

## 初期胚着床部における接着性物質の 局在に関する免疫組織学的研究

浜松医科大学産科婦人科学教室 (主任: 川島吉良教授)

朝比奈俊彦 小林 隆夫 寺尾 俊彦

### Studies on the Immunohistochemical Localization of Adhesive Factors at the Site of Implantation in the Early Pregnancy

Toshihiko ASAHINA, Takao KOBAYASHI and Toshihiko TERAO

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu  
(Director: Prof. Yoshiro Kawashima)

**概要** 目的: 受精卵の着床や妊娠初期の接着現象に関しては, その機序は依然として不明な点が多くいまだ十分解明されているとはいえない。そこでわれわれは, 着床直後のマウス初期胚およびヒト初期妊娠着床部, さらに正常子宮内膜培養細胞における接着関与物質の局在を酵素抗体法を用いて検索し, 初期胚と子宮内膜との接着機構の解明を試みた。

方法: ① ICR 系雌マウスを PMS-hCG を用い過排卵処理し交配させ, 妊娠 5 日目に子宮を摘出し fibronectin (FN), laminin (LM), type IV collagen (C<sub>IV</sub>), XIII 因子 subunit S (XIII<sub>S</sub>) の染色を行った。② ヒト患者において手術的に摘出した卵管妊娠 (7~8w) および子宮筋腫合併妊娠 (5w) の着床部で, FN, LM, C<sub>IV</sub>, XIII 因子 subunit A (XIII<sub>A</sub>), XIII<sub>S</sub> の染色を行った。③ ヒト患者において, 手術的に摘出した筋腫子宮の正常内膜部分を無血清培地にて単層培養し, FN, XIII<sub>A</sub>, XIII<sub>S</sub> の染色を行った。染色はすべて酵素抗体間接法を用いた。

結果: ① マウス初期胚着床部では FN と XIII<sub>S</sub> が trophoblast giant cells に, C<sub>IV</sub> は子宮内膜上皮細胞に陽性染色された。LM は distal endoderm とその基底膜に陽性染色された。② ヒト初期妊娠着床部では C<sub>IV</sub> が syncytiotrophoblast の表面と絨毛間質部, および子宮又は卵管内膜間質部に, FN と XIII<sub>A</sub> が絨毛間質部, および子宮又は卵管内膜間質部に陽性染色された。③ 子宮内膜培養細胞においては FN と XIII<sub>A</sub> が間質細胞に陽性染色された。

結語: ① マウス初期胚着床時の接着現象において, FN, C<sub>IV</sub> およびそれらの接着に架橋的に働く XIII 因子の関与が強く示唆された。② ヒト初期妊娠の接着機構においても FN, C<sub>IV</sub>, XIII 因子の関与が強く示唆された。③ さらにその FN と XIII 因子は, 子宮内膜間質細胞で産生されていることが判明した。

**Synopsis** We studied the localization of adhesive proteins at the site of implantation in mouse pregnancy (5 days' gestation), and human pregnancy (5~8 weeks' gestation) and in human endometrial culture cells. Immunohistochemical staining of adhesive protein such as fibronectin (FN), laminin, type IV collagen (C<sub>IV</sub>), subunit A of factor XIII (XIII<sub>A</sub>), and subunit S of factor XIII (XIII<sub>S</sub>) were performed by indirect enzyme immunoassay to investigate their localization.

① In mouse pregnancy: FN and XIII<sub>S</sub> were stained in trophoblastic giant cells, and C<sub>IV</sub> was stained in the endometrial epithelium.

② In human pregnancy: (fetal side) C<sub>IV</sub> was stained diffusely on the surface of syncytiotrophoblast. FN, C<sub>IV</sub>, and XIII<sub>A</sub> were stained in the stroma of the villi. (maternal side) FN, C<sub>IV</sub>, and XIII<sub>A</sub> were stained in the endometrial stroma.

③ In endometrial culture cells: FN and XIII<sub>A</sub> were stained strongly in the stromal cells.

These findings demonstrated that FN and XIII<sub>A</sub> are produced in the endometrial stromal cells, and suggest that FN, C<sub>IV</sub>, and XIII<sub>A</sub> are concerned with the attachment of the embryo to the uterus. Therefore, these adhesive proteins are important factors in maintaining pregnancy.

**Key words:** Implantation • Fibronectin • Laminin • Type IV collagen • Factor XIII

## 緒 言

受精卵の着床，その第一段階は受精卵と子宮内膜との接着である．ところがその機序は依然として不明である．また妊娠初期における初期胚と子宮内膜との接着現象についてもその機構はやはり不明である．

しかし最近になつて fibronectin(FN), laminin (LM), type IV collagen (C<sub>IV</sub>) などの接着性物質の関与が示唆されるようになってきた．

そこで本研究では初期胚と子宮内膜との接着機構を明らかにするために，着床直後のマウス初期胚とその周辺部，ヒト初期妊娠着床部およびヒト子宮内膜培養細胞における接着関与物質の局在を酵素抗体法を用いて形態学的に検索した．

### 実験材料および方法

#### I. 実験材料

##### 1) 使用した組織

実験に用いた組織を表1に示す．

採取した組織はただちに10%ホルマリン固定しパラフィン包埋した．ただし子宮内膜はそのまま組織培養を施行した．

##### 2) 使用した試薬

① 抗体および発色剤：rabbit IgG anti-mouse fibronectin(UCB Bioproducts, Belgium), rabbit antisera to mouse laminin (Gibco Laboratories Life Technologies Inc., U.S.A.), rabbit antisera to bovine type IV collagen (コスモバイオ社), rabbit IgG anti-human fibronectin (Biomedical Technologies Inc., England), rabbit IgG anti-human laminin (Transformation Research Inc., U.S.A.), rabbit antisera to human type IV collagen(Chemicon International Inc., U.S.A.),

rabbit antisera to human factor XIII<sub>A</sub> (Behringwerke AG., West Germany), rabbit antisera to human factor XIII<sub>S</sub> (Behringwerke AG., West Germany), horseradish peroxidase conjugated goat IgG fraction anti-rabbit IgG (Cooper Biomedical Inc., U.S.A.)

② 組織培養液，試薬，器具：Ham's F12 medium (Sigma Inc., U.S.A.), 0.25% collagenase (和光純薬), Fetal calf serum (Gibco Inc., U.S.A.), Lab-Tak chamber (Nunc Inc., U.S.A.)

#### II. 抗体の検定

各抗体は，それぞれマウス，ヒトに対する特異性がオクタロー法，電気泳動法にて検定されているものを使用した．

ただし XIII 因子に関しては，オクタロー法にて検定したところ，マウス血漿と抗ヒト XIII<sub>S</sub>血清の間には沈降線が出現したが，抗ヒト XIII<sub>A</sub>血清との間には出現しなかつた．ゆえにマウス初期胚着床部における XIII 因子の検索は，XIII<sub>S</sub>のみ施行した．

#### III. マウス子宮採取法

まず性腺刺激ホルモンであるセロトロピン®を5単位腹腔内注射した．そしてその48時間後にゴナトロピン®1000を5単位腹腔内注射し，その後ただちに交配させた．翌朝腔栓形成を確認したらその日を妊娠0日とし，妊娠5日目に子宮を摘出しホルマリン固定した．

#### IV. 子宮内膜組織培養法

培養法の手順は表2に示す．

#### V. 染色法

染色法は酵素抗体間接法を用いた．

パラフィン切片の場合，まずパラフィン包埋された組織材料をマイクロームを用いて厚さ3 $\mu$ に薄切した．スライドガラスに貼付した切片を湯のぼした後，37 $^{\circ}$ Cの孵卵器中で一晩乾燥させた．その後60 $^{\circ}$ Cで30～60分間かけてパラフィンを溶解させた後，脱パラフィン，脱キシレン操作を加えた．ついで内因性ペルオキシダーゼを除去するため，0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えたメタノールに20分間浸漬した．これを0.01M sodium phosphate buffered

表1 使用した組織

組 織	個 数	妊娠週(日)数, ほか
子宮内妊娠部(マウス)	2	妊娠5日目
左卵管膨大部(ヒト)	3	妊娠7週5日, 8週0日, 8週4日
右卵管膨大部( " )	2	妊娠7週6日, 8週2日
左卵管峽部( " )	1	妊娠8週0日
子宮内妊娠部( " )	1	妊娠5週2日(子宮筋腫合併)
子宮内膜( " )	1	月経周期第9日目(子宮筋腫合併)

表2 子宮内膜組織培養法

- |   |
|---|
| ① 組織片洗淨：Ham's F12 medium (HFM), 2回                                      |
| ② 組織片細切   |
| ③ 遠心洗淨：HFM, 1回  |
| ④ 酵素処理：0.25% collagenase/5% fetal calf serum(FCS)加 HFM, 37°C 2時間        |
| ⑤ 未消化組織除去：milliporefilter(φ250μ)  |
| ⑥ 遠心洗淨：20% FCS加 HFM, 1回   |
| ⑦ final cell suspension 作製：1.0×10 <sup>5</sup> cell/ml(10% FCS加 HFM)に調整 |
| ⑧ 培養開始：Lab-Tak chamber(各1ml ずつ)<br>37°C, 95%air-5%CO <sub>2</sub> 下     |
| ⑨ 培養液交換：48時間ごと  |
| ⑩ 牛胎児血清成分除去：培養5～6日目, HFM, 4回洗淨  |
| ⑪ 培養：HFM, 24時間  |

saline (PBS)で洗淨後, 1次抗体と湿室中で30分間反応させてPBSで洗淨した。さらに2次抗体 (horseradish peroxidase conjugated goat IgG fraction anti-rabbit IgG) と湿室中で30分間反応させ, PBSで洗淨後, 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加, 0.005% 3, 3'-diaminobenzidine 4HCl 加, 0.05M Tris HCl Buffer, pH 7.6溶液と室温にて7分間反応させた。最後にヘマトキシリンで核染色し, 脱水・封入した。

培養細胞の場合は, スライドガラス上の細胞をそのまま10%ホルマリン溶液に60分間浸漬し固定した。その後水道水で洗淨したのち, 内因性ペルオキシダーゼを除去するため0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えたメタノール中で5分間反応させた。以後の操作は前述のパラフィン切片の場合と同じである。

### 実験成績

#### I. 対照試験

1次抗体の代わりにPBSを用いて染色した。

マウス初期胚着床部, マウス子宮内膜, ヒト卵管妊娠着床部, ヒト子宮内妊娠着床部, ヒト卵管内膜および子宮内膜, ヒト子宮内膜培養細胞の染色はすべて陰性を示し, 2次抗体による非特異的染色は存在しないことが証明された。

#### II. 染色結果

陽性所見は以下の通りであった。

##### 1) マウス初期胚着床部

マウス初期胚の構造は中央部に内細胞塊(ICM), その周囲にblastocoeleがあり, さらにその外周に内側より順にdistal endoderm (De),

Reichert's membrane (Rm), trophoblast giant cells (Tr) が位置している。Trは脱落膜内に侵入・増殖している(写真1)。

① FN: TrとICMの細胞質に陽性染色された(写真2)。

② XIII<sub>s</sub>: Trの細胞質に陽性染色された(写真3)。

③ LM: DeとRmに陽性染色された。

④ C<sub>IV</sub>: 子宮内膜上皮細胞とその基底膜および間質部に陽性染色された(写真4)。

##### 2) ヒト初期妊娠着床部

卵管妊娠着床部と子宮内妊娠着床部の染色結果は同じであった。

##### <絨毛>

① C<sub>IV</sub>: 対照に比し, syncytiotrophoblastの表面に鋸歯状に陽性染色された(写真5)。

② FN: 絨毛間質部に弱く陽性染色された。

③ XIII<sub>A</sub>: 絨毛間質部の大型単核細胞に強く陽性染色された(写真6)。

##### <子宮又は卵管内膜>脱落膜化の弱い部位

① FN: 内膜間質部にびまん性に陽性染色された(写真7)。

② XIII<sub>A</sub>: 内膜間質部の紡錘形の細胞に陽性染色された(写真8)。

<子宮又は卵管内膜>脱落膜化の強い部位 (trophoblastic cellsの侵入もみられる)

① C<sub>IV</sub>およびFN: 内膜間質部に陽性染色された(写真9, 写真10)。

② XIII<sub>A</sub>: 間質部の類円形単核細胞に散在性に

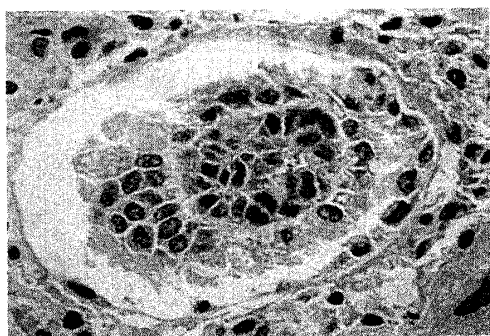


写真1 マウス初期胚着床部, ×200  
(撮影倍率, 以下同) HE 染色

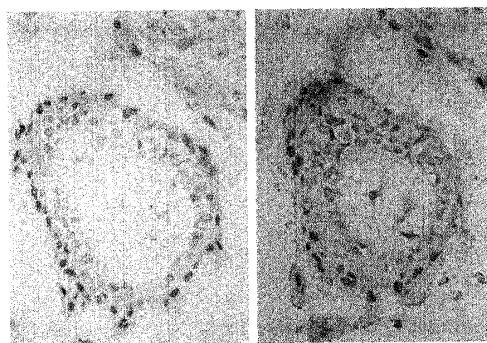


写真5 ヒト初期絨毛, ×40  
(左) 対照, (右) type IV collagen 染色

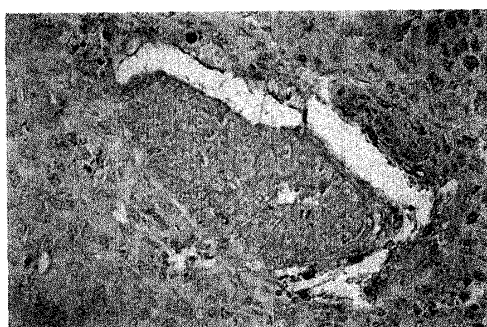


写真2 マウス初期胚着床部, ×100  
fibronectin 染色

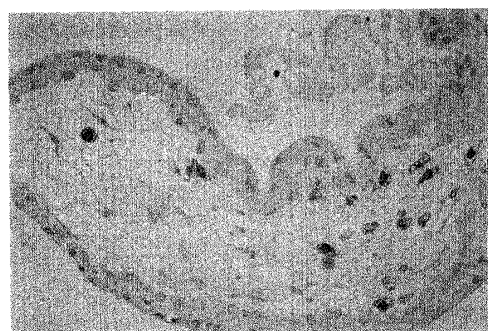


写真6 ヒト初期絨毛, ×40  
XIII<sub>A</sub> 染色

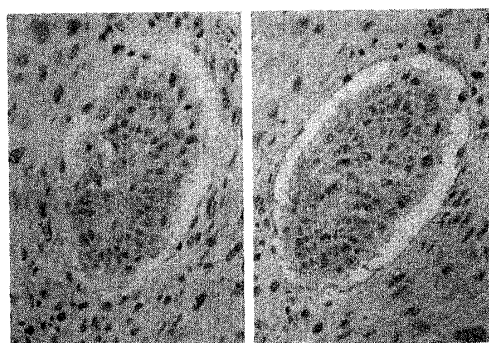


写真3 マウス初期胚着床部, ×100  
(左) 対照, (右) XIII<sub>S</sub> 染色

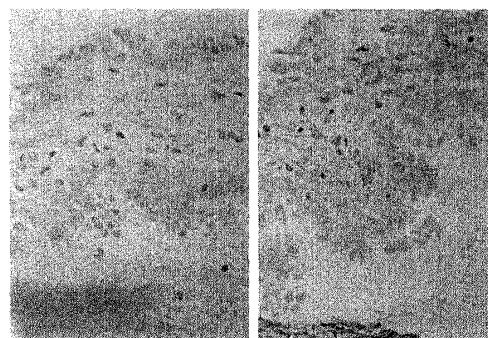


写真7 ヒト卵管内膜, ×40  
(左) 対照, (右) fibronectin 染色

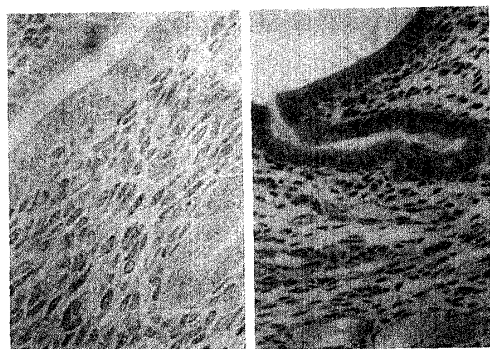


写真4 マウス子宮内膜, ×100  
(左) 対照, (右) type IV collagen 染色

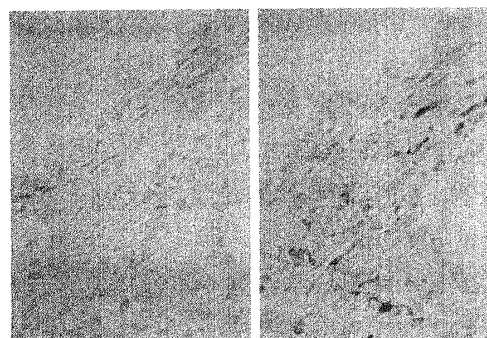


写真8 ヒト子宮内膜, ×40  
(左) 対照, (右) XIII<sub>A</sub> 染色

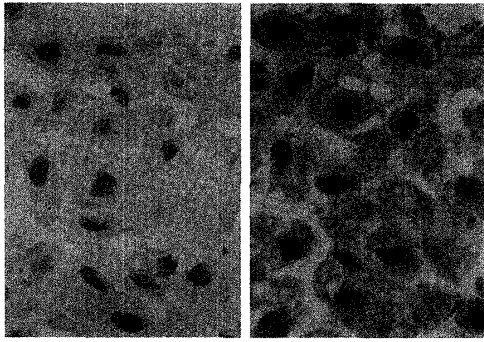


写真9 ヒト卵管内膜, ×200  
(左) 对照, (右) type IV collagen 染色

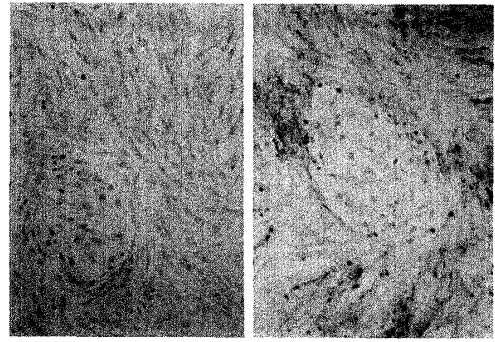


写真12 ヒト子宮内膜培養細胞, ×20  
(左) 对照, (右) fibronectin 染色

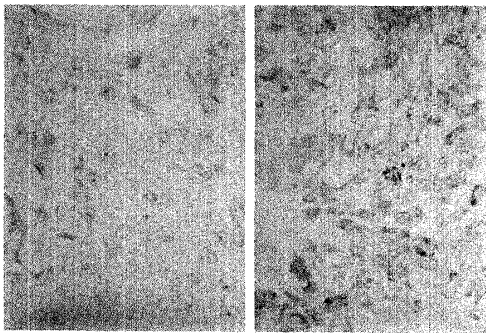


写真10 ヒト卵管内膜, ×40  
(左) 对照, (右) fibronectin 染色

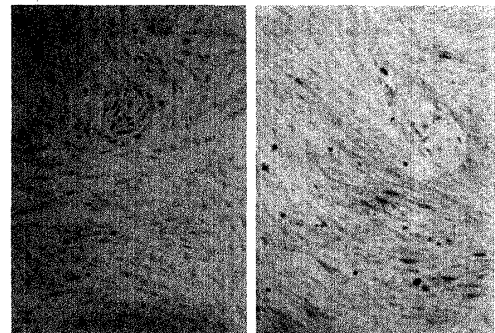


写真13 ヒト子宮内膜培養細胞, ×20  
(左) 对照, (右) XIII<sub>A</sub>染色

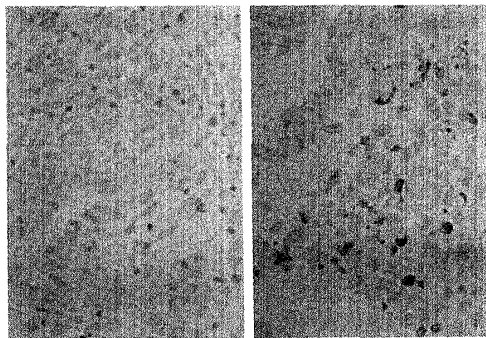


写真11 ヒト子宮内膜, ×40  
(左) 对照, (右) XIII<sub>A</sub>染色

陽性染色された(写真11).

### 3) 子宮内膜培養細胞

① FN: 間質細胞にびまん性に強く陽性染色された(写真12).

② XIII<sub>A</sub>: 間質細胞に強く陽性染色された(写真13).

腺管構造を形成している内膜上皮様細胞の染色はFN, XIII<sub>A</sub>両者とも陰性であった。

以上の結果をまとめると表3, 表4のごとくなる。

## 考 察

FNは, ヒトの血漿や種々の組織の基底膜および間質結合織に存在する高分子糖蛋白である。そして細胞の接着・伸展・移動・分化・増殖・食作用等に広く関与すると考えられている。構造的には2量体(血漿型)もしくは多量体(組織型)で, 一つのmonomer内にfibrin, collagen, XIII<sub>A</sub>, actin等との結合部位をそれぞれ別個に有している<sup>6)7)</sup>。

LMは基底膜に存在する高分子糖蛋白で<sup>12)</sup>, 上皮細胞とC<sub>IV</sub>を接着させる働きがある<sup>11)</sup>。

collagenは細胞外matrixを構成する代表的な蛋白質である。その中でも上皮細胞あるいは内皮細胞で合成されるC<sub>IV</sub>は, 組織の基底膜に広く分布している<sup>10)14)</sup>。

XIII因子は血液凝固の最終段階に働くtransglutaminaseで, 血漿中や血小板, 胎盤に存在する。

表3 マウス初期胚着床部の染色結果

Proteins	Blastocyst			Endometrium	
	ICM	Rm	Tr	Epithelium	Stroma
FN	++	-	+	-	+
C <sub>IV</sub>	-	-	-	++	+
LM	-	++	-	-	-
XIII <sub>A</sub>	unknown			unknown	
XIII <sub>S</sub>	-	-	+	-	-

ICM: inner cell mass Rm: Reichert's membrane  
Tr: Trophoblast giant cells

表4 ヒト初期胚着床部の染色結果

Proteins	Fetal Side (Villi)		Maternal Side (Endometrium)	
	Syncytium	Stroma	Epithelium	Stroma
FN	-	+	-	++
C <sub>IV</sub>	++	+	unknown	+
LM	-	-	-	-
XIII <sub>A</sub>	-	+++	-	+++
XIII <sub>S</sub>	-	-	-	unknown

血漿型 XIII 因子は活性中心を含む XIII<sub>A</sub> の 2 本鎖と carrier protein である XIII<sub>S</sub> の 2 本鎖よりなるが、血小板型あるいは胎盤型 XIII 因子は XIII<sub>A</sub> のみの 2 本鎖よりなっている<sup>5)</sup>。XIII 因子は fibrin monomer の重合時に、 $\gamma$ - $\gamma$  鎖間や  $\alpha$ - $\alpha$  鎖間に Gly-Lys 結合の橋をつくりその結合をさらに強固にする作用を持つ。この作用は fibrin-fibrin 間だけでなく、fibrin-FN 間や FN-collagen 間にも同様に働く<sup>9)</sup>。

これらの接着性物質と着床との関係については、Wartiovaara et al. (1979) や Leivo et al. (1980) がマウス初期胚着床部における FN あるいは C<sub>IV</sub> の局在を<sup>8)13)</sup>、京戸ら (1986) や石川ら (1988) がヒト初期妊娠着床部における fibrinogen, FN, XIII 因子の局在を報告している<sup>3)4)</sup>。しかしいずれも接着機構の解明には至っていない。

本研究においては、まず着床直後の状態をマウスを用いて観察した。その結果 Tr に FN と XIII<sub>S</sub> の局在を、子宮内膜上皮細胞と間質部に C<sub>IV</sub> の局

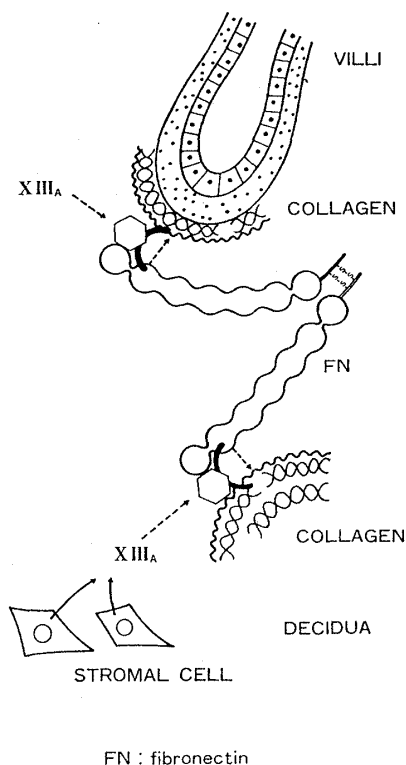


図1 ヒト初期妊娠における接着機構

在を認めた。

しかし着床形態は動物種により相違がみられるため、次にヒト初期妊娠着床部における該物質を検索した。その結果絨毛表面に C<sub>IV</sub>、子宮又は卵管内膜間質部に C<sub>IV</sub>、FN、XIII<sub>A</sub> の局在を認めた。また絨毛間質部には FN、C<sub>IV</sub>、XIII<sub>A</sub> の局在を認めた。

一方培養細胞染色の結果より、FN と XIII<sub>A</sub> は子宮内膜間質細胞で産生されることが判明した。

以上より次の3点が示唆された。

① マウス初期胚の接着機構：マウスにおいて着床直前の初期胚の表面に FN が存在していると思われる。その FN が子宮内膜上皮の C<sub>IV</sub> と結合し着床が開始する。着床が進行し Tr が子宮内膜間質部に侵入した後は、その表面の FN は間質部の C<sub>IV</sub> と結合する。

また Tr 表面には XIII 因子も存在し、これが FN-C<sub>IV</sub> 間に架橋しその結合をさらに強固なものにしている。

② ヒト初期妊娠における接着機構：ヒト初期妊娠着床部においては子宮内膜間質部の FN が、



絨毛表面の  $C_{IV}$  と子宮内膜間質部の  $C_{IV}$  に架橋的に結合しているものと思われる。

またこの部位には血漿あるいは子宮内膜間質細胞由来の  $XIII_A$  が存在し、これが FN- $C_{IV}$  間に架橋しその結合をさらに強固なものにしている (図 1)。

一方、京戸らにより子宮内膜間質部における fibrinogen もしくは fibrin の局在も報告されている<sup>4)</sup>が、これらがさらに FN と結合し接着をより強くしているものと思われる。

③ 絨毛間質部に局在する FN,  $C_{IV}$ ,  $XIII_A$  は接着現象とは直接関係しないようである。

以上、本研究によりヒト初期胚—子宮内膜間の接着において、胚の  $C_{IV}$  と母体の FN,  $C_{IV}$ ,  $XIII_A$  および fibrin の重要性が強く示唆された。

先天性第 XIII 因子欠損症や先天性無フィブリノゲン血症では、母体が健常で胎児が患者の時はその胎児は流産されることなく妊娠は維持されるが、反対に母体が患者で健常な胎児を宿した時は補充療法なしでは妊娠は維持されず流産してしまう<sup>12)</sup>ことが知られている。われわれの結論はこれらの臨床結果ともよく一致した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました川島吉良教授 (浜松医科大学産科婦人科) に心より感謝いたします。また直接御指導いただいた京戸 裕博士 (同産科婦人科)、芹澤 治教務員 (同付属動物実験施設)、内藤恭久助手 (同病理学第一講座)、鈴木則夫技官 (同形態系共同実験室)、および産科婦人科、動物実験施設、病理学第一講座、形態系共同実験室、フォトセンターの各位に厚く御礼申し上げます。

なお本論文の一部は第34回日本不妊学会学術講演会において発表した。

#### 文 献

1. 青木 茂, 山下美和, 小林隆夫, 寺尾俊彦, 川島吉良: XIII 因子製剤を投与し正常経膈分娩に成功した先天性 XIII 因子欠損症患者の 1 例. 日産婦関東連会報, 48: 148, 1988.

2. 稲本 裕, 寺尾俊彦: Congenital afibrinogenemia の分娩. 産婦の実際, 34: 703, 1985.
3. 石川真木, 三橋直樹, 水野正彦: 子宮内膜・脱落膜の FXIII 陽性細胞. 日不妊会誌, 33: 1030, 1988.
4. 京戸 裕, 小林隆夫, 寺尾俊彦: 胎盤における凝固線溶物質, 特に placental plasminogen activator (PPA) の局在に関する免疫組織化学的研究. 日産婦誌, 38: 10, 1986.
5. Folk, J.E.: Transglutaminases. Ann. Rev. Biochem., 49: 517, 1980.
6. Hayashi, M. and Yamada, K.M.: Domain structure of the carboxyl-terminal half of human plasma fibronectin. J. Biol. Chem., 258: 3332, 1983.
7. Keski-Oja, J. and Yamada, K.M.: Isolation of an actin-binding fragment of fibronectin. Biochem. J., 193: 615, 1981.
8. Leivo, I., Vaheri, A., Timpl, R. and Wartiovaara, J.: Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. Dev. Biol., 76: 100, 1980.
9. Mosher, D.F., Schad, P.E. and Kleinman, H. K.: Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation factor XIII<sub>a</sub>. J. Clin. Invest., 64: 781, 1979.
10. Roll, F.J., Madri, J.A., Albert, J. and Furthmayr, H.: Codistribution of collagen type IV and AB<sub>2</sub> in basement membranes and mesangium of the kidney. J. Cell Biol., 85: 597, 1980.
11. Terranova, V.P., Rohrbach, D.H. and Martin, G.R.: Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. Cell, 22: 719, 1980.
12. Timpl, R. and Rohde, H.: Laminin-A glycoprotein from basement membranes. J. Biol. Chem., 254: 9933, 1979.
13. Wartiovaara, J., Leivo, I. and Vaheri, A.: Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. Dev. Biol., 69: 247, 1979.
14. Yaoita, H., Foidart, J.M. and Katz, S.I.: Localization of the collagenous component in skin basement membrane. J. Invest. Dermatol., 70: 191, 1978.

(No. 6789 平 2・4・9 受付)