

---



---

原 著

---



---

ヒト妊娠初期着床部におけるプロスタグランディン  
産生細胞の同定と局在に関する免疫組織学的研究

—免疫酵素抗体二重染色法による—

新潟大学医学部産科婦人科学教室 (主任：竹内正七教授)

阿久津 正

Immunohistochemical Identification of Prostaglandin-Producing  
Cells at the Implantation Site in Early Human Pregnancy  
by Means of a Double Immunoperoxidase Technique

Tadashi AKUTSU

*Department of Obstetrics and Gynecology, School of  
Medicine, Niigata University, Niigata  
(Director: Prof. Shoshichi TAKEUCHI)*

Several investigations have suggested that prostaglandins may play an important role in successful implantation of a conceptus at the endometrium. The present studies were designed to identify prostaglandin-producing cells and to reveal their localization at the implantation site. Eighteen early human pregnant uteri (7-12 weeks of gestation) were analyzed by means of a double immunoperoxidase technique using antibodies to PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, HLA-DR and Leu-M<sub>3</sub>.

The results were as follows.

1. A large number of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>α positive cells were observed in stromal tissues of the decidua and the myometrium.
2. These cells were identified as monocyte/macrophage because of their macrophage-like appearance and positive reaction to anti-Leu-M<sub>3</sub> and anti-HLA-DR antibodies.
3. PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>α positive cells were also observed in stromal tissues of chorionic villi and they were identified as Hofbauer' cells from the same findings

---

Reprint requests to: Tadashi AKUTSU,  
Department of Obstetrics and Gynecology,  
Niigata Rousai Hospital, Joetsu City,  
942 JAPAN.

別刷請求先: 〒942 上越市東雲町 1-7-12  
新潟労災病院 産婦人科

阿久津 正

mentioned above. Trophoblast cells themselves were negative for PGE<sub>2</sub> or PGF<sub>2</sub>α.

It was thus suggested that monocyte/macrophage in the decidua may take part in creation of a local environment prohibiting maternal immune response by producing prostaglandins.

Key words: Implantation site, Prostaglandins, Double immunoperoxidase technique, Monocyte/Macrophage

着床部, プロスタグランジン, 免疫酵素抗体二重染色法, 単球/マクロファージ

## 結 言

同種移植の成立とみなされる妊娠現象において, 母体が様々のかたちで免疫的に反応していることを示す多くの成績が示されている. 特に, 母児の解剖学的接点をなす着床部は, 母児間免疫応答の最先端をなしている.

この着床部において, 妊娠個体の homeostasis に反することなく, 母体の免疫担当細胞の機能を制御する機構が存在するとすれば, 妊卵の着床とその後の妊娠の維持・継続にとって重要な意義をもつと考えられる.

近年, 着床部において抗原非特異的で, かつ主要組織適合抗原とは関係しない免疫抑制物質が存在し, その一つとしてプロスタグランジン (以下, PG) が重要な役割を果たしていることが報告されている.

著者らは, ヒト妊娠初期着床部における PG 産生細胞の同定と局在について, PGE<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2</sub>α に対する抗体を用いた免疫組織学的方法で検討し, その成績の一部をすでに報告した<sup>1)</sup>. 今回, さらに免疫酵素抗体二重染色法を導入し, PG 陽性細胞の正確な同定を試み, 興味ある知見を得たので報告する.

## 研究 方 法

### 1. 研究材料

子宮筋腫などの医学的適応により摘出された初期妊娠子宮 (妊娠7~12週) 18例を材料として用いた. 子宮摘出後, 直ちに着床部の中心より約1cm<sup>3</sup>のブロックを作り, Tissue Tek O. C. T. Compound (Miles 社製) に包埋後, cryostat にて厚さ 5μm の連続組織切片を作製した.

### 2. 抗体

免疫酵素抗体法のための一次抗体として, ウサギ抗 PGE<sub>2</sub> 抗体, ウサギ抗 PGF<sub>2</sub>α 抗体 (小野薬品株式会社), マウス単クローン抗体である抗 HLA-DR 抗体 (Cappel 社), 同じく抗 Leu-M<sub>3</sub> 抗体 (Becton Dickinson 社)

表 1 Procedures of ABC method

1. Fixation in ethanol for 30 min.
2. Wash in PBS.
3. Incubation with normal goat [horse] serum for 30 min.
4. Incubation with rabbit anti-PGE<sub>2</sub>, rabbit anti-PGF<sub>2</sub>α for 12 hrs. [mouse anti-HLA-DR, mouse anti-Leu-M<sub>3</sub> for 30 min.]
5. Wash in PBS.
6. Incubation with biotin-conjugated goat [horse] antibody to rabbit [mouse] IgG for 30 min.
7. Wash in PBS.
8. Incubation with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) for 30 min.
9. Wash in PBS.
10. Color reaction with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 0.5mg/ml in 0.05M Tris-hydrochloride buffer (pH 7.6) containing 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min.
11. Wash in PBS.
12. Counterstain, clear, and mount.

を使用した.

### 3. 免疫酵素抗体法

得られた組織切片をエタノールで30分間固定した後, 表 1 の手順に従って, avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法を行い, diaminobenzidine (DAB)・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> にて褐色に発色させ, メチルグリーンにより核染色を行った. なお, 内因性の peroxidase は, negative control において染色されないため, そのブロックは行わず, 反応特異性は各一次抗体を PBS で置換することにより確認した.

#### 4. 免疫酵素抗体二重染色法

抗 PGE<sub>2</sub> 抗体, 抗 PGF<sub>2</sub>α 抗体, 抗 HLA-DR 抗体及び抗 Leu-M<sub>3</sub> 抗体に反応する細胞の相関を調べる目的で, 免疫酵素抗体二重染色法を行った. すなわち, 本間<sup>2)</sup>による方法に準じて, まず抗 PGE<sub>2</sub> 抗体および抗 PGF<sub>2</sub>α 抗体を反応させたのち, ABC 法にて処理し, DAB・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> にて褐色に発色させた. 次いで, 抗 HLA-DR 抗体及び抗 Leu-M<sub>3</sub> 抗体を反応させ, やはり ABC 法にて処理した後, naphthol・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> にて淡青色に発色させた. この際には核染色は行わず, glycerin・PBS にて封入して観察した.

### 研究成績

#### 1. ヒト妊娠初期着床部の組織像

妊娠8週の着床部 HE 染色標本を示す (写真 1). 多数の絨毛と, その間に母体血流のある絨毛間腔がみられ, anchoring villi が脱落膜に付着している部分が認められる.

#### 2. PGE<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2</sub>α の染色像

PGE<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2</sub>α 陽性細胞が, 脱落膜及び筋層間質内に多数点状しているのが観察された (写真 2, 3). これらの細胞は形態的に比較的大型で, 多稜形を呈しているのが特徴であった. また, 絨毛間質に散在する Hofbauer 細胞にも陽性所見が認められたが, trophoblast には陽性所見は認められなかった (写真 4).

#### 3. HLA-DR 及び Leu-M<sub>3</sub> の染色像

HLA-DR 陽性細胞は, 脱落膜及び筋層に広く分布していたが, 絨毛組織には認められなかった (写真 5, 6, 7). HLA-DR 陽性細胞の中には, monocyte/macrophage を認識する抗 Leu-M<sub>3</sub> 抗体に反応する細胞が多数認められた (写真 5, 6). 加えて, Hofbauer 細胞 (HLA-DR 陰性) にも Leu-M<sub>3</sub> 陽性所見が認められた (写真 7). これらの細胞も形態的に比較的大型で, 多稜形を呈しているのが特徴であり, その分布様式を考えあわせると, PGE<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2</sub>α 陽性細胞と同一の細胞であることが推察された.

#### 4. 免疫酵素抗体二重染色法

上記の PG 陽性細胞の正確な同定を目的とした免疫酵素抗体二重染色法を行ってみた. PG 陽性細胞は DAB・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により褐色に, HLA-DR 及び Leu-M<sub>3</sub> 陽性細胞は naphthol・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により淡青色に発色させたところ, 一つの細胞に褐色と淡青色とが同時に染色されてくる細胞が多数認められた (写真 8, 9, 10). 以上より, 着床部において観察される PG 陽性細胞と monocyte/

macrophage と判断される細胞とは同一細胞であると判断された.

### 考 察

最近の生殖医学の進歩には著しいものがあり, 殊に体外受精・胚移植 (IVF-ET) の成功はその最大の業績の一つと思われる. 従来は, 神の領域に属していた精子の卵細胞への侵入 (受精), その後に引き続いておこる受精卵の分割といった現象が, 現在では人の手により, 実験室で行うことが可能になってきた. しかし, 妊娠成立の重要な段階の一つである着床現象にはいまだ未解明な部分が多く残されており, IVF-ET の成功率の低さもここに原因の一つが求められている.

近年, 着床現象に関与しているものの一つとして PG が注目されてきている. 着床の初期段階として, 子宮内膜の血管透過性の亢進と脱落膜化がおこるが, これに PG が重要な役割を演じていることが, ラット<sup>3)-6)</sup>, マウス<sup>7)</sup>, ハムスター<sup>8)</sup>, 家兎<sup>9)</sup>等多数の動物実験で明らかにされてきた. PG の果たす役割としては, この様に着床の初期段階においては, その物理的作用が中心をなしていると考えられる. しかし, PG の免疫細胞系に及ぼす作用が次第に明らかになるにつれ, PG はその後の妊娠維持機構に関しても大きな役割を担っていることが判明している.

Goodwin et al<sup>10)</sup>によれば, PG (主に PGE<sub>2</sub>) は T cell の interleukin 2 (IL2) 産生能及び反応性を阻害し, T cell 増殖を抑制する作用と, suppressor T cell の活性化を促進する作用とにより, 結果的に細胞性免疫能を抑制すると考えられている.

同種移植の成立とみなされる妊娠現象において, 母児の解剖学的接点である着床部は, 母児間免疫応答の最先端をなしている. 近年, 脱落膜における免疫抑制物質の存在が多数報告されており<sup>11)-15)</sup>, 中でも PG (主に PGE<sub>2</sub>) がその中心的役割を果たしていることが示唆されている<sup>16)-18)</sup>.

この様に, 脱落膜において PG が生成されていることは報告されているが, どの細胞がその産生細胞であるかについての解析は十分ではなかった. 今回, 抗 PGE<sub>2</sub> 抗体及び抗 PGF<sub>2</sub>α 抗体を用いて免疫酵素抗体法を行ったところ, 脱落膜の間質内に PG 陽性細胞が多数点状していることが観察された. これらの細胞は形態的に比較的大型で, 多稜形を呈しているのが特徴で, HLA-DR 陽性で Leu-M<sub>3</sub> も陽性, すなわち monocyte/macrophage と形態的にも, その分布様式からみてもほぼ同一な細胞

であることが強く推察された。

そのため、さらに抗 PG 抗体と抗 HLA-DR 抗体及び抗 Leu-M<sub>3</sub> 抗体との間で免疫酵素抗体二重染色法を試みた。その結果、推察したように両者とも同時に染色されてくる細胞が脱落膜の間質に多数点在しているのが観察され、PG 陽性細胞と monocyte/macrophage とは同一の細胞であると判断された。

本間<sup>2)</sup>は、着床部脱落膜に多数浸潤している monocyte/macrophage と判断される細胞の機能について、母体免疫系の求心路を構成している可能性、すなわち trophoblast のもつ抗原を認識し、それを母体 T cell に提示する“antigen presenting cell”としての可能性を示唆しているが、今回の研究成績を考えあわせると、それ以外にも、PG を分泌して直接着床部局所における母体の免疫能を調節していることも推察される。Hunt et al<sup>19)20)</sup>は、マウスにおいて、妊娠子宮内に多数の macrophage が浸潤しており、その macrophage が免疫抑制作用を有していることを報告しており、上記の推察を支持する成績と考えられる。

上記の PG の免疫抑制作用は、主として PGE<sub>2</sub> に関するものであり、PGF<sub>2</sub>α にはこのような作用はほとんど報告されていない。しかし、PGF<sub>2</sub>α には DNA 合成を高め、細胞増殖を促進する効果が知られている<sup>21)</sup>。したがって、今回の研究で観察された PGF<sub>2</sub>α は、間質細胞から分化した脱落膜細胞の細胞増殖を促進し、脱落膜反応を進行させ、脱落膜形成に重要な役割を担っている可能性も推察される。

着床部において、母体組織すなわち子宮内膜から PG が産生されていることは疑いのないところだが、胎児側での PG 産生の有無については知見に乏しい。家兎の胞胚で PG が産生されていることを示唆する報告<sup>22)23)</sup>はあるが、ヒトにおいては全く不明である。今回、胎児細胞である Hofbauer 細胞に PG 陽性所見が得られたことは、ヒトにおいても胎児側からの PG 産生が推測され、妊娠維持に胎児側から分泌される PG が関与している可能性も示唆され、興味深いものと思われる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師竹内正七教授、直接御指導頂いた金沢浩二助教授、本間滋講師に深謝し、また、本研究に対し貴重な抗体を提供して頂いた小野薬品株式会社に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨の一部は、第39回日本産科婦人科学会学術講演会（東京、1987年）において発表

した。

## 参 考 文 献

- 1) 阿久津正, 本間 滋, 金沢浩二, 竹内正七: ヒト妊娠初期着床部におけるプロスタグランジン産生細胞の同定と局在に関する免疫組織学的研究, 日産婦誌, 39: 2067~2068, 1987.
- 2) 本間 滋: 妊娠初期着床部における絨毛細胞侵入と母体免疫系細胞浸潤との相関に関する研究—単クローン抗体を用いた免疫酵素抗体二重染色法による—, 日産婦誌, 38: 1613~1622, 1986.
- 3) Kennedy, T.G.: Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat, Biol. Reprod., 16: 286~291, 1977.
- 4) Kennedy, T.G.: Prostaglandins and increased endometrial vascular permeability resulting from the application of an artificial stimulus to the uterus of the rat sensitized for the decidual cell reaction, Biol. Reprod., 20: 560~566, 1979.
- 5) Sananes, N., Baulieu, E.-E. and Le Goascogne, C.: Prostaglandin(s) as inductive factor of decidualization in the uterus, Mol. Cell. Endocrinol., 6: 153~158, 1976.
- 6) Tobert, J.A.: A study of the possible role of prostaglandins in decidualization using a nonsurgical method for the instillation of fluids into the rat uterine lumen, J. Reprod. Fert., 47: 391~393, 1976.
- 7) Rankin, J.C., Ledford, B.E., Jonsson, H.T., Jr. and Baggett, B.: Prostaglandins, indomethacin and the decidual cell reaction in the mouse uterus, Biol. Reprod., 20: 399~404, 1979.
- 8) Evans, C.A. and Kennedy, T.G.: The importance of prostaglandin synthesis for the initiation of blastocyst implantation in the hamster, J. Reprod. Fert., 54: 255~261, 1978.
- 9) Hoffman, L.H., Strong, G.B., Davenport, G.R. and Frolich, J.C.: Deciduo-genic effect of prostaglandins in the pseudopregnant rabbit, J. Reprod. Fert., 50: 231~237, 1977.

阿久津論文付図(I)

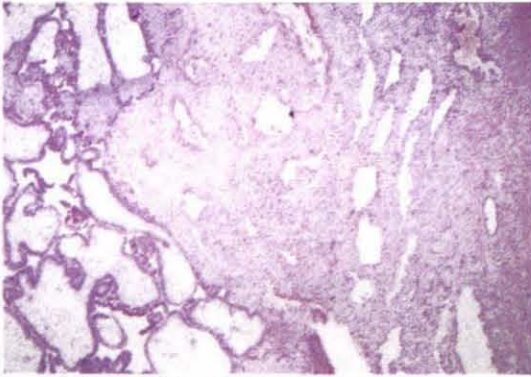


写真 1 妊娠8週の着床部 HE 染色 (×20)  
左側に、絨毛間腔に絨毛が認められ、左側上方に、anchoring villi が脱着膜に付着している部分が認められる。

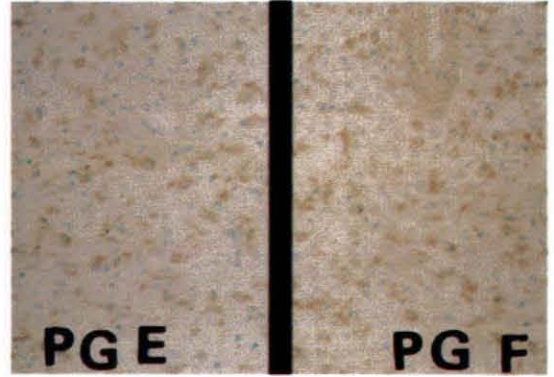


写真 2 着床部脱着膜に多数点在する PG 陽性細胞。(×200)

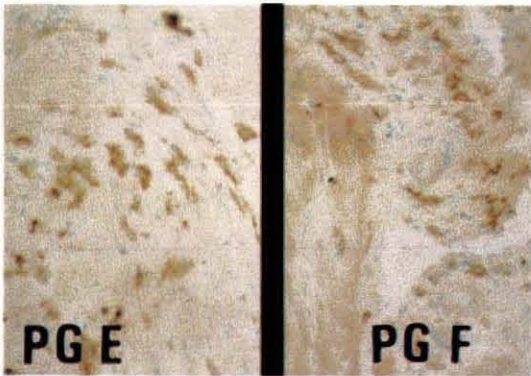


写真 3 筋層内に多数点在する PG 陽性細胞。(×200)

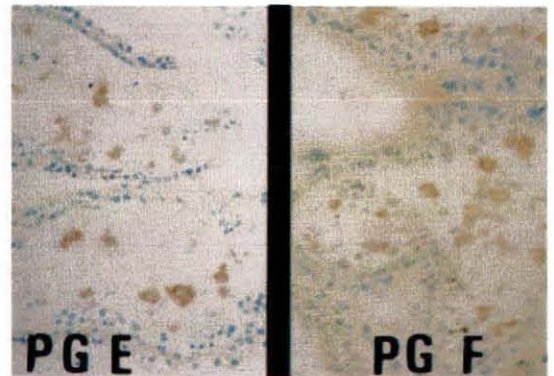


写真 4 Hofbauer 細胞に PG 陽性所見が認められるが、絨毛細胞は陰性である。(×200)

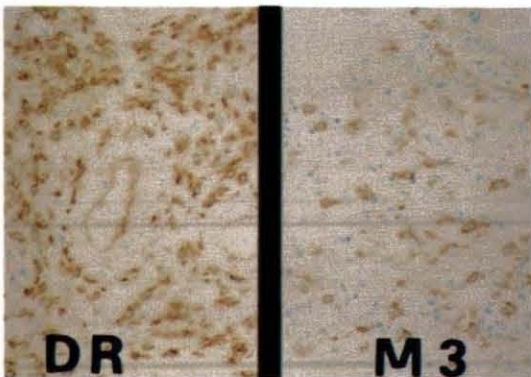


写真 5 着床部脱着膜に認められる HLA-DR 及び Leu-M<sub>3</sub> 陽性細胞。(×200)

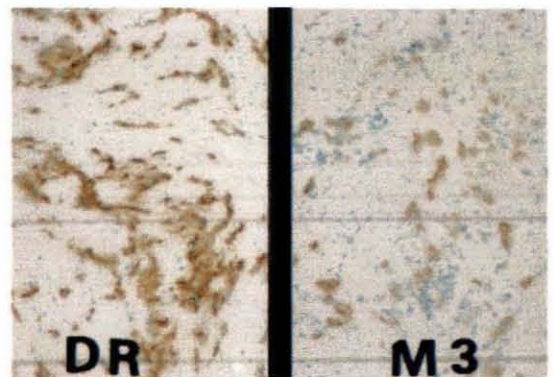


写真 6 筋層に認められる HLA-DR 及び Leu-M<sub>3</sub> 陽性細胞。(×200)

## 阿久津論文付図(Ⅱ)

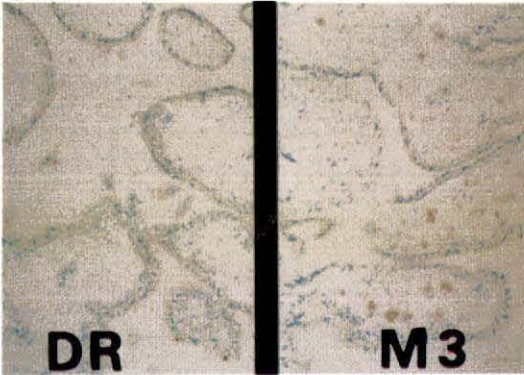


写真7 HLA-DR 陽性細胞は絨毛組織には認められないが、Hofbauer 細胞に Leu-M<sub>3</sub> 陽性所見が認められる。(×200)



写真8 着床部脱落膜における PGF<sub>2</sub> $\alpha$  と HLA-DR との二重染色。(×100)  
(写真8~10: 連続組織切片)

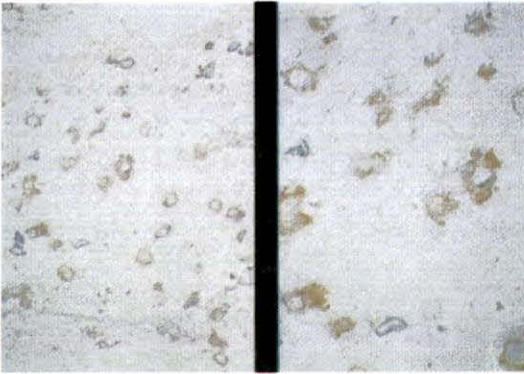


写真9 写真8の拡大像(左側×200, 右側×400)  
一つの細胞内に褐色と淡青色とが同時に染まってくる細胞が、多数認められる。



写真10 PGE<sub>2</sub> と Leu-M<sub>3</sub> との二重染色。(×200)  
ほとんど全ての細胞に、褐色と淡青色とが同時に染まっている。

- 10) Goodwin, J.S. and Ceuppens, J.: Regulation of the immune response by prostaglandins, *J. Clin. Immunol.*, **3**: 295~315, 1983.
- 11) Badet, M.-T., Bell, S.C. and Billington, W.D.: Immunoregulatory activity of supernatants from short-term cultures of mouse decidual tissue, *J. Reprod. Fert.*, **68**: 351~358, 1983.
- 12) Clark, D.A., Slapsys, R.M., Croy, B.A. and Rossant, J.: Suppressor cell activity in uterine decidua correlates with success or failure of murine pregnancies, *J. Immunol.*, **131**: 540~542, 1983.
- 13) Clark, D.A., Slapsys, R., Croy, B.A., Krcek, J. and Rossant, J.: Local active suppression by suppressor cells in the decidua; A review, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **5**: 78~83, 1984.
- 14) Lala, P.K., Chatterjee-Hasrouni, S., Kearns, M., Montgomery, B. and Colavincenzo, V.: Immunobiology of the feto-maternal interface, *Immunol. Rev.*, **75**: 87~116, 1983.
- 15) Nakayama, E., Asano, S., Kodo, H. and Iwa, S.: Suppression of mixed lymphocyte reaction by cells of human first trimester pregnancy endometrium, *J. Reprod. Immunol.*, **8**: 25~31, 1985.
- 16) 藤崎俊一, 河野恭悟, 春山康久, 森 憲生:  
Prostaglandins の免疫学的意義に関する研究  
—着床期子宮内膜における PGE の免疫学的意義  
について—, *日産婦誌*, **34**: 483~490, 1982.
- 17) Matthews, C.J. and Searl, R.F.: The role of prostaglandins in the immunosuppressive effects of supernatants from adherent cells of murine decidual tissue, *J. Reprod. Immunol.*, **12**: 109~124, 1987.
- 18) Tawfik, O.W., Hunt, J.S. and Wood, G.W.: Implication of prostaglandin E<sub>2</sub> in soluble factor-mediated immune suppression by murine decidual cells, *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, **12**: 111~117, 1986.
- 19) Hunt, J.S., Manning, L.S. and Wood, G.W.: Macrophages in murine uterus are immunosuppressive, *Cell. Immunol.*, **85**: 499~510, 1984.
- 20) Hunt, J.S., Manning, L.S., Mitchell, D., Selanders, J.R. and Wood, G.W.: Localization and characterization of macrophages in murine uterus, *J. Leuko. Biol.*, **38**: 255~265, 1985.
- 21) 森田育男, 室田誠逸: プロスタグランジンと細胞増殖, 代謝, **19**: 125~135, 1982.
- 22) Dickmann, Z. and Spilman, C.H.: Prostaglandins in rabbit blastocysts, *Science*, **190**: 997~998, 1975.
- 23) Harper, M.J.K., Norris, C.J. and Rajkumar, K.: Prostaglandin release by zygotes and endometria of pregnant rabbits, *Biol. Reprod.*, **28**: 350~362, 1983.

(平成元年2月1日受付)