

ブタの生殖周期における雌生殖器官への好中球遊走と 肥満細胞の関連性の検討

雌豚の発情周期における副生殖器の組織学的変化に伴う 肥満細胞の動態に関する研究

Changes in the number of mast cells accompanying histological changes in accessory organs during estrus in sows

紫野正雄¹, 柏崎直巳¹, 市原伸恒², 浅利昌男²

¹麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室, ²麻布大学 獣医学部 解剖学第一研究室

Masao Shino¹, Naomi Kashiwazaki¹, Nobutsune Ichihara² and Masao Asari²

¹ Department of Theriogenology, Azabu University, ² Department of Anatomy I, Azabu University

Abstract. Specific changes, such as swelling and erythema of the external genitalia, take place in sows at the time of estrus. These changes are caused by estrogen. At the same time, progressive histological changes are also observed in the reproductive organs. In this study we focused on the changes in the distribution of mast cells (toluidine blue [TB] positive cells), which have various physiological functions and are related to the changes described

above. We used 17- β estradiol (E₂) to induce estrus in sows, and then examined the relationship between histological changes in the reproductive organs and mast cells. We administered E₂ to one-month- and six-month-old Landrace x Large White sows, and sampled tissue from the ovary, uterine horn, cervical canal, vagina, external genitalia and skin around the external genitalia on days 1, 2, 4, 6, 8 and 10 following administration. Histological changes in the reproductive organs and the distribution of mast cells were examined by means of the HE method and TB (metachromatic staining) method. The number of mast cells in tissue and around arteries/veins was counted.

With regard to histological changes in the accessory reproductive organs and skin surrounding the external genitalia, thickening of the mucosa, proliferation of epidermal cells, expansion of lamina propria mucosae, edema, and infiltration of neutrophils and lymphocytes were pronounced between day 2 and day 4. In the ovary, significant growth in the follicles was seen between day 4 and day 6. In all organ tissues, the distribution of mast cells increased between day 4 and day 6. In addition, a large number of mast cells were observed, particularly in the medulla of the ovary, the external genitalia and the dermis surrounding the external genitalia. As such, when E₂ was administered to immature sows, the reproductive organs showed progressive histological changes, and in particular, thickening of the mucosal tissue, edema, dilation of blood vessels, and infiltration of white blood cells were significant. The number of mast cells increased in response to these changes. These findings suggest that changes in the number of mast cells are closely related to E₂.

ブタは、畜産界ではウシと並んで重要な産業動物で、同時に生物学、医学の領域ではヒトの臓器と類似性があるために臓器移植や蛋白生産やホルモン物質生産のための代替動物やトランスジェニックブタ作出のための種々研究が進められている。そこでブタの効率的な繁殖生産を進めるためには生殖の仕組みを十分に熟知することが極めて重要である。特に、発情周期の排卵期前後に丁度、発情時期は特異的に生殖道腔に白血球（好中球）の遊走が激増する現象が認められる（1. 2. 3. 4）。しかし、この現象の要因や遊走の機序については十分に解明されていない。この事をさらに明らかにするためにケミカルメディアーターと深く関わる肥満細胞に注目した。既に、この細胞はヒスタミン、セロトニン、ヘパリンなどのアミン類を生成し、卵胞の排卵に関与して（5）、更に着床や妊娠に性ホルモンと相互関連をしている。また、外部生殖器の発情期の徴候として充血、腫脹反応は正しく類炎症性反応としてとらえられる。本研究では？？豚を対象とする理由は、発情期の外部生殖器の顕著な変化と子宮頸管粘液中の好中球の増加等の反応が性ステロイドホルモンの作用とされている。この実験系は、性ホルモンが発情周期の回帰に基質的に作用していない若齢豚を用いて発情期と発情休止期を17- β Estradiol と Progesterone 投与によって再現した。この時、外部生殖器徴候と組織学的並びに組織中肥満細胞の動態との関連を検索し、性ステロイドホルモンと肥満細胞との関連性を精査した。

材料方法：試供動物はLW雑種（生後1ヶ月齢）8頭、飼料は日本飼料給与基準に準じて給与した。投与薬品は17- β Estradiol（川崎製薬、エストラジ-オル0.5 mg/1ml）の含有、Progesterone（川崎製薬、オバプロンデポ1 mg/ml）動物薬を使用した。

1) 供豚はE₂群に17- β Estradiol（E₂と以下略す）投与を1頭当たり1.0 mg実量、P群はProgesterone投与（Pと以下略す）を1頭1 mg/体重kgを臀部筋肉内注射とした。E₂投与群、P投与群共に投与直前日と投与2日目、4日目、6日目、8日目、10日目の各日に外陰部腫脹、充血状況の観察をした。また、血液中E₂およびP濃度を測定するために内頸静脈から採血し、その後、3000 rpm15分冷却遠心し、血清は-20℃で冷凍保存後RIA法によって測定をした。生殖器の組織解剖学的観察は全ての器官を採取し、

その採取の時期はE₂投与直前からE₂投与直前日からE₂投与後10日目までの各々の時期に鎮静麻酔剤（ケタミン：三共（株）動物用ケタラール50、塩酸ケタミン57.6 mg/ml）を用いて鎮静麻酔をし、頸部切皮後に頸動脈を露出確保し、そこに血管用カニューレを挿入し、完全放血によってと体から生殖器を採取した。採集器官は、卵巣、副生殖器と外部生殖器並びにその周囲の皮膚組織とした。組織固定は、HE染色には10%中性緩衝ホルマリン固定、トルイジン染色には4%酢酸鉛固定で各々の器官を固定した。

組織染色方法は、組織固定標本は常法に準じてパラフィン包埋し、薄切後ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色施し、各器官の組織の変化を観察した。組織中の肥満細胞の確認は、0.05%トルイジンブルー染色（pH4.1以下TB染色と略す）で細胞内メタクロマジン-を観察するために染色を施し観察をした。この細胞の計測は、顕微鏡倍率を400倍として組織染色標本スライド上の50視野を検鏡し細胞数を算定した。

成績：

1) 臨床的所見（外陰部腫脹と充血感）E₂投与0日から2日目までは特に変化はなかったが、4日目と6日目に極めて強く認められ、8から10日目は全体的に弱く徴候は残存していた。

2) 血中E₂、P濃度の変化

E₂投与0日目に6.7 pg/ml、E₂投与後2日目17.2 pg/ml、同4日目4.8 pg/ml、同6日目3.1 pg/ml、同8日目7.8 pg/ml、同10日目2.3 pg/mlであった。E₂増減率で見るとE₂投与0日目を100%として、同2日目256.7%、さらに、同4、6、8、10日目の各々71.6%、55.2%、116.4%、34.3%であった。その傾向はE₂投与後4日目以降では顕著な増加傾向を見る事はなかった。

血中P濃度は、P投与前0.54 ng/mlで増減率100%とし、P投与後2日目0.2 ng/ml、4日目0.3 ng/ml、6日目0.3 ng/ml、8、10日目0.2 ng/ml P投与後2、4、6、8、10日目は各々増減率40%、60%、60%、40%、40%と減少した。

3) 組織学的観察所見

HE染色所見：E₂投与前の卵巣の組織所見は、皮質層に多数の原始卵胞群と1次、2次卵胞群が認めら

れた。髄質層には組織間隙の拡張や細胞浸潤、そして血管系の拡張や収縮的变化は特に認められなかった。子宮組織は、外層部の包膜やその下の組織間隙、筋層には細胞浸潤もない、粘膜層の増殖変化はなかった。子宮頸管組織は特に顕著な変化は認められなかった。

E₂投与2, 4日目の卵巣の組織所見は、皮質層には多数の原始卵胞群と1次, 2次と3次卵胞群が認められた。髄質層には組織間隙の拡張や細胞浸潤、そして血管系の拡張や収縮的变化は特に認められなかった。子宮組織は、外層部の包膜やその下の組織間隙、筋層には細胞浸潤もない、粘膜層の増殖変化は強く認められなかった。水腫様変化はやや強く認められた。また、子宮頸管組織は好中球の遊走変化と充血、水腫様変化が共に強く認められた。

E₂投与6, 10日目の卵巣の組織所見は、皮質層には多数の原始卵胞群と1次, 2次と3次卵胞群が認められ、髄質層は組織間隙の拡張や細胞浸潤、そして血管系の拡張や収縮的变化は特に認められなかった。

子宮組織は、外層部の包膜やその下の組織間隙、筋層には細胞浸潤もない、粘膜層の増殖変化は強く認められなかった。水腫様変化はやや強く認められた。子宮頸管組織は、充血と水腫様変化と好中球の遊走がやや強く認められた。

膣部と膣前庭部および外陰部とその周囲の皮膚部の変化は、E₂投与2, 4, 6日目にかけて時間と共に充血、水腫様変化が強く認められた。

P投与前後の組織学的変化は卵巣においては原始卵胞, 1, 2次卵胞が認められ血管の拡張変や細胞浸潤の変化は顕著に認められなかった。子宮粘膜上皮細胞の増殖的变化と子宮腺の分岐的变化が若干有った、子宮固有層, 筋層の変化は認められなかった。子宮頸管, 膣, 外陰部とその周囲の皮膚の組織学的変化は、E投与の様な組織学的変化として血管拡張, 水腫要変化や細胞浸潤等は顕著に認められなかった。

4) 生殖器組織中の肥満細胞の分布の変化

生殖器組織中の肥満細胞は、卵巣, 外陰部とその周囲の皮膚組織中に多数分布し、子宮, 子宮頸管および膣組織中の分布割合はそれよりも20%から80%少ない分布であった。

卵巣の組織中肥満細胞数は、E₂投与前の検鏡50視野中の細胞数107, 増減率100%, P:E比100, E

投与後2日目134, 増減率125%, 159, E投与後4日目127, 増減率118%, 139, E投与後6日目108, 増減率101%, 121, E投与後8日目118, 増減率110%, 132, E投与後10日目127, 増減率118%, 148となり、E投与によって投与後2日目が最も増加傾向を示し、その後は逐次減少傾向であった。P投与で肥満細胞数の変化は経時間に増加はなく逐次減少の傾向を示した。

外陰部組織中に肥満細胞の分布はE₂投与前の検鏡50視野中の細胞数189, 増減率100%, P:E比100, E投与後2日目439, 増減率256%, 232, E投与後4日目459, 増減率242%, 406, E投与後6日目342, 増減率180%, E投与後8日目216, 増減率114%, 161, E投与後10日目194, 増減率102%, 144となり、E投与によって投与後2, 4日目が最も増加傾向を示し、その後逐次減少を示した。

外陰部周囲の皮膚組織中に肥満細胞の分布はE₂投与前の検鏡50視野中の細胞数178, 増減率100%, P:E比100, E投与後2日目196, 増減率110%, 112, E投与後4日目242, 増減率135%, 151, E投与後6日目197, 増減率115%, E投与後8日目173, 増減率97%, 101, E投与後10日目178, 増減率100%, 104となり、E投与によって投与後2日目が最も増加傾向を示し、その後逐次減少を示した。

子宮, 子宮頸管, 膣組織中の肥満細胞の分布は、卵巣, 外陰部, 外陰部周囲の皮膚組織中よりも分布が少なくE投与並びにP投与による分布傾向は器官部位が異なっても経時的傾向は変わらなかった。また、器官の組織中分布の特異性として粘膜上皮層には認められなかった。生殖器各組織中ではE₂投与後2日目では赤血球大の2倍程度からE₂投与後4, 6日目で赤血球大の3倍から6倍程度とその容積が増える傾向があった。形は円形, 類円形, 紡錘形と様々な形態を示していた。

考 察

本研究では、繁殖の営みの最も明確に示す変化が雌豚は発情期の徴候である。この時、外部生殖器の徴候は充血, 腫脹と粘液の分泌が顕著となる。また、内部生殖器で卵巣, 子宮, 子宮頸管そして膣部にも明確な変化が認められる。特に卵巣, 外陰部と外陰部周囲皮膚組織内に肥満細胞の分布が強く認められ

た。この事は、卵巣で卵胞の発育と破裂時の卵胞壁の毛細血管の拡張やその周囲での類炎症反応が生じるとの報告がある(7. 8. 9)。この様な変化は性周期と同様の現象を17- β エストラジオールとプロゲステロンをもちいて人為的に発情状態を誘起し、発情休止状況を再現できて。その時の生殖器組織の変化と肥満細胞の動態について検討、この様な研究報告はラットでは有るが豚での報告は極めて少なかった(10. 11. 12)。

これらの報告では肥満細胞数の増減は血中E₂濃度と密接に関連している。今回の研究で血中E₂濃度が上昇している時期に肥満細胞数とその細胞の増減率でも強い増加の傾向が認められた。肥満細胞数の変動をE₂投与群/P投与群比率でみるとE₂投与後2日目から4日目に掛けて特に増加の傾向が強かった。Ashton (10)らの報告では、肥満細胞数は血中E₂濃度が高値の時期に増加するとし、血中E₂濃度の低値の時期には減少傾向を示したとしている。また、血中E₂濃度と血中P濃度の比率のバランスがとれている事が必要ともしている。この事は、エストロゲン作用が先行するが、両ホルモンの血中濃度の比率が適当でない時はしばしば拮抗作用がみられエストロゲンが示す様々な作用に影響を及ぼすことが知られている。組織学的変化は、E₂投与2日目から6日目に個体の粘膜細胞層の増数と固有層の水腫様変化がみられ、また、血管の拡張的变化とも合わせ、この時に肥満細胞が増加する時期と一致していた。P投与ではE₂投与時のような組織学的変化と肥満細胞の関連性は明確に認められなかった。即ち、肥満細胞の増減的变化にエストロゲンとプロゲステロンが重要因子となっている。更に、組織中に細胞浸潤(好中球、好酸球)がE₂投与によってみられ、この時には肥満細胞の増加傾向が認められている。この事は、肥満細胞の脱顆粒により、好中球遊走因子、好酸球遊走因子などのケミカルメディエーターが分泌されたと考えられる。E₂投与した際の生殖器組織における肥満細胞の動態に関してはラット、マウスの報告が有る(8. 9)。Ashton (10)は卵巣摘出したラットにE₂投与した結果、生殖器中の組織中の肥満細胞数が減少し、また変化が無かったとしている。その理由は多数の肥満細胞が脱顆粒した結果である。さらに脱顆粒によって放出されたヒスタミンやセロ

トニンの影響により浸透圧が高まり、また血管の拡張等が認めたことから、脱顆粒が生じていたことが示唆される。本研究で豚の発情期および発情休止期における生殖器の各組織の変化はエストロゲンによる肥満細胞の刺激する事によって組織変化が誘起されることが明らかにできた。本研究で得られた肥満細胞数の動態や組織学的変化についての結果はラット(11. 12. 13)、マウス(14)およびヒトにおいて(7. 15. 16.)、これまでに発表されている報告とはほぼ一致しているところが多く認められた。

要 約

雌豚では、発情期に外陰部の腫脹や充血などの特徴的な変化が見られる。この変化はEstrogenの生理的作用である。このとき生殖器組織の経時的変化も認められ、その変化に関係する生理的に多様な機能を有する肥満細胞(TB陽性細胞)分布の動態に注目をした。17- β estradiol (E₂略)を用いて発情期の状態を再現し、その時の生殖器に見られる組織学的変化と肥満細胞の関連性を検討した。供試動物は、生後月齢のランドレース、大ヨークシャー雑種の雌に。E₂投与した後、1・2・4・6・8・10日目に各々卵巣、子宮角、子宮頸管、膣部、外陰部とその周囲の皮膚を採取した。

生殖器の組織学的変化と肥満細胞の分布について観察し、検査はHE法とTB(異調性染色)法を用いて組織中の肥満細胞を算定した。

結果は、副生殖器と外陰部周囲の皮膚部における組織変化が、E₂投与で粘膜及び表皮細胞の増殖、粘膜固有層の拡張と水腫、好中球・リンパ球の浸潤等が2日目から4日目に顕著に認められた。卵巣は、4日目から6日目に卵胞の発育が見られた。採材した器官すべてに組織中に4日目から6日目に肥満細胞の分布が増加した。更に、特徴的に卵巣髄質、外陰部と、その周囲皮膚の真皮層に肥満細胞は多数認められた。これらの事から未成熟雌豚にE₂投与すると生殖器組織が経時的変化し、特に粘膜組織の増殖と水腫性、血管拡張性ならびに白血球浸潤変化が著明に認められた。この変化と合致するように肥満細胞の増数的変化が見られた。以上のことから肥満細胞の変化は、E₂と極めて密接な関係性があることが示唆された。

文 献

- 1) Robertson, H.A and King, G.J.
Plasma concentration of progesterone, estradiol, 17- β estradiol and testosterone sulfate in the rat at implantation, during pregnancy and at parturition.
J.Repro.Fert: 40. 133-141. 1967
- 2) Satou, M.Masaki, J and Niwa, T.
Morphological observation on the fibrous materials in the rat vagina.
Tohoku.J.Agric.RES: 31. 1-8. 1980
- 3) Branscheid, W and Holtz, W.
Histochemical examination of the vaginal epithelium of sows at various stages of the estrus cycle
Anat.Hist.Embryol: 17. 12-26. 1988
- 4) 森川博史
排卵機構におけるヒスタミンの役割について
日産婦会誌： 28.159-164.1976
- 5) 森川博史 他
排卵家兎卵巣中ヒスタミンの動態
日産婦会誌： 28.159-164.1976
- 6) 林 基之
卵巣：基礎と臨床
金原出版，東京， 30. 126. 1980
- 7) Rudolph, M.L et al
Distribution of mast cells and the effect of their mediators on contractility in Human myometrium
Brit.J.Obst.Gynaecology: 100. 1125-1130. 1993
- 8) 須藤守男
肥満細胞の形態と機能. 代謝： 13 (3). 367-377. 1976
- 9) 村山雄一, 林 秀男
炎症学叢書 1—炎症反応. (第1版) 86-113. 1976
- 10) Ashton, F. E et al
Numbers of mast cells in rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response
Biol. Repr: 6. 193-203. 1972
- 11) Lyno, E et al
Effects of hormones, pregnancy and pseudopregnancy on the mast cell count in the rat uterus
Life Sciences: 10 (1). 111-120. 1971
- 12) Levier, R.R and Paziani, E.
The effects of estradiol on the occurrence of mast cells in the rat uterus
Exp. Cell. Research: 41. 244-252. 1966
- 13) Yasemin, A et al
Ovarian, uterine and brain mast cell in female rats.
Bioc. Physiology: 120. 255-262. 1998
- 14) Padilla, L et al
Histamine content and mast cells distribution in mouse uterus
Biology: 36 (1). 93-100. 1990
- 15) Atushi, M et al
Distribution and heterogeneity of mast cells in the human uterus
Human Repro: 12 (2) 368-372. 1997
- 16) Sivridis, E. et al
Mast cell distribution and density in the normal uterus metachromatic staining using lectins
Eurp.J.Obst Gynecology: 98 (1). 109-113. 2001