

原

著

抗プロゲステロン剤, RU38486 の妊娠ラットに 対する流産誘発機序に関する研究

新潟大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 竹内正七教授)

西 村 満

Studies on the Antireproductive Mechanism of RU38486,
an Antiprogestosterone Agent, to Pregnant Rats

Mitsuru NISHIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata

University School of Medicine

(Director: Prof. Shoshichi TAKEUCHI)

Effects of antiprogestosterone (RU 38486) were studied in pregnant rats. This synthetic compound (5, 10mg/kg) induced complete abortion when it was administered (p.o.) on day 8, 9, 10, 11, 12, 13 postconception. The anti-implantation effects were decreased when administered on day 6, 7 especially in cases of 5mg/kg. As to the anti-implantation effects, complete block was seen in all cases when 10mg/kg was given to the rats. Serial macroscopical and histological studies were carried out and its antiprogesterational activity was demonstrated on the decidual capillary and cells prior to the changes of progesterone level. Changes of trophoblast were not remarkable, and no immunological effects were shown in decidual area.

These data suggest that anti-implantational and abortifacient action of RU38486 mainly consists in the uterine endometrial (decidual) level.

Key words: RU38486, anti-implantation, abortion, decidua

RU38486, 着床障害, 流産, 脱落膜

I 緒 言

最近開発された合成ステロイド RU 38486 [17 β -hydroxy-11 β -(4-dimethylaminophenyl)-17 α -(1-propynyl)estra-4, 9-dien-3-one; Roussel-Uclaf, Paris, France,

以下 RU] は, 抗 progesterone(P) 作用ならびに抗 glucocorticoid(G) 作用を有し, それは各 receptor(R) に対し低濃度で強く結合してこれらの P, G との結合を競合阻害するために生ずるものと考えられている. また, RU が抗 P あるいは抗 G のいずれに指向して作用する

Reprint requests to: Mitsuru NISHIMURA,
Department of Obstetrics and Gynecology,
Tachikawa Sogo Hospital, Nagaoka City,
940, JAPAN.

別刷請求先: 〒940 長岡市神田町 3-2-11
立川綜合病院産婦人科 西村 満

かは、その際の RU 濃度と標的臓器における PR, GR の分布率によって異なり、子宮では主として抗 P 作用のみが発現することになる。一方、androgen(A) 受容体に対しては親和性が弱い抗 A 作用も弱く、また estrogen および mineralocorticoid 受容体に対しては親和性を持たないとされている。この RU の有する強い抗 P 作用により、種々の哺乳類において流産誘発効果のあることが確認され、その有用性が報告されている¹⁾²⁾³⁾。

一方、妊娠維持機構における P の重要性については今さら言うに及ばないが、その詳細な点については明らかにされてはおらず、P の意義を探索する上でその拮抗剤は重要であり、RU はこれにふさわしい薬剤であると考えられる。そこで、妊娠ラットに対し RU を投与し、子宮、胎盤の肉眼的、組織学的変化ならびに血中 estradiol (E2)、P の変化を経時的に観察し、RU による流産誘発機序の解明を試み、妊娠維持機構における P の役割について若干の知見を得たので報告する。

II 実験材料および実験方法

1. 検 体

本実験に用いた RU (Roussel-Uclaf 社) は、水に溶けにくく有機溶媒に可溶で、分子量が 430 の黄緑色の粉末である。

経口投与するために 0.5% Sodium carboxymethyl-cellulose および 0.2% Tween80 に RU を加えて懸濁液とし、投与量が 10ml/kg となるよう RU 含有量を調整した。また、RU 未添加のものを対照用として使用した。

2. 使用動物

日本チャールス・リバー株式会社より購入した 8 週齢の Crj:CD (SD) 系ラットを予備飼育後、雄ラットは 15 週齢より交配用として、雌ラットは 12 週齢より実験に用いた。動物数は各群すべて 5 匹の妊娠ラットを使用した。

3. 交配方法

夕刻発情を呈する雌を雄の飼育しているケージに入れ (雄 2 : 雌 3)、翌朝腔垢中に精子の確認された雌を妊娠ラットとみなして分離し、この日を妊娠 1 日目 (D1) と定め実験に用いた。

4. 実験方法

1) 着床障害、流産誘発効果の観察

RU5, 10mg/kg 投与群および対照群の 3 群を設定し、着床期 (D6, 7) および妊娠初期ないし中期 (D8, 9, 10, 11, 12, 13) に各々 1 回経口投与し、48 時間後に屠殺し

て着床障害、流産誘発効果を観察した。肉眼的に着床痕が確認できない場合は Salewski 法⁴⁾によって多硫化アンモニウム液中に子宮を浸して着床痕の有無の確認を行った。

2) 経時的観察

RU10mg/kg 投与群および対照群の 2 群を設定し、妊娠初期 (D9) および中期 (D13) で各々 1 回経口投与し、0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 時間後に浅エーテル麻酔下に心臓穿刺し採血後屠殺。子宮を摘出して流産誘発状況を肉眼的に観察後、10%ホルマリン液にて固定。ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色後、光学顕微鏡にて特に D13 の着床周辺部を中心に微細形態を観察した。なお、0, 6, 12, 24, 36, 48 時間後に採血した血液は E2, P 測定用とし、ラジオイムノアッセイキット (第 1 ラジオアイソトープ社製) により測定した。

5. 追加実験

RU により誘発される流産に免疫的関与を認めるか否かを調べるため、以下の実験を行った。

RU 投与により流産の誘発されることが確認された 12 週齢の C3H/He マウスを用い、RU10mg/kg を D10 に 1 回経口投与し、0, 3, 6, 9, 12 時間後に屠殺して経時的観察を行った (N=5)。子宮は直ちに OCT compound (Miles Scientific) に包埋し液体窒素にて急速凍結し -80℃ に保存。この凍結組織より Cryostat にて厚さ 5μm の組織切片を作成し染色材料とした。Becton Dickinson 社より入手したマウスモノクローナル抗体 (Thy1, 2; Lyt1; Lyt2) を一次抗体として免疫酵素抗体法 (間接法) にて染色し、着床部位の T-cell 出現状況を観察した。

III 成 績

1. 着床障害、流産誘発効果 (図 1)

5mg/kg 投与群では、D6 で 5 例中 1 例 (20%) に流産を認めたが、D7 では流産は誘起されなかった (着床障害効果を認めなかった)。しかし、D8 から D13 まで各々 5 例すべてに流産が誘発され 100% の流産率であった。

10mg/kg 投与群では、D6 から D13 まですべてに流産が誘発され 100% の流産率であった。流産の起こる形態は all or none であり partial abortion の所見は認めなかった。

対照群では、すべての時期で流産は誘発されなかった。

2. 経時的観察

1) 肉眼所見

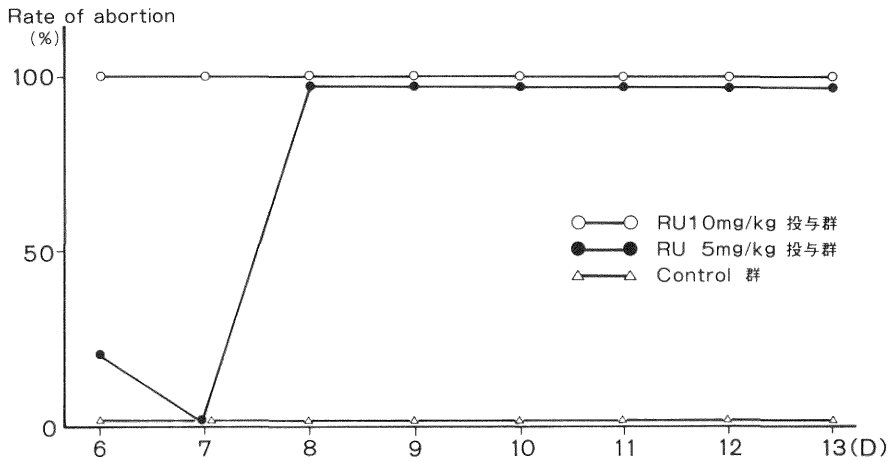


図1 RU 投与による着床阻害, 流産誘発効果 (N=5)

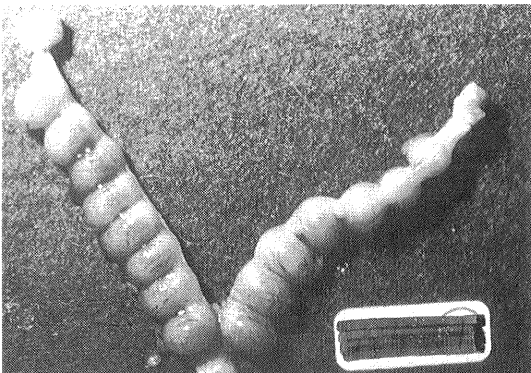


図2 D9 RU 投与48時間後の子宮
(上段は対照群)

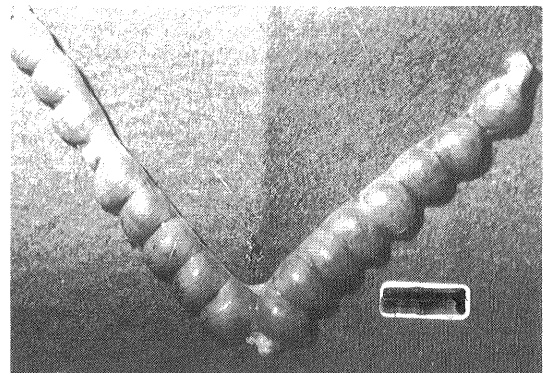


図3 D13 RU 投与48時間後の子宮
(上段は対照群)

D9, D13ともにRU投与後8ないし10時間で性器出血が出現し, 観察を行った48時間後まで持続した. D9では, 48時間後にはほぼ完全に子宮内容物の排出が起こっ

ていた(図2). 一方D13では, RU投与後9時間ではまだ明らかな変化を認めないが, その後徐々に着床部出血, 子宮収縮等の変化を認め, 48時間後には著明な子

宮収縮，子宮頸部の軟化，開大を認めるようになり，子宮内容物が排出されようとしている所見が得られた（図 3）。

2) 組織所見

D13 に RU10mg/kg 投与し，着床周辺部を光学顕微鏡にて経時的に観察すると，6 時間後では弱拡大では著明な変化を認めない．しかし，強拡大にすると脱落膜の血管内皮の破壊およびこれに隣接する脱落膜細胞の変性，融解がすでに出現している像が確認できる（図 4）。

時間の推移とともに脱落膜の変性が進行し，18時間後ではさらに labyrinthine zone や basal zone の細胞構築にも変化が認められる（図 5）．やがて胎盤は子宮壁より分離し，48時間後では著しい脱落膜の萎縮を認めるようになる．この変化に比し，labyrinthine zone, basal zone の変化は軽度である（図 6, 7, 8）。

3) 血中 E2, P の推移

D9 および D13 における RU 投与群と対照群の血中 E2, P の推移をそれぞれ図 9, 図10 に示した．D9 では，E2 は RU 投与後48時間まで対照群との間に有

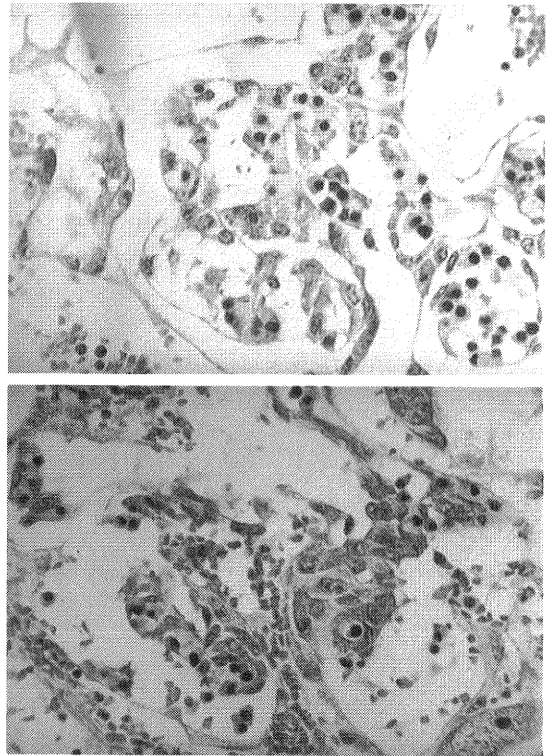


図 5 D 13 RU 投与18時間後の絨毛組織
（上段は対照群）（H.E. 染色，400倍）

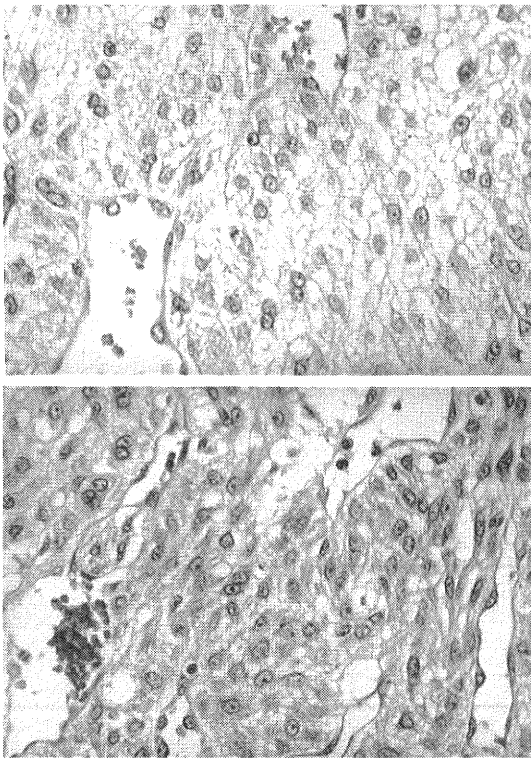


図 4 D 13 RU 投与 6 時間後の脱落膜
（上段は対照群）（H.E. 染色，400倍）

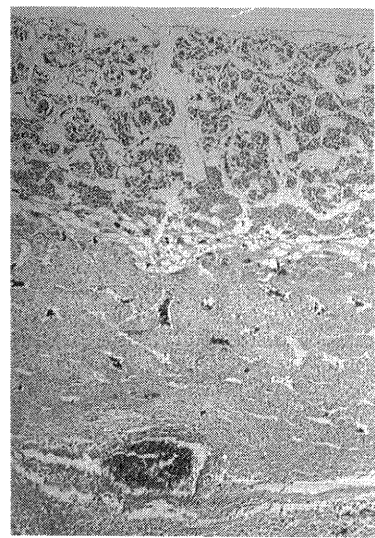


図 6 D 13 RU 投与直後の着床部
（H.E. 染色，40部）

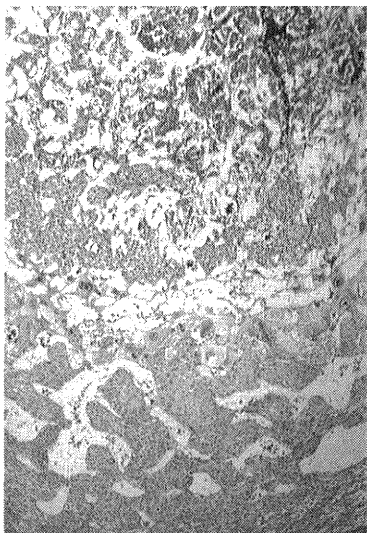


図7 D13RU 投与18時間後の着床部
(H.E. 染色, 40倍)

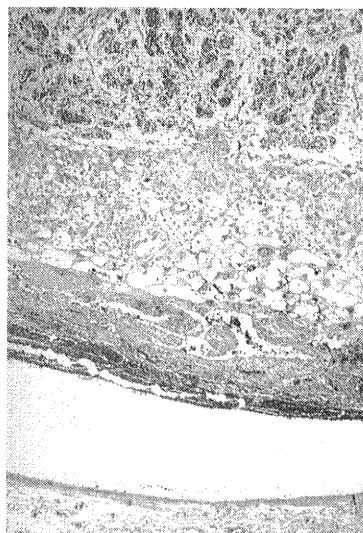


図8 D13RU 投与48時間後の着床部
(H.E. 染色, 40倍)

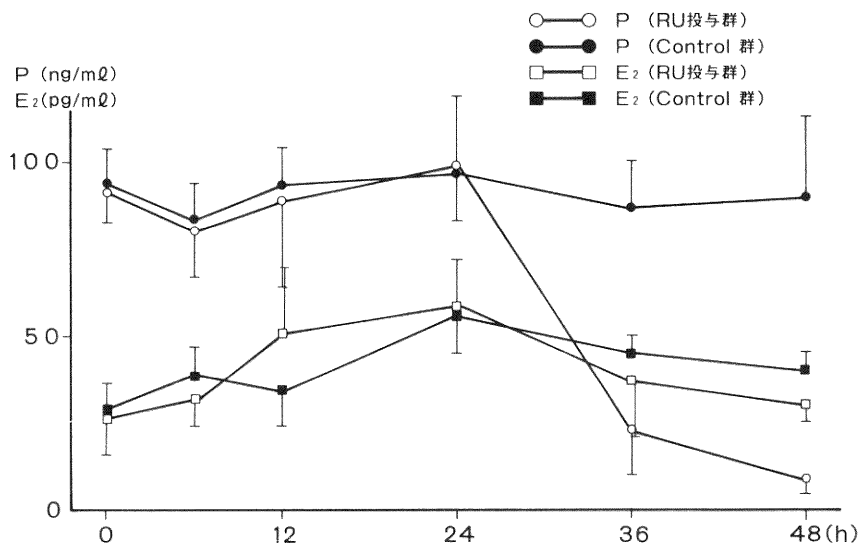


図9 D9における RU 10mg/kg 投与後の E2, P の推移
(N = 5)

意な差を認めなかったのに対し、PはRU投与後24時間以降以降を示し、対照群との間に有意差を認め、36時間ではRU: 22.8 ± 26.0 に対し対照: 87.2 ± 13.8 ng/ml, 48時間ではRU: 9.1 ± 5.5 に対し対照: 90.2 ± 23.5 ng/ml (mean \pm SD) という結果であった。D13では、E2, PともにRU投与後48時間まで対照群との間に有

意な差を認めなかった。

4) T-cell の出現状況

RU投与前後でT-cellの動態に有意な変化を認めなかった。図11には、RU投与前および投与12時間後のThy1, 2 (pan T-cellを認識する抗体) による染色状況を示した。

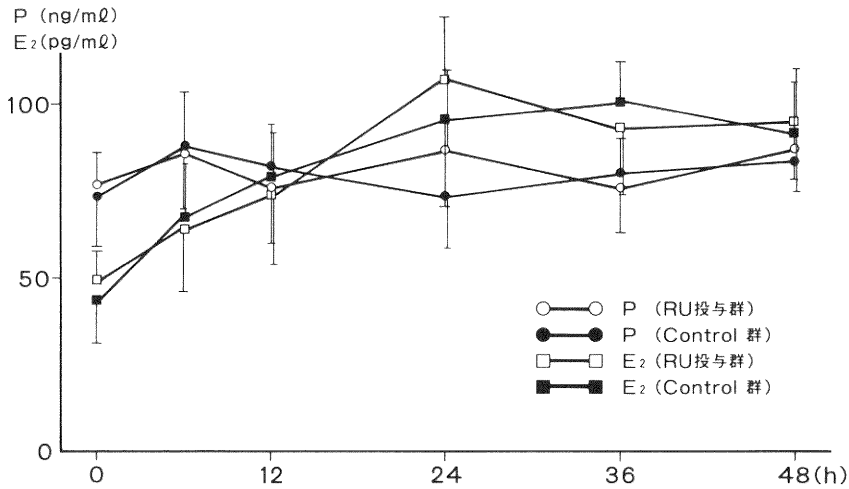


図10 D 13における RU 10mg/kg 投与後の E₂, P の推移
(N = 5)

IV 考 察

哺乳動物の妊娠成立およびその維持に対する作用がPのもつ最も顕著な生物学的効果の一つであることは今さら言うに及ばないが，Pの作用機構に関する研究の歴史はまだ日が浅く，分子レベルにおける作用機構など詳細はいまだ明らかではない⁵⁾．RU は，受容体レベルにおいて抗P作用を示す⁶⁾とされており，RU による流産形態を観察することによって妊娠の成立，維持におけるP関与の重要性や作用機序を明らかにできる可能性があると考え本研究を行った．

そこでまず，ラットの妊娠時におけるホルモン動態について整理してみたい．子宮頸部や腔への物理的な交尾刺激により反射性の luteinizing hormone (LH) あるいは prolactin (PRL) 分泌がおり，これらの luteotrophic 効果により初めて排卵性黄体が妊娠黄体となり，ついで胎盤より luteotrophic factor が分泌されるようになる．したがって，妊娠初期には中枢性因子，特に下垂体前葉からの LH, PRL 分泌が黄体からのP分泌にとって不可欠な要因となり，D10 前後より胎盤性の LH 様，PRL 様物質 (HCG 様物質) によって引き続き妊娠黄体が活性維持される．すなわち，妊娠中ラットの黄体維持機構は，妊娠中期において視床下部一下垂体系から胎盤支配へと移行する⁷⁾．一方，視床下部一下垂体前葉には PR が濃厚に分布しており，初期妊娠黄体からのステロイド分泌はこの中枢と卵巣との協調作用によって維持される．また，子宮内膜にも高濃度に PR が存

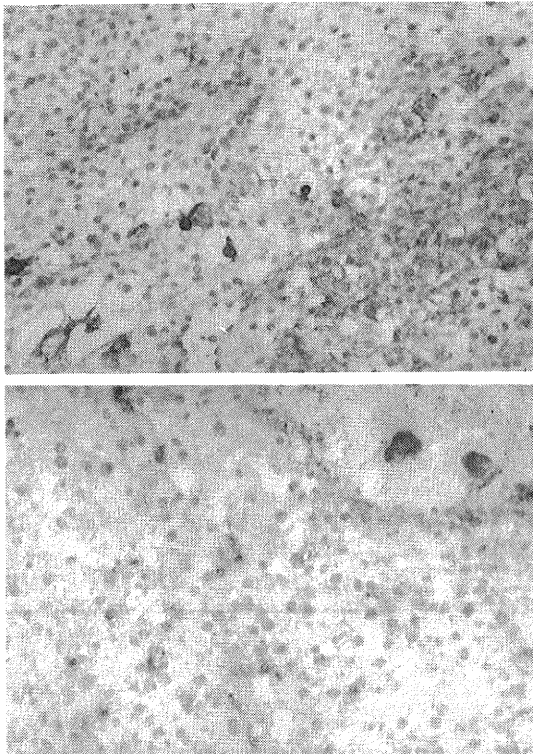


図11 (上段) RU 投与前 (下段) RU 投与12時間後の免疫酵素抗体染色

在している。

したがって、RU の着床期および妊娠初期、中期における作用部位として① 子宮内膜（脱落膜）② 視床下部一下垂体前葉系 ③ 卵巣（黄体）④ 受精卵や胎仔自身（直接作用）の4者を考える必要がある。今回の実験結果から考えると、投与後6時間ですでに脱落膜血管に破壊像が観察され、その後の脱落膜の変化が著明であったこと、血中Pは少なくとも投与後24時間まで大きな変動を認めなかったことから RU の主たる作用部位は脱落膜であることが示唆され、血中Pレベルの低下により流産が引き起こされたと結論することはできないとする Secchi ら⁸⁾の結果と近似するものであった。脱落膜の血管内皮に流産発症前にすでに変化が起こっていることより、この血管内皮細胞に高濃度に PR が存在する可能性が示唆され、さらに検討を要するところである。流産の進行にしたがって観察される子宮筋の収縮は、脱落膜変性やその周辺部の出血により内因性のプロスタグランジン産生が増加したためであると考えられている⁶⁾。一方、ラットでは胎盤（trophoblast）にも PR が存在するとの報告が見られ⁹⁾¹⁰⁾、RU 投与後の trophoblast の変化にも注目したが、trophoblast の変化は脱落膜の変化に遅れて出現し、かつ軽度であり、RU が直接 trophoblast を障害する可能性も否定できないが、脱落膜の変化に引き続き起こる二次的な変化であると思われた。

次に、D9 と D13 における RU 投与後の血中Pの推移に差が見られたが、まず PR の存在が明らかではない卵巣黄体への RU の直接的関与は否定的である。D9 ではまだ黄体が視床下部一下垂体前葉系の支配を受けている時期であり、RU 投与後24時間以降にPが低下したのは、RU により視床下部一下垂体機能が制御され二次的に黄体機能が制御されたためと考えられる。これに対し、黄体が胎盤支配となっている D13 では RU 投与後48時間後でもなお低下傾向を認めず、trophoblast の障害が比較的軽度である組織学的所見に一致する。

また、受精卵や胚芽に対する RU の影響を観察した大谷ら¹¹⁾によれば、光学顕微鏡レベルで対照群との間に相違を認めなかったとし、Deraedt ら¹²⁾はラットでの LD50 は 1g/kg 以上であると報告しており、受精卵や胎仔への直接作用も否定的である。

着床期である D6、7 での RU5mg/kg 投与群の流産（着床）率が低かったが、これは着床期においては十分なP分泌があり着床に好都合な条件を子宮内膜に作り出していることを示唆するものと思われ、着床期におけるPの重要性が窺われる。

ところで、妊娠の維持には、免疫担当細胞とこれに関連する因子がそれぞれ複雑に関与しあっていることが諸家により報告されているが、免疫学的正常妊娠維持機構の詳細が解明されているわけではないので、その破綻現象としての流産もまた不明な点が多い¹³⁾。しかし、原因不明習慣性流産夫婦においてはその原因として免疫が大きく関わっていることが最近諸家によりかなり詳細に解明されてきており、免疫療法が臨床応用されるまでになっている。妊娠はいわば免疫的寛容状態であるといわれ、Pもこの免疫的寛容にかかわる因子の一つにあげられている。Pはリンパ球、特に T-cell 機能を抑制することにより妊娠の維持にかかわっているとの多数の報告がある¹⁴⁾¹⁵⁾。免疫担当細胞に PR は認めないが、Stites ら¹⁶⁾は、胎盤におけるP濃度 ($10^{-6} \sim 10^{-5}M$) でヒトの T-cell 機能は抑制されると報告している。RU の細胞性免疫に対する効果は知られていないが、RU がP作用を block することにより T-cell 機能の抑制が障害され、免疫的に流産がおこるか否かを示唆する所見が得られるものか、RU 投与後のマウスの着床部位に対し酵素抗体法を利用して T-cell の染色を試みたが、T-cell の動態に有意な変化を確認できず、RU による流産に関する限り免疫的な関与は否定的であった。

以上の成績を総括すると、ラットに対し RU は着床阻害効果および流産誘発効果を示し、その主たる作用部位は脱落膜、特にその血管内皮細胞であると考えられ、免疫担当細胞の関与は否定的であった。また、妊娠の維持、特に着床期におけるPの重要性があらためて浮き彫りにされた。

稿を終えるに臨み、ご懇意なるご指導ご校閲を賜りました恩師竹内正七教授に深甚なる謝意を捧げます。また、直接ご指導いただきました佐藤芳昭講師に心より深謝致します。また、本研究に際し Roussel-Uclaf 社から RU38486 ならびにその資料の提供を受けたことを衷心より感謝いたします。

なお、本論文の概要は、RU486 研究会（1986年、東京）にて発表した。

参 考 文 献

- 1) Herrman, W., Wyss, R., Riondel, A., Philibert, D., Teusch, G., Sakiz, E. and Baulieu, E.E.: The effects of an antiprogesterone steroid on woman: Interruption of the menstrual cycle and early pregnancy.

- Comptes Rendus, **294**: 933, 1982.
- 2) Healy, D.L., Baulieu, E.E. and Hodgen, G.D.: Induction of menstruation by an antiprogestone steroid (RU 486) in primates: Site of action, dose-response relationships, and hormonal effects. *Fertil. Steril.*, **40**: 253, 1983.
 - 3) Philibert, D., Deraedt, R., Teutsch, G., Tournemine, C. and Sakiz, E.: RU38486—A new lead for steroid antihormones. In Program of the 64th Annual Meeting of the Endocrine Society, 668 (Abstract), San Francisco, CA, 1982.
 - 4) Salewski, E.: Färbemethode zum makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte, *Arch. Exptl. Pathol. Oharmakol.*, **247**: 367, 1964.
 - 5) 舘 鄰, 舘 澄江: ネズミの卵着床におけるプロジェステロンの作用機序, *ホルモンと臨床*, **23**: 685~695, 1975.
 - 6) Baulieu, E.E.: RU 486: an antiprogesterin steroid with contragestive activity in women, The antiprogesterin steroid RU486 and human fertility control (Eds. E.E. Baulieu and S.J. Segal), pp. 1~25, Plenum Press, New York, 1985.
 - 7) 石橋正彦, 高橋寿太郎, 菅原七郎, 安田泰久, 編: 実験動物学ラット, pp. 143~144, 講談社, 1984.
 - 8) Secchi, J., Lecaque, D., Tournemine C., and Philibert, D.: Histopharmacology of RU 486. The antiprogesterin steroid RU486 and human fertility control (Eds. E.E. Baulieu and S.J. Segal), pp. 79~86, Plenum Press, New York, 1985.
 - 9) Ogle, T.F.: Characteristics of High Affinity Progesterone Binding to Rat Placental Cytosol, *Endocrinology*, **106**: 1861~1868, 1980.
 - 10) Ogle, T.F. and Beyer, B.K.: Steroid-Binding specificity of the progesterone receptor from Rat Placenta, *J. Steroid Biochem.*, **16**: 147~150, 1982.
 - 11) 大谷 香, 坂元秀樹, 高橋 徹, 佐藤信義, 田 根培, 高木繁夫: ラット着床周辺期における子宮内膜および受精卵に対する RU38486—抗 progesterone 剤—の作用について, *日産婦誌*, **39**: 1709~1714, 1987.
 - 12) Deraedt, R., Vannier, B. and Fournex, R.: Toxicological study on RU486. The antiprogesterin steroid RU486 and human fertility control (Eds. E.E. Baulieu and S.J. Segal), pp. 123~126, Plenum Press, New York, 1985.
 - 13) Billingham, R.E., et al: Current trends in reproductive immunology. An overview. *J. Reprod. Immunol.*, **3**: 253, 1981.
 - 14) Szekeres-Bartho, J., Csernus, V., Hadnagy, J. and Pacsa, A.S.: Immunosuppressive effect of serum progesterone during pregnancy depends on the progesterone binding capacity of the lymphocytes. *J. Reprod. Immunol.*, **5**: 81~88, 1983.
 - 15) Mori, T., Kobayashi, H., Nishimura, T., Mori, T.S., Fujii, G. and Inou, T.: Inhibitory effect of progesterone on the phytohaemagglutinin-induced transformation of human peripheral lymphocytes, *Immunological communications.*, **4**: 519~527, 1975.
 - 16) Stites, D.P. and Siiteri, P.K.: Steroids as immunosuppressants in Pregnancy, *Immunological Rev.*, **75**: 117~138, 1983.

(平成元年1月9日受付)