ダナゾールの子宮内膜直接作用に関する免疫組織学的検討

京都府立医科大学産婦人科教室

山下 貞雄, 大野 洋介, 渡辺 喜信, 藤本 泰子,
小石 清子, 川嶋 満子, 伊藤 良治, 岡田 弘二

Immunohistochemical Determination of Endometrial Progesterone Receptor (PR) Content after Intrauterine Infusion of Danazol in Rabbits

Sadao YAMASHITA, Yohsuke OHNO, Yoshinobu WATANABE,
Yasuko FUJIMOTO, Kiyoko KOISHI, Mitsuko KAWASHIMA,
Ryouji ITOH and Hiroji OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

Danazol, an isoxazol derivative of 17α -ethinyl-testosterone, has various effects on the female reproductive system. To examine its anti-estrogenic effects through the receptor system and clarify its direct effect on the endometrium in vivo, we applied danazol jelly into the rabbit uterine cavity.

Recent studies performed in our laboratory using the ligand-binding assay have shown that danazol administered directly into the uterine cavity is absorbed by the endometrial tissue and exerts its anti-estrogenic effects possibly through progesterone receptors (PR) in the cells. In the present study we examined the variations in endometrial PR content during 7 days after the intrauterine administration of danazol into the rabbit uterine cavity. Immature female white rabbits were used. They were given daily subcutaneous injections of estradiol- 17β (E_2) for 3 days after which their abdomens were opened, and danazol gel was infused into the lumen of the right horn and HPC-jelly was infused into the lumen of the left horn, as the control. Thereafter and until they were killed, the same daily dose of E_2 was injected. They were killed 6h, 24h, 3 days, 5 days or 7 days after intrauterine infusion of danazol and PRs were studied immunohistochemically using a specific antireceptor monoclonal antibody (PR-AT 4.14). Six hours after danazol infusion, the PR staining in the glandular epithelium and part of the stroma surrounding the epithelium had declined. On day 3, PR staining declined to its lowest level in the glandular epithelium and stroma. On Day 5, PR staining had been restored in the glandular epithelium but stayed low in the stroma. The PR staining had been restored completely on Day 7. On the other hand, PR staining in the myometrium remained unchanged throughout the 7 days the experiment lasted. We conclude that danazol administered into the uterine cavity is absorbed by the endometrial tissue and binds to PRs directly. The effect of danazol

on the receptor level lasted for at least 7 days. Thus, it seems there is some kind of barrier at this level which prevents danazol permeation through the myometrium.

Keywords: danazol, direct effects, progesterone receptor, immunohistochemical staining

緒 言

ダナゾールの複雑な薬理作用については、中枢作用、直接作用、さらに今日では免疫系を介する作用機序も言われている。そこで *in vivo* でのダナゾールの子宮内膜に対する直接作用を検討する目的で、われわれは以前、ダナゾールをウサギの双角子宮の一侧に注入し、他側をコントロールとしてステロイドレセプターの Ligand-binding assay を行い、ダナゾールの抗エストロゲン効果が、プロゲステロンレセプター (PR) を介するプロゲステロン様作用によるものであることを示唆する結果を得た¹⁾²⁾。今回同様の実験系に時間的要因を加味し、PR の免疫組織学的手法を用いて、レセプターレベルでのダナゾールの子宮内膜に対する直接作用の効果発現の開始から消失までの時間経過を、PR の局在の変化から検討した³⁾。

材料および方法

化学物質

17 β -estradiol (E_2) は Sigma Chemical Co St Louis MO USA, Danazol は東京田辺製薬株式会社から購入した。ダナゾールゼリーの作製については山本らの方法に従った⁴⁾。抗プロゲステロンレセプター抗体として PR-AT 4.14 (Affinity BioReagents) を使用した⁵⁾。

動物の前処置

6週齢の未熟雌ウサギに 17 β -estradiol (E_2) 50 μ g/day を連日3日間筋注して開腹、ゲル状のダナゾール5mg を双角子宮の一侧に注入 (Dz 子宮) し、他側をコントロール (C 子宮) とした (Fig 1)。その後も連日 E_2 を筋注した。ダナゾール投与から断頭屠殺までの期間を、6時間、24時間、3日、5日および7日とし、それぞれ屠殺後直ちに開腹して子宮を取り出し生理食塩水で洗浄し、OCT compound (Miles) に包埋して -80℃ で凍結保存した。クリオスタットを用いて、凍結保存したウサギ子宮を長軸に対して垂直に 5-10 μ m の厚さに薄切しスライドガラスに付着させ -20℃ で保存した。

Fig. 1 Administration of danazol

免疫組織学的染色

組織切片は3.7%ホルムアルデヒドで1分間固定を行い⁶⁾, さらに0.3% H_2O_2 に15分間浸して内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。10%ウサギ血清で非特異的抗原をブロックし, PR の一次抗体として PR-AT 4.14(Affinity BioReagents) を用いて, 4℃, 24時間インキュベートした。bridging antibody でインキュベート後, ABC 法で1時間, diaminobenzidine- H_2O_2 (DAB) を10-15分で染色した。

染色性の評価法

同一ウサギの C 子宮と Dz 子宮の PR 染色性を比較検討した。染色性は組織の染色の範囲と強度を定量化する目的で, 内膜上皮, 間質および平滑筋層のそれぞれについて H-score で示した。H-score は以下の式で示される通りである。

$$\text{H-score} = \sum P_i \times i$$

i は染色強度を表し, 1=weak, 2=distinct, 3=strong とした。 P_i はそれぞれの染色強度の染色細胞の全細胞に対する百分率である⁷⁾。

Fig. 2 6 hours after administration of danazol. (a)Control uterus. (b)Danazol uterus. Cross section of a rabbit uterus, showing epithelium(E), stroma(S), and myometrium(M).

Fig. 3 3 days after administration of danazol. (a)Control uterus. (b)Danazol uterus. Cross section of a rabbit uterus, showing epithelium(E), stroma(S), and myometrium(M).

結 果

Fig.2-bはダナゾールゲルを注入して6時間後のDz子宮のPR染色を示している。Fig.2-aのC子宮に比して内膜上皮および間質のPRの染色性に差を生じているのが観察された。すなわちDz子宮の内膜上皮のPRはほとんど消失し、間質部でもLabelling比は低下していた。ダナゾール投与後24時間から3日では、Dz子宮のPRは上皮および間質ともに陰性であった(Fig.3)。しかし平滑筋層のPRには染色性の差はみられなかった。Fig.4-bはダナゾール投与5日後のDz子宮であるが、内膜上皮にPR陽性細胞の出現がみられたが、Fig.4-aのC子宮に比して、間質細胞ではDz子宮の染色性は低いままであった。平滑筋層では差は見られなかった。両者の染色性のheterogeneityが消失するのはダナゾール投与後7日以降であった。

Fig.5は内膜上皮のH-scoreを示している。ダナゾール投与後6時間からすでに低下がみられ、24時間後から3日目まで陰性、5日後には陽性に転じた。

Fig.6は間質部のH-scoreを示している。ダナゾール投与後6時間から低下し始め、回復するのは7日目であった。

Fig.7は平滑筋層の H-score を示している。Dz 子宮では若干の低下傾向が見られたが、明かな差は見られなかった。

Fig. 4 5 days after administration of danazol. (a)Control uterus. (b)Danazol uterus. Cross section of a rabbit uterus, showing epithelium(E), stroma(S), and myometrium(M).

Fig. 5 H-score of epithelium.

Fig. 6 H-score of stroma.

Fig. 7 H-score of myometrium.

考 察

ダナゾールを子宮内腔に投与し、子宮内膜組織での PR の局在の時間的変化を免疫組織学的に観察した。

ダナゾールを投与してすでに6時間後には内膜上皮の PR の染色性が低下し、さらに腺腔近傍の間質部の PR の染色性が低下していた。このことは、子宮の内腔に投与されたダナゾールは6時間以内には内膜組織内に浸透して、上皮から次第に間質に及んでいく様子を示している。Traish らによれば、ここで使用した抗体の染色性が低下している細胞では free の PR が減少していると考えられる⁹⁾。ダナゾールの投与によって、free の PR が減少したという結果から、ダナゾールは子宮内膜に対して cytotoxic に作用して PR の合成を抑制したか、あるいはダナゾールが PR と結合したかのいずれかが考えられる。*In vitro* の実験ではあるが、武谷らによれば、ダナゾールの子宮内膜細胞に対する cytotoxic な効果としてタンパク合成の抑制効果の発現には、24時間以上を要する。従って、この時間的経過から、ダナゾール投与子宮での PR の染色性の低下は、ダナゾールの cytotoxic な薬理効果の発現とは考えにくく、ダナゾールが直接 PR と結合し、これを消費したと考えられる⁸⁾⁹⁾。

ダナゾールの投与後3日目には上皮および間質の labelling 比の低下は最も大きくなり、Dz 子宮の内膜組織の PR はほぼ消失した。5日目には上皮に PR が出現し、7日目には間質にも PR が出現して C 子宮との差はほとんど見られなくなった。間質部での PR の回復が上皮よりも遅れた理由としては、残留ダナゾールによる影響が考えられる¹⁰⁾。そのことから、ウサギの子宮内腔に注入されたダナゾールの効果はレセプターレベルでおよそ1週間持続した。

平滑筋層の染色性はダナゾール投与後の時間経過にはほとんど左右されず, 明かな差は認められなかった。このことから, 内腔に投与されたダナゾールの PR との結合は上皮および間質に限定されており, 周囲の平滑筋層の PR とはほとんど結合しないと考えられた。筋層への浸透を阻止している何等かの機構が存在すると考えられる。

ま と め

- 1) 子宮の内腔に投与されたダナゾールは6時間以内には内膜組織内に浸透して, 上皮細胞内の PR から次第に結合を開始し, 間質に及んでいくことから, ダナゾールは PR に直接結合する。
- 2) PR との結合は上皮および間質に限定されており, 周囲の平滑筋層の PR とはほとんど結合しないことから, 平滑筋層への浸透を妨げる機構の存在が考えられる。
- 3) PR の回復は上皮から始まり, その後間質部が回復する過程から, 残留ダナゾールの効果はおおよそ1週間持続する。

文 献

- 1) 山下貞雄, 大野洋介, 北川一郎, 細田修司, 岡田弘二: ダナゾールの子宮内膜直接効果. エンドメトリオーシス研究会誌 1991; 12: 139-143
- 2) 山下貞雄, 大野洋介, 北川一郎, 川嶋満子, 小石清子, 岡田弘二: ダナゾールのウサギ子宮内投与による子宮内膜への直接効果. エンドメトリオーシス研究会誌 1992; 13: 88-91
- 3) Snijders MP, De Goeij AF, Koudstaal J, Rousch MT, Scheres HM, Stoot JE, Bosman FT: Is immunohistochemical analysis of oestrogen and progesterone receptors in endometrial carcinoma superior to the radioligand binding assay? J Pathol 1990; 161: 129-135
- 4) 山本 宝, 大野洋介, 北脇 城, ト部 論, 福岡正晃, 田村尚也, 本庄英雄, 岡田弘二, 伏木信次: Hydroxypropylcellulosum を用いた danazol セリーの作製とその薬物動態について. 日本不妊学会雑誌 1991; 36: 58-62
- 5) Traish AM, Wotiz HH: Monoclonal and polyclonal antibodies to human progesterone receptor peptide - (533-547) recognize a specific site in unactivated (8S) and activated (4S) progesterone receptor and distinguish between intact and proteolyzed receptors. Endocrinol 1990; 127: 1167-1175
- 6) Press MF, Greene GL: Methods in laboratory investigation. An immunocytochemical method for demonstrating estrogen receptor in human uterus using monoclonal antibodies to human estrophilin. Laboratory Investigation 1984; 50: 480-486
- 7) Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Green GL, McCarty KS, Jr.: Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 1988; 67: 334-340
- 8) Melega C, Balducci M, Bulletti C, Galassi A, Jasonni VM, Flamigni C: Tissue factors influencing growth maintenance of endometriosis. Annals New York Academy of Sciences 1991; 622: 256-265
- 9) 武谷雄二: Danazol の子宮内膜組織への直接効果. 産科と婦人科 1985; 52: 1363-1365
- 10) Lessey BA, Metzger DA, Haney AF, MacCarty KS, Jr.: Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriosis: comparison with normal endometrium during the menstrual cycle and the effect of medical therapy. Fertil Steril 1989; 51: 409-415

(受付日: '93. 3. 9)

(採択日: '93. 6. 14)