

組織培養実験による子宮内膜の CA125 産生能に関する研究 —正所内膜および異所内膜における比較—

浜松医科大学産科婦人科学教室 (主任: 川島吉良教授)

小 林 浩

A Study on the Production of CA125 Antigen Using Tissue Culture of Eutopic and Heterotopic Endometrium

Hiroshi KOBAYASHI

Department of Obstetrics and Gynecology,

Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu

(Director : Prof. Yoshiro Kawashima)

概要 子宮内膜組織の48時間培養実験を行い、正所子宮内膜組織 (正所内膜) と子宮腺筋症由来異所子宮内膜組織 (異所内膜) の CA125 産生能および E_2 , P_4 , MPA に対する反応性を検討し、以下の成績が得られた。

1. 正所内膜の培養前組織内 CA125 濃度は増殖期に最高値を示し、性周期に伴い徐々に低下し分泌期後期に再度上昇傾向を示した。また、培養後組織内濃度は培養前濃度より低値を示したが、培養液中 CA125 濃度 (CA125 産生能) は増殖期に高く分泌期に低値を示した。

2. 異所内膜の培養前組織内 CA125 濃度は性周期による変化は認めがたく、また、CA125 産生能は増殖期に高値を示したが、分泌期でも CA125 産生能は比較的保持されていた。

3. 正所および異所内膜の増殖期と分泌期の子宮内膜培養系に cycloheximide を添加すると、両者において培養液中 CA125 濃度と培養後組織内濃度のいずれも有意に低下し、CA125 産生は抑制された。

4. 正所および異所内膜培養系に P_4 と MPA をそれぞれ添加した時の CA125 産生能は P_4 添加による影響は統計学上認められなかったが、MPA 添加により有意に低下した。また、MPA 添加による CA125 産生抑制は E_2 の同時添加により回復した。

子宮内膜の短期培養実験の結果、 E_2 優位の増殖期子宮内膜ほど CA125 産生能は亢進し分泌期に移行するにしたがつてその産生能は低下した。しかし、異所内膜からは分泌期でも比較的積極的な CA125 産生能を認めたことより、子宮腺筋症で高 CA125 血症を呈する原因の一つは、異所内膜の量的増加のみならず、その細胞当たりの CA125 産生能亢進も関与していることが示唆された。

Synopsis The possibility of the endometrial production of CA125 and the effect of P_4 , MPA, and E_2 were investigated using tissue cultures of eutopic endometrium (uterine endometrium obtained from uterine myoma) and heterotopic endometrium (uterine myometrium obtained from adenomyosis). CA125 was detected in eutopic endometrium before culture, its concentration being significantly higher in tissues obtained during the early proliferative phases than in those obtained during the early secretion. On the other hand, no significant changes in the tissue concentrations of CA125 before culture were found in heterotopic endometrium during a menstrual cycle. In the heterotopic endometrium, in the production of CA125 in the medium was higher than that in the eutopic one. The data on CA125 in the culture medium also indicated that the production was significantly higher during the proliferative phases than during secretion.

Cycloheximide significantly decreased the concentrations of CA125 in the medium and in tissues of the eutopic and heterotopic endometrium.

The production of CA125 was not affected by the addition of P_4 , but MPA significantly inhibited the in-vitro production of CA125, which could no longer be observed when E_2 was simultaneously added to the medium.

These results indicated that not only the eutopic but also the heterotopic endometrium could produce CA125, and this ability seems to be more marked in the heterotopic than that in the eutopic endometrium,

especially during the secretory phases.

This study demonstrated one of the causes of increased serum CA125 in patients with adenomyosis.

Key words: CA125 • Endometrium • Adenomyosis • Tissue culture

緒 言

非粘液性卵巣癌に対する腫瘍マーカーとしての CA125[®]が子宮内膜症の客観的パラメータとして利用し得ることが報告されて以来、日常臨床の場で広く使用されている¹⁾。臨床的には子宮腺筋症組織中、腹水中および末梢血液で CA125濃度が高値を示すため正所および子宮腺筋症の異所内膜より積極的に分泌されている可能性が示された²⁾が、組織内濃度が高くても CA125が単に蓄積されているだけなのか、積極的に産生分泌が行われているのかは不明確であった。そこで今回は、子宮内膜組織の組織培養実験を行い正所および異所内膜における CA125の産生能および E₂, P₄, MPA に対する反応性を検討した。

実験材料および方法

正所子宮内膜組織（正所内膜）は子宮筋腫患者の手術時に摘出した子宮内膜組織を無菌的に採取した。この正所内膜には子宮内膜腺管上皮細胞と間質細胞が含まれている。また、異所子宮内膜組織（異所内膜）は子宮腺筋症患者の根治手術時に摘出した子宮筋層を用いその一部は病理組織学的検索を行い子宮腺筋症の存在を確認した。異所内膜には異所子宮内膜腺管上皮細胞、間質細胞および子宮筋層が含まれている。すべての組織は正所子宮内膜組織による子宮内膜日付診を行い増殖期と分泌期をそれぞれ前、中、後期の6群に分類した。今回の異所内膜は子宮腺筋症についてのみ実験しており、外性子宮内膜症については検討していない。

組織培養は Bischof, P. et al.⁷⁾の方法に準じて手術的に摘出した組織を無菌操作下にハサミで細切し、培養液（RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum, 0.2 IU/ml insulin, 100 IU/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin）で数回洗浄した後、37℃, 5%CO₂ 95%O₂下、組織培養に供した。

組織片を実体顕微鏡下で観察すると、正所内膜組織片の大きさはそのほとんどが0.5から0.9mm

にあり、一方、異所内膜組織片は0.8から1.2mmの大きさであった。

組織培養の際は500mgの組織片に2.0mlの培養液を加えて実験を開始した。基礎実験として増殖期中期正所子宮内膜組織を用いて以下のごとく行つた。すなわち、培養開始24, 48, 72, および96時間後の培養液中 CA125濃度を測定すると、それぞれ、1,010, 1,450, 1,840, および1,980U/mlであり、各24時間ごとの増加率は1,010, 440, 390, および140U/ml/24hとなり、培養後24から72時間までが比較的安定した CA125産生を示した。したがって、本実験では培養開始24から72時間までの48時間培養における CA125増加量をその指標にした。また、本実験では培養液に10%fetal calf serumを加えてあるので培養液中 CA125濃度を U/mg protein で表現するのは不適当と考え、U/g wet weight で統一した。

添加薬剤は cycloheximide (Sigma 社; 最終濃度100 μg/ml, なお, cycloheximide による CA125 測定への影響は Bischof, P. et al. の実験と同じ方法で行つたので無視し得るものと考えられる), estradiol-17β (E₂; 0.1 μmol/l), progesterone (P₄; 1.0 μmol/l), medroxyprogesterone acetate (MPA; 1.0 μmol/l)を用いた。薬剤添加実験の場合は24時間の preincubation の後に培養液を交換し、さらに48時間培養を行つた。

CA125測定はセントコア社製 RIA キットによる immunoradiometric assay により行つた。組織内濃度は5倍量の生理的食塩水を加え、ポリトロンでホモジナイズした後10,000×g 30分遠心により得られた上清を用いて測定した。

なお、今回用いた有意差検定の方法はカイ2乗検定である。

実験成績

1. 正所内膜および異所内膜における培養前組織内 CA125濃度、培養後培養液中濃度および培養後組織内濃度

正所内膜の培養前組織内 CA125濃度は増殖期

表 1 CA125 production in tissue culture of eutopic endometrium

Tissue samples		n	before culture	after culture	
			in tissue	in medium	in tissue
Proliferative phase	early	6	2,164±921 ^{a*}	3,126±1,063	241±180
	mid	7	721±320 ^b	1,141±321	214±120
	late	3	126±95 ^c	362±128	103±96
Secretory phase	early	2	154±42 ^c	415±89	96±13
	mid	4	315±102 ^c	265±182	114±180
	late	6	473±143 ^c	30±41	21±30

Tissue was minced, washed and incubated at 37°C for 48h in medium RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum, 0.2 IU/ml insulin, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

*Mean±SD, U/g wet weight

^b: p<0.01 compared with a

^c: p<0.001 compared with a

表 2 CA125 production in tissue culture of heterotopic endometrium

Tissue samples		n	before culture	after culture	
			in tissue	in medium	in tissue
Proliferative phase	early	10	1,672±810*	4,964±1,100	128±43
	mid	5	1,215±135	4,196±1,621	356±185
	late	10	940±312	2,810±920	123±106
Secretory phase	early	5	1,289±432	2,620±1,100	221±123
	mid	5	2,635±476	1,845±1,164	316±93
	late	10	1,063±279	862±165	102±41

*Mean±SD, U/g wet weight

表 3 The effect of cycloheximide on the production of CA125

Proliferative phase endometrium	group	n	before culture	after culture	
			in tissue	in medium	in tissue
Medium only	A	6	2,164±921	3,126±1,063	241±180
	B	10	1,672±810	4,964±1,100	128±43
Medium+ Cycloheximide (100 µg/ml)	A	6	2,164±921	520±128 ^a	32±46 ^b
	B	10	1,672±810	264±327 ^a	10±21 ^a

Tissue samples were obtained from endometrium at early proliferative phase.

The concentration of cycloheximide was 100 µg/ml.

Group A means the eutopic endometrium

Group B means the heterotopic endometrium

^a: p<0.001 compared with control

^b: p<0.05 compared with control

前期に最高値を示し、性周期に伴い徐々に低下し、分泌期後期に再度上昇傾向を示した。また、培養後組織内 CA125濃度は培養前濃度より低値を示した。一方、培養液中 CA125濃度 (CA125産生能と考えられる) は増殖期に高く分泌期に低値を示

した (表 1)。

次に、異所内膜の培養前組織内 CA125濃度は性周期による変化は認めがたく、また、CA125産生能は正所内膜と同様に増殖期に高値を示したが、分泌期でも CA125産生能は正所内膜と異なり比

表4 The effect of cycloheximide on the production of CA125

Secretory phase endometrium	group	n	before culture	after culture	
			in tissue	in medium	in tissue
Medium only	A	6	473±143	30±41	21±30
	B	10	1,063±279	862±165	102±41
Medium+ Cycloheximide (100 µg/ml)	A	6	473±143	—*	—*
	B	10	1,063±279	30±21 ^a	25±16 ^a

Tissue samples were obtained from endometrium at late secretory phase.

Group A means the eutopic endometrium

Group B means the heterotopic endometrium

*not detectable

表5 The effects of various hormonal treatments on the production of CA125

Tissue samples	group	n	the concentrations of CA125 in medium				
			Control	P ₄	MPA	P ₄ +E ₂	MPA+E ₂
Early proliferative	A	6	3,126±1,063	2,612±1,114	2,169±707 ^a	3,062±920	3,211±618
	B	10	4,964±1,100	4,268±832	3,151±465 ^b	4,852±906	3,864±605
Late secretory	A	6	30±41	—	—	28±18	31±25
	B	10	862±165	803±210	265±43 ^c	905±161	1,061±301

The final concentration of P₄ (Progesterone), MPA (Medroxy progesterone acetate) and E₂ (Estradiol-17β) was 1.0, 1.0, and 0.1 µmol/l, respectively.

Footnotes as in previous Table.

^a: p<0.1 compared with control

^b: p<0.01 compared with control

^c: p<0.001 compared with control

較的保持されていた(表2)。

2. CA125産生能に対する cycloheximide の影響

増殖期子宮内膜(正所内膜と異所内膜の両方)の培養系に cycloheximide を添加すると、培養液中 CA125濃度と培養後組織内濃度のいずれも有意に低下し、CA125産生能は抑制された(p<0.001あるいはp<0.05)。分泌期子宮内膜でも同様に cycloheximide 添加により CA125産生は抑制された(p<0.001)(表3, 4)。

3. CA125産生に対する P₄, MPA, E₂の影響

正所および異所内膜培養液中に P₄と MPA をそれぞれ添加した時の CA125産生能は P₄添加による影響は統計学上認められなかったが、MPA 添加により有意に低下した(正所内膜: p<0.1, 異所内膜: p<0.01あるいはp<0.001)。また、MPA 添加による CA125産生抑制は E₂の同時添加により回復した(表5)。

考 案

CA125はモノクローナル抗体 OC125によつて認識される抗原であり、卵巣癌の血清腫瘍マーカーとして日常臨床で頻用されている¹⁰⁾。しかし、CA125は癌感受性が高い反面癌特異性が低く、子宮内膜症、妊娠初期、卵巣過剰刺激症候群、急性腹膜炎のような良性疾患でも高値を示すことが知られている¹¹²⁾。最近ではこの性質を利用して子宮内膜症の客観的血清学的診断に利用されている⁵⁾。子宮内膜症で血中 CA125値が上昇する原因の一つは、異所子宮内膜細胞が正所子宮内膜細胞に比較して CA125産生能が高く、また、量的に増加していることによると推察される。しかし、異所子宮内膜組織内 CA125濃度が高値を示しても、それが CA125の産生分泌亢進によるものか、ただ単に蓄積されているだけなのかは組織内濃度測定のみからでは判然としない。

そこで今回、正所および異所子宮内膜組織の組

組織培養実験を行い in-vitro 培養系で CA125 産生能に関して検討した。今回実験に用いた子宮内膜組織は、正所内膜組織には正所内膜腺管上皮細胞と間質細胞が、また、異所内膜組織には異所内膜腺管上皮細胞、間質細胞のみならず、子宮平滑筋細胞も含まれている。子宮内膜症はそのほとんどが子宮内膜腺管上皮細胞と間質細胞を伴っているためそれぞれ独自の単層培養細胞より、生理的狀態に近い結果が得られるものと思われる。また、子宮平滑筋細胞には CA125 の局在を認めないことより、本実験系に及ぼす影響も少ないであろう。

Bischof, P. et al.⁷⁾ が報告した脱落膜組織の組織培養実験と間質細胞の単層培養実験の結果、間質細胞からは脱落膜化に関係なく CA125 産生能を有していることが証明された。

われわれも同様の方法で正所および異所内膜の CA125 産生能の差を検討した。

基礎実験で培養開始24時間の培養液中 CA125 濃度がそれ以降にくらべて極めて高値を示した事実は、CA125 の non-specific release や wash out mechanism を示唆するが、それ以降72時間までは安定した CA125 産生を認めた。したがって、培養前組織内濃度は必ずしも正確に組織内濃度を反映せず子宮内膜腺腔内に蓄積した CA125 も測定しているものと思われた。そこで培養開始24から72時間の48時間は培養液中への CA125 の分泌率がほぼ一定であるため、われわれはこの48時間における培養液中濃度を産生能と考えた。

その結果、従来の報告のごとく²⁾ 正所内膜では組織内 CA125 含有量は増殖期に高く、性周期に伴って減少し、分泌期後期に再度上昇傾向を示した。また、培養液中への CA125 分泌量は増殖期に高く分泌期に低く、いずれも cycloheximide で CA125 産生は抑制されるので、正所内膜から積極的に CA125 が産生されていることが示唆された。しかし、Bischof, P. et al. が述べているように、cycloheximide により CA125 の glycosylation が抑制され抗原性が消失した可能性は否定できない⁷⁾ が、最近の論文⁸⁾ では各種 glycosidase 処理にても CA125 の抗原性はあまり変化しないと報告されており、OC125 は蛋白部分を認識する抗体で

あると推定されるので glycosylation はあまり関与しないと思われる。一方、異所内膜の組織内 CA125 濃度は正所内膜とは異なり性周期を通じて著明な変化は認められなかつた。その理由としては、検体の採取する場所により異所内膜細胞の量的相違を認めた可能性と子宮内膜日付診が正所内膜と同調しないことなどが考えられる。しかし、正所内膜と同様に CA125 産生能は増殖期に高く分泌期には低下したが、分泌期の異所内膜の CA125 産生能は正所内膜より亢進していた。

また、Ozasa, H. et al.⁹⁾ によれば子宮内膜症患者に P₄-in-oil 125mg を筋注することにより30時間後には血中 CA125 値が有意に上昇し、これは P₄-receptor を介する上昇であると報告している。しかし、われわれの P₄ 添加48時間子宮内膜組織培養実験では正所と異所内膜の両者において CA125 産生能はコントロールと比較して有意差は認められず、Ozasa, H. et al. の成績とは異なつた。

また、MPA 添加では明らかに CA125 産生能が抑制され、E₂ 同時添加により回復しており Bischof, P. et al. の間質細胞を用いた単層培養系とほぼ同様な成績が得られた。MPA の乳癌や子宮内膜癌に対する抗腫瘍効果の作用機序については、① estrogen の estrogen receptor への結合との拮抗、②下垂体を介しての各種ホルモン分泌の抑制、③癌細胞の核酸合成の直接の抑制効果が知られているが、今回の in vitro の系では②は無視し得る。また、progesterone は progesterone receptor を介して内膜細胞に作用し、核 DNA の合成を低下させ増殖を抑制させるが、MPA は高容量 (10⁻⁵mol) で直接細胞障害作用を有する。したがって、正常子宮内膜細胞に対しても同様の機序が作用すれば内膜細胞より産生、分泌される CA125 が MPA 投与の方が progesterone 投与より低下するのは、MPA が内膜細胞に対し直接に cytotoxic に作用したためと考えられる。ただし、本実験では progesterone 投与でも CA125 産生は低下傾向にあるがコントロールと比較して有意差は認めなかつた。やはり、正所内膜と異所内膜のいずれにおいても細胞増殖のさかんな時期に

CA125産生能亢進を認めるようである。また、血中 CA125値が上昇する機序としては大久保⁴⁾が述べているように、卵巣癌細胞のように細胞当たりの CA125産生能が亢進し、産生細胞数の増加を認める場合や、完全流産や月経期のように tissue barrier の破綻による CA125の循環血中への遊離あるいは放出による場合が考えられる。

健常非妊娠婦人の場合は増殖期と分泌期とで末梢血中 CA125値に変化を認めず E₂優位で細胞増殖がさかんな増殖期でも循環血液中で CA125が上昇しない¹⁾。ところが、月経期になると末梢血中 CA125値が上昇するのは子宮内膜組織の剥脱により barrier が破綻し循環血中に CA125が流入していくものと考えられる。

一方、子宮内膜症の場合は局所の barrier の破綻がおこつたり、さらに、異所内膜の量的質的增加が重なつて高 CA125血症をおこすものと考えられた。しかし、子宮内膜症患者における P₄投与による in-vivo と in-vitro の解離の理由は不明であるが、本実験の性質上すでに培養系では barrier の破綻がおこっているため培養液中への分泌と患者末梢血中へ CA125が分泌されることとは同一視できない。

今後は正所および異所子宮内膜腺管上皮細胞と間質細胞の細胞培養を別々に行い³⁾CA125産生能について検討していく予定である。

文 献

1. 小林 浩, 金山尚裕, 早田 隆, 川島吉良: 子宮内膜症の診断・治療における血清 CA125 値測定の有用性. 日産婦誌, 39: 1054, 1987.
2. 小林 浩, 三宅若葉, 山下美和, 金山尚裕, 早田 隆, 川島吉良: 子宮内膜症における血中 CA125 上昇機序に関する臨床的考察. 日産婦誌, 40: 467, 1988.
3. 三宅若葉, 金山尚裕, 小林 浩, 早田 隆, 川島吉良, 内藤恭久, 堀内健太郎: 子宮腺筋症腺管上皮における CA125 の染色態度. エンドメトリオーシス研究会会誌, 8: 84, 1987.
4. 大久保喜彦: 女性生殖器および胎児付属物における CA 125 の局在. 日大医学雑誌, 46: 2001, 1987.
5. 高橋健太郎, 木島 聡, 吉野和男, 渋川敏彦, 森山政司, 岩成 治, 沢田康治, 松永 功, 村尾文規, 北尾 学: 新しい腫瘍マーカーCA125を利用した子宮平滑筋腫と子宮腺筋症の鑑別. 日産婦誌, 37: 591, 1985.
6. Bast, R.C., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L. M., Colvin, R.B. and Knapp, R.C.: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. J. Clin. Invest., 68: 1331, 1981.
7. Bischof, P., Tseng, L., Brioschi, P.A. and Herrmann, W.L.: Cancer antigen CA 125 is produced by human endometrial stromal cells. Hum. Reprod., 1: 423, 1986.
8. Davis, H.M., Zurauski, V.R. Jr., Bast, R.C. and Klug, T.L.: Characterization of the CA 125 antigen associated with human epithelial ovarian carcinomas. Cancer Res., 46: 6143, 1986.
9. Ozasa, H., Noda, Y. and Mori, T.: Progesterone increase a serum CA 125 in endometriosis. Fertil. Steril., 47: 699, 1987.
10. Vergote, I.B., Bormer, O.P. and Abeler, V.M.: Evaluation of serum CA 125 levels in the monitoring of ovarian cancer. Am. J. Obstet. Gynecol., 157: 88, 1987.

(No. 6462 昭63・10・4 受付)