとき着床痕は退色せずに長期間保存できる。

以上より、着床痕の観察には水酸化ナトリウム染色が有効であることなどいくつかの知見が得られたが、今後は更に組織学的な検討を進めていきたい。

要 約

ラットの妊娠7日目に Busulfan 15mg/kg を、また妊娠7・8日目に 6-Mercaptopurine 40mg/kg をそれぞれ単一腹腔内注射して、死胚及び流産を誘起し、その着床痕を観察した。1. 死胚は妊娠20～24日の間に娩出され、喰された。2. 流産及び死胚の着床痕は予定妊娠満期後120日以上、無処置正常分娩のものは500日以上肉眼的に識別できたが、痕跡の中では流産痕が最も小さかった。3. 着床痕は7種の染色法のうち10%硫化アンモニウム、0.2%水酸化ナトリウム及び2%フェロシアン化カリウムによく染色され、水酸化ナトリウムが最も優れていた。4. 水酸化ナトリウムによる染色標本は水洗後ホルマリンに固定しておくとき長期間保存できたが、他の染色標本では退色した。

本研究を進めるに当たり、多くの助言を賜った日本獣医畜産大学教授田中亮一博士並びに同助教授高橋和明博士に深謝する。本稿の概要は第18回日本実験動物学会において報告した。

文 献

- [1] Alexandorov, V. A. (1966). Analysis of the lethal effect of "Myleran" on rat embryos. *Nature.*, **209**, 1215-1216.
- [2] Bovet-Nitti, F., and Bovet, D. (1959). Action of some sympatholytic agents on pregnancy in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **100**, 555-557.
- [3] Chambon, Y. (1957). Action de la chlorpromazine sur le couple hypophyso-ovarien de la rate gestante. *Ann. D'endocrinol.*, **18**, 80-92.
- [4] 浜田佑二・難波武文・岡田忠夫・伊崎勝弘. (1970). 向精神薬に関する研究（第9報）APY-606の奇型学的安全性試験, 応用薬理, **4**, 497-504.
- [5] 林正利 (1969). 妊娠ラットの胎児摘出後の胎盤の運命および娩出後の発情回帰について. 日本獣医畜産大学紀要, **18**, 79-83.
- [6] 林正利 (1970). 妊娠ラットの胎児除去後の胎盤とガラス玉の排出について. 家畜繁殖研究会誌, **16**, 33-35.
- [7] 亀山義郎 (1966). 妊娠ラットへの myleran 投与による胎仔の骨格系奇形. 先天異常, **6**, 118-129.
- [8] 勝矢珉雄・吉田仁子・須藤博子・樋浦明夫・永井広 (1980). Myleran のラット胎仔骨格形成におよぼす影響. 東北歯大誌, **7**, 6-8.
- [9] Kopf, R., Lorenz, D., und Salewski, E. (1964). Der Einfluss von Thalidomid auf die Fertilität von Ratten im Generationsversuch über zwei Generationen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., **247**, 121-135.
- [10] Murphy, M. L. (1965). Factors influencing teratogenic response to drugs. In Teratology—Principles and techniques, pp. 145-184, Wilson, J. G., and Warkany, J. (edit.), University of Chicago Press, Chicago.
- [11] 大塚長康 (1975). 金属とその他の無機物質. 新組織化学, pp. 655-680, 小川和郎, 武内忠男, 森富編集, 朝倉書店, 東京.
- [12] Pinto-Machado, J. (1970). Influence of prenatal administration of busulfan on the postnatal development of mice. Production of a syndrome including hypoplasia of the thymus. *Teratology*, **3**, 363-370.
- [13] Salewski, V. E. (1964). Farbemethode zum makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak.*, **247**, 367.
- [14] シャルダイン, J. L. (1979). 動物で催奇形性作用を試験する原則. 薬の催奇形性とその評価, pp. 10-37, 谷村孝訳, 講談社, 東京.
- [15] Thiersch, J. B. (1964). The effect of 6-mercaptopurine on the rat fetus and on reproduction of the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **60**, 220-227.
- [16] Tuchmann-Duplessis, H., Gershon, R., and Mercier-Parot, L. (1957). Troubles de la gestation chez la ratte, provoqués par la réserpine et essais d'hormonothérapie compensatrice. *J. Physiol.* **49**, 1007-1019.