

子宮筋腫・子宮筋の Estrogen Receptor 量および Estrogen Receptor 染色陽性率の比較

産業医科大学産婦人科学教室 (主任: 岡村 靖教授)

大塚 治夫 篠原 道興 柏村 正道
吉田 耕治 岡村 靖

A Comparison of Radioreceptor Assay and Immunocytochemical Staining for Estrogen Receptor in Leiomyoma and Myometrium

Haruo OHTSUKA, Michioki SHINOHARA, Masamichi KASHIMURA,

Kohji YOSHIDA and Yasushi OKAMURA

*Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, University
of Occupational and Environmental Health, Fukuoka*

概要 担子宮筋腫患者 8 名の摘出子宮を用いて、筋腫および子宮筋の estrogen receptor (ER) 量の測定、および ER 染色を施行し両者の比較検討をした。ER 量は、radioreceptor assay (RRA) にて、ER 染色は、免疫細胞化学的染色の peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 法を用いた。

ER 量に関して、筋腫の方が子宮筋よりも高い傾向を示したが、有意差はなかつた。ER 染色に関して、判定基準を、分布様式を考慮し最も陽性細胞の集合している部分の細胞陽性率で比較検討したところ、 $p < 0.05$ の有意差をもつて、筋腫の方が子宮筋よりも高かつた。

以上のことより、筋腫は、子宮筋よりも ER 陽性細胞を集結させ、効率よく estrogen を取り込んでいくかもしれないと考えられた。

Synopsis Estrogen receptor (ER) content in myoma and myometrium was determined by radioreceptor assay (RRA), and ER staining was performed by immunocytochemical staining, i.e., the peroxidase-anti-peroxidase (PAP) method, in uterine samples from eight patients with uterine leiomyoma.

ER content in myoma tended to be higher than that in myometrium, but the difference was not significant. The distribution pattern of ER staining was thought to be an important criterion. When the data were compared on the basis of the number of cells in the site where the largest number of positive cells aggregated, the number for myoma was significantly higher than that for myometrium ($p < 0.05$).

These results suggest that myoma contains more ER positive cells and more efficiently absorbs estrogen than myometrium.

Key words: Uterine leiomyoma • Myometrium • Estrogen receptor • Radioreceptor assay • Immunocytochemical staining

緒 言

子宮筋腫は、婦人科腫瘍中最も一般的な腫瘍である。この腫瘍は、estrogen sensitive であり、妊娠や pill の服用のような estrogen 刺激により大きくなることは一般に知られている¹⁴⁾。逆に閉経後になり、estrogen 生成が減少すると、子宮筋腫は縮小したり、無症状になることもよく観察される⁸⁾。

しかし、筋腫患者の血中性 steroid 定量で estrogen との相関はないとする報告¹⁾²⁵⁾²⁷⁾が多数

意見のようである。そのため、必然的に筋腫局所に対する estrogen sensitivity の相違を検討する報告がみられるようになった¹⁰⁾¹⁹⁾。また近年の性 steroid receptor の研究の発展は、筋腫細胞への性 steroid の関与をより一層明らかにした。しかし、その receptor の量的差異は、報告によりさまざまである¹¹⁾¹⁸⁾²⁰⁾²²⁾²⁶⁾²⁹⁾。

今回われわれは、子宮筋腫および子宮筋の estrogen receptor (ER) 量の測定結果に加えて ER の分布を考慮することにより、以上の問題点を解

決しうると考え、両者を合わせて検討してみた。

研究方法

1. 材料

ER の測定および ER 染色に用いた子宮筋腫および子宮筋は、担子宮筋腫患者 8 名の摘出子宮であり、手術場で摘出後ただちにドライアイスで凍結し、実際使用するまで -80°C にて保存した。その一部は、病理組織に提出し組織の確認をした。筋腫は、すべて直径 3cm 以上の漿膜下筋腫または、筋層内筋腫であり、筋腫に切開をいれ辺縁に近い部のサンプルを用いた⁶⁾。子宮筋は、筋腫と少なくとも 1cm 以上離れた体部付近より採取した。なお、摘出時の月経周期は、最終月経よりの換算で表現した。

2. ER の測定

組織細胞質の ER と ^{125}I -estradiol (^{125}I -E₂) の結合を利用した radioreceptor assay (RRA) により測定した。receptor と結合した ^{125}I -E₂ (Bound) と未結合の ^{125}I -E₂ (Free) の分離は、dextran-coated-charcoal (DCC) 法で行い、試料中の ER 量を 5 点 Scatchard 解析法²³⁾で求めた。ER の判定基準は、1. $\text{Kd} < 1.00 \times 10^{-9} \text{M/l}$, 2. 5points の B/F 値がすべて 1 以下, 3. |直線回帰係数| > 0.9 の条件をすべて満足したものを陽性とし、結合部位数: fmol/mg cytosol protein として表現した。また組織蛋白量は生化学的に汎用されている Lowry 法¹⁶⁾により求めた。図 1 に実際の測定法を掲げた。化学物質は、16 α -Iodo-3, 17 β estradiol (^{125}I -E₂ S.A.2, 200 μ ci, New England Nuclear, MASS., U.S.A.), diethylstilbestrol (3, 4bis (P-hydroxyphenyl) -3-hene, DES, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) を用い、他の薬品は和光純薬、第一化学薬品社製の、純度の高いものを用いた。

3. ER の染色

ER の染色は、ER・ICA「アボット」(ダイナボット社、東京)の kit を用いた。その手順は、図 2 に掲げた。酵素抗体法による免疫細胞化学的染色で、peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 法を用いている。この kit を用いて、子宮筋腫および子宮筋の凍結切片作成後染色した。なお、control として、乳癌培養細胞 MCF-7⁵⁾を用いた。判定基準は、ER 陽

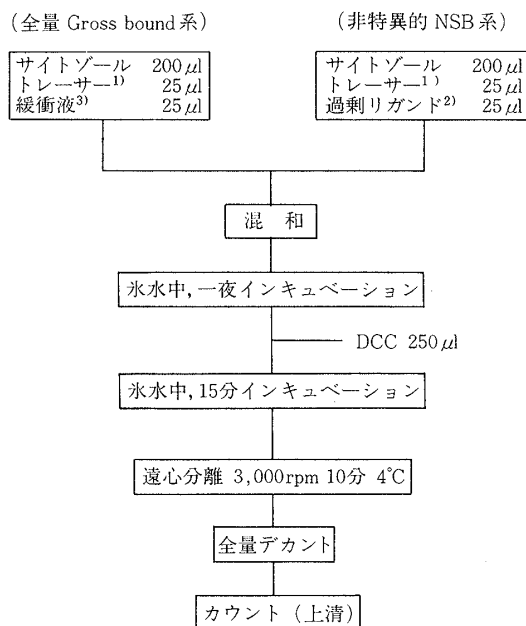


図 1 Estrogen receptor assay

- 1) ^{125}I -estradiol (^{125}I -E₂) 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 fmol/tube
- 2) 過剰 cold diethylstilbestrol (DES)
- 3) 緩衝液 10mM Tris HCl buffer pH7.4 (EDTA, Dithiothreitol)

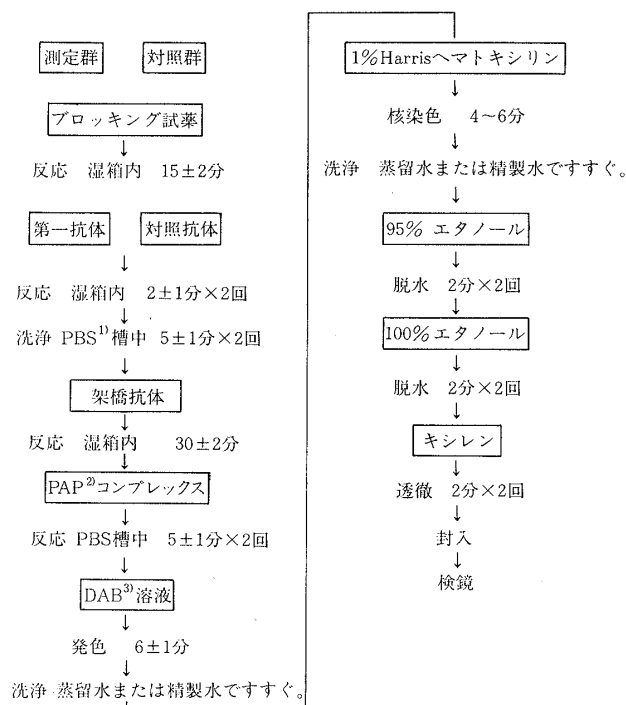


図 2 Estrogen receptor 染色フローチャート

- 1) phosphate buffer solution (PBS)
 - 2) peroxidase-anti-peroxidase (PAP)
 - 3) 3, 3'diamino-benzidine-4HCl (DAB)
- (反応はすべて室温)

表1 子宮筋腫・子宮筋に対する estrogen receptor 量と estrogen receptor 染色の陽性率

Patient	Age	Day	ER(fmol/mg protein)			Positive ratio of ER staining		
			LM	MM	(LM/MM)*	LM(%)	MM(%)	(LM/MM)*
1	47	31	20.1	10.5	1.9	11.5	17.3	0.7
2	48	12	23.7	9.9	2.4	30.3	3.1	9.8
3	50	30	38.7	6.0	6.5	32.9	10.3	3.2
4	37	26	34.4	24.5	1.4	33.2	23.5	1.4
5	43	12	7.1	23.4	0.3	20.8	14.7	1.4
6	38	24	15.7	7.6	2.1	25.2	8.6	2.9
7	52	12	21.6	9.2	2.3	55.6	31.3	1.7
8	42	21	15.0	53.7	0.3	32.2	21.0	1.5
Mean			22.0	18.1	2.2	30.2	16.2	2.8
SD			10.4	16.0	1.9	12.7	9.0	2.9
Statistical analysis(P*)			NS			p<0.05		

*Ratio ; *based on difference between paired samples. Day ; day from last menstrual period.

ER, estrogen receptor ; LM, leiomyoma ; MM, myometrium ; NS, not significant

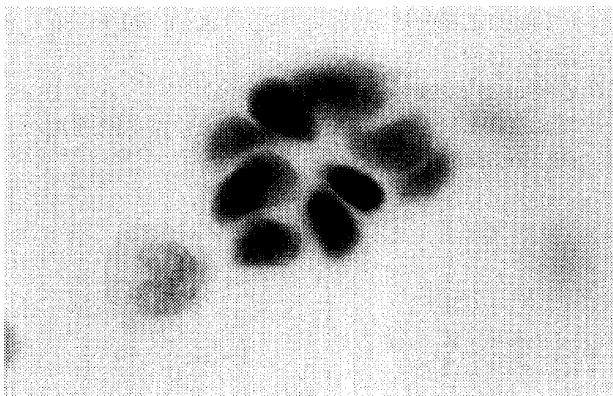


写真1 MCF-7細胞のER染色(油浸レンズ, ×500). ER陽性細胞の核が褐色に染色されている。

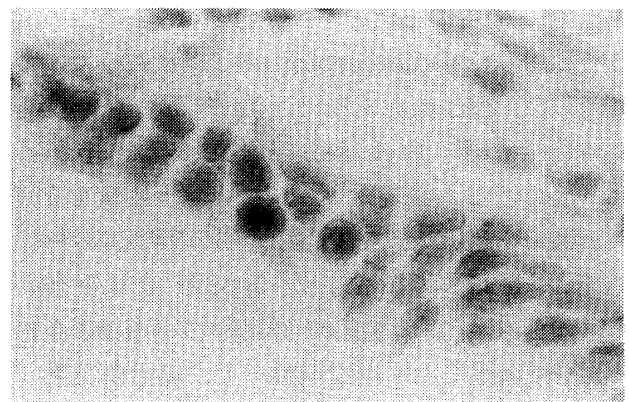


写真2 子宮筋腫のER染色(油浸レンズ, ×500). ER陽性細胞が集結している(症例No. 7)。

性細胞の分布様式を考慮し, 切片中, 倍率×40の視野にて, 陽性細胞の集合している部分を見出し, 倍率をあげてゆき, 最終的に倍率×1,000の油浸レンズにて, 最も陽性細胞の集合している部分を中心に, 前後左右5視野中の全細胞を数えて, 陽性率を求めた⁴⁾⁷⁾¹⁷⁾。

研究成績

1. ER濃度および, ER陽性率

表1は, 筋腫および子宮筋のER濃度およびER陽性率を示したものである。ER濃度に関しては, 筋腫および子宮筋間に有意な相関は得られなかったが筋腫/子宮筋の比をとると, 8例中6例が1.0以上であり, 筋腫に高い傾向は存在するようである。次に, ER陽性率であるが, $p<0.05$ の有意

差をもつて, 筋腫の方が子宮筋よりも, 陽性率が高かった。

2. ER染色

写真1は, MCF-7細胞におけるER染色である。褐色に染まった核がER陽性細胞の所見である。写真2は, 子宮筋腫におけるER染色である。このように, 集合したER陽性細胞が目立つ。写真3は, 子宮筋におけるER染色である。子宮筋の場合は, わりと分散したER陽性細胞が特徴的であり, 染色性も弱い感がある。

考 察

組織学的に, 筋腫局所での高estrogen状態を示唆する報告として, Deligdish et al.¹⁰⁾は, 担子宮筋腫患者の摘出子宮30例において, 筋腫近傍の

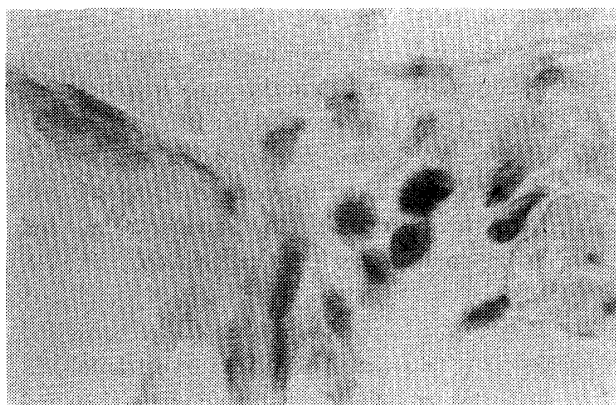


写真3 子宮筋の ER 染色 (油浸レンズ, ×500).
ER 陽性細胞は分散しており, 染色性も弱い
(症例 No. 7).

endometrium が, hyperplasia の頻度が高いとしている. また, Otsubu et al.¹⁹⁾は, 実際に12人の摘出子宮を用いて, 筋腫と子宮筋の estradiol-17 β (E₂)を測定し, 有意に筋腫の方が高いと報告している. この筋腫の E₂が高い理由として, Pollow et al.²¹⁾は, 筋腫中の E₂-17 β -hydroxy dehydrogenase (E₂ DH) の活性が低く, E₂が estrone (E₁)に変換されずに, 局所での E₂の pooling がおこると推定している. しかし, Gabb et al.¹²⁾は, 筋腫および子宮筋の E₂ DH の差はないとしているし, 藤井らは, 逆に筋腫での E₂ DH 活性は, 卵胞期で有意に高いとしている.

receptor の研究では, ER に関しては, 筋腫の方が子宮筋より高値とするもの¹¹⁾²⁰⁾²⁹⁾, 差がないとするもの¹⁸⁾²²⁾²⁶⁾に分かれるが, 全体の印象としては, 筋腫の方が ER が高い傾向を呈するとしており, われわれの結果もそうであつた. それゆえ, 筋腫の方が, 一般に ER が高いと考えていいかもしれない. ここで, 考慮せねばならないことは, ER の月経周期との変動である. 周期性変化と比較しても, 差がないとしているものの³⁾²⁴⁾, 常に考えねばならない問題点と言える. また, receptor に関して, progesterone receptor (PR)⁹⁾²⁰⁾²⁹⁾, androgen receptor (AR)³⁾²⁴⁾も筋腫の発育に関与していると考えられるものであり, われわれも検討中である.

ER 染色に関して, 今回使用した monoclonal 抗体は, Greene et al.¹³⁾が, ヒト乳癌細胞 MCF-

7 cytosol より作製したものである. しかし, 染色結果は, nuclear receptor のみが陽性であつた. この理由として, 1) 抗体が monoclonal 抗体であるため E₂-receptor complex にとくに強く反応する clone がより核内に存在している可能性がある, 2) cytosol receptor は抗原性不安定のため, 免疫染色の感度以下であるのに対し, nuclear receptor は DNA と結合しており量も多く安定している, などが考えられる. 文献的には, King et al.¹⁵⁾は, cytosol と nuclear の ER protein は, nuclear にこそ, その起源があるとし, Welshones et al.²⁸⁾は, free の receptor は nucleus にのみ存在するとしており, receptor の metabolism と考え合わせて, 興味深い問題であり, 今後の研究が待たれる. 次に, ER 染色の結果判定基準に関してであるが, これも一定の見解はないようである. 中尾ら⁴⁾の報告では観察した切片に ER 陽性細胞が存在すれば, ER 陽性検体と判定しており, 戸井ら⁷⁾は, ER 陽性細胞率が, 10%以上の検体を ER 陽性検体としている. McCarty et al.¹⁷⁾は, 染色強度と biochemical assay とを組み合わせて判定している. われわれは, 分布様式を考慮した方法を用いたが, 判定基準の一定化が望ましいため, 今後の集積結果を待ちたい. 今回の結果より, 筋腫は, 子宮筋より密に ER を集結させ, 効率よく, estrogen を取り込んでいるのではないかと考えている.

今後さらに症例を増やし, 検討してゆきたい.

文 献

1. 藤井信吾: 子宮筋腫の発生要因・組織発生起源とその内分泌相関. 日産婦誌, 35: 1166, 1983.
2. 加藤順三, 野村雍夫, 松本圭史, 小野内常子: エストロゲンの Radioreceptor 測定の実際. 日本臨床, 34: 66, 1976.
3. 本山敏彦: ヒト子宮筋, 子宮筋腫, 子宮腺筋症および子宮内膜症のステロイドレセプター. 日内分泌誌, 54: 1407, 1978.
4. 中尾 誠, 野口伸三郎, 小山博記, 佐藤文三: 免疫組織化学的手法による乳癌エストロゲンレセプターの局在の検討. 乳癌の臨床, 1: 292, 1986.
5. 野村雍夫, 松井かつ子, 田代英哉, 浜田雄蔵, 佐伯和利: コロニー形成法によるヒト乳癌培養細胞 (MCF-7) のステロイドホルモンに対する感受性の検討. 癌と化療, 10: 1335, 1983.

6. 高森清信, 山本 宝, 岡田弘二: 子宮筋腫の estrogen 合成能とその意義. 日内分泌誌, 59: 1464, 1976.
7. 戸井雅和, 浜田雄蔵, 世戸芳博, 久松和史, 末広真一, 新本 稔, 服部孝雄: モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法による乳癌 estrogen receptor の測定. 医のあゆみ, 136: 227, 1986.
8. *Bovin, E.*: On symptoms of myomata of the uterus-during menopause. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 9: 90, 1930.
9. *Buchi, K.A. and Keller, P.J.*: Cytoplasmic progestin receptors in myomal and myometrial tissues. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 62: 487, 1983.
10. *Deligdish, L. and Loewenthal, M.*: Endometrial changes associated with myomata of the uterus. *J. Clin. Pathol.*, 23: 676, 1982.
11. *Farber, M., Conrad, S., Heinrichs, W.L. and Herrmann, W.L.*: Estradiol binding by fibroid tumors and normal myometrium. *Obstet. Gynecol.*, 40: 479, 1972.
12. *Gabb, R.G. and Stone, G.M.*: Uptake and metabolism of tritiated oestradiol and oestrone by human endometrial and myometrial tissue in vitro. *J. Endocr.*, 62: 109, 1974.
13. *Greene, G.L., Sobel, N.B., King, W.J. and Jensen, E.V.*: Immunochemical studies of estrogen receptors. *J. Steroid Biochem.*, 20: 51, 1984.
14. *John, A.H. and Martin, Q.*: Growth of leiomyoma with estrogen-progesterone therapy. *J. Reprod. Med.*, 6: 49, 1971.
15. *King, W.J. and Greene, G.L.*: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, 307: 745, 1984.
16. *Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.*: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
17. *McCarty, K.S. Jr., Miller, L.S., Cox, E.B., Konrath, J. and McCarty, K.S. Sr.*: Estrogen receptor analysis. *Archi. Pathol. Lab. Med.*, 109: 716, 1985.
18. *Ochiai, K.*: Cyclic variation and distribution in the concentration of cytosol estrogen and progesterone receptors in the normal human uterus and myoma. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 32: 945, 1980.
19. *Otsubu, J.A., Buttram, V.G., Besch, N.F. and Besch, P.K.*: Unconjugated steroids in leiomyomas and tumorbearing myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 143: 130, 1982.
20. *Pollow, K., Geilfub, J., Boquoi, E. and Pollow, B.*: Estrogen and progesterone binding proteins in normal human myometrium and leiomyoma tissue. *Obstet. Gynecol.*, 55: 20, 1980.
21. *Pollow, K., Sinnecker, G., Boquoi, E. and Pollow, B.*: In vitro conversion of estradiol-17 β into estrone in normal human myometrium and leiomyoma. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 16: 493, 1978.
22. *Puukka, M.J., Kontula, K.K., Kauppila, A.J.I., Janne, O.A. and Vihko, R.K.*: Estrogen receptor in human myoma tissue. *Mol. Cell Endocrinology*, 6: 35, 1976.
23. *Scatchard, G.*: The attractions of proteins for small molecules and ions. *N.Y. Acad. Sci. Ann.*, 51: 660, 1949.
24. *Soules, M.R. and McCarty, K.S. Jr.*: Leiomyomas: Steroid receptor content variation within normal menstrual cycles. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 143: 6, 1982.
25. *Spellacy, W.N., Maire, F.W.J., Buhi, W.C., Birk, S.A. and Bradley, B.A.*: Plasma growth hormone and estradiol levels in women with uterine leiomyomas. *Obstet. Gynecol.*, 40: 829, 1972.
26. *Tamaya, T., Motoyama, T., Ohono, Y., Ide, N., Tsurusaki, T. and Okada, H.*: Estradiol-17 β -progesterone and 5 α -dihydrotestosterone receptors of uterine myometrium and myoma in the human subject. *J. Steroid Biochemistry*, 10: 615, 1979.
27. *Toth, F., Primasz, P. and Domotori, J.*: Hormonale und histologische untersuchungen bei uterusmyomen. *Z. Geburtsh. Gynak.*, 170: 163, 1969.
28. *Welshones, W.V., Lieberman, M.E. and Goshi, J.*: Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature*, 307: 747, 1984.
29. *Wilson, E.A., Yang, F. and Rees, E.D.*: Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyomata and in normal uterine tissues. *Obstet. Gynecol.*, 55: 20, 1980.

(No. 6380 昭63・5・19受付)