

哺乳期マウスの子宮及び膣の微細構造に及ぼす エストラジオールの影響

福 森 信 隆*, 安 藤 弘*, 久 保 喜 一*, 矢 野 範 男*
高 橋 博*, 長 澤 明 道*, 湯 澤 勝 広*, 坂 本 義 光*
青 木 直 人**, 小 縣 昭 夫*

Effects of Estradiol on the Uterine and Vaginal Ultrastructure of Suckling Mice

Nobutaka FUKUMORI*, Hiroshi ANDO*, Yoshikazu KUBO*, Norio YANO*
Hiroshi TAKAHASHI*, Akemichi NAGASAWA*, Katsuhiko YUZAWA*, Yoshimitsu SAKAMOTO*
Naoto AOKI** and Akio OGATA*

The effects of 17 β -estradiol (E2) on the uterine and vaginal ultrastructure of suckling mice were studied by transmission electron microscopy. In the uterus of mice treated with E2, an increase of luminal epithelial cell heights, pseudostratified columnar epithelium, an elongation of microvilli and pseudostratified epithelial nuclei and an enlargement of the uterine gland were observed. In the vaginal epithelium of mice treated with E2, the stratified cell layers accompanying the cornification, and the formation of an intercellular bridge and well-developed tonofilaments in the prickle cell layers were observed. It is suggested that the observation of these ultrastructural changes is very useful to detect the low dose effects of substances suspected in endocrine disruption and their mechanisms.

Keywords : エストラジオール 17 β -estradiol, 子宮 uterus, 膣 vagina, マウス mouse, 電子顕微鏡観察 electron microscopic observation

緒 言

近年、環境ホルモンと呼ばれる内分泌かく乱作用が疑われる物質の生物へ与える影響が問題となっている。その物質のホルモン様作用や本来のホルモン作用をかく乱させるという性質から、生殖器官や次世代に対して影響を与えることが推測される。これらの物質は微量で、生物の平衡性や恒常性を乱し、疾病との関連も否定できない。しかし、その健康影響については、作用機序の未解明なところが多く、因果関係も明瞭ではない¹⁾。

内分泌かく乱化学物質の生体影響を評価する方法は、多種多様の試験が報告されているが、低用量での反応を捉えなければならず、そのため物質が明確に関与していると断定することが困難な場合が多い。形態学的観察において、光学顕微鏡（光顕）で精査が不可能な細胞構造の変化を電子顕微鏡（電顕）で観察することは、多くの有意義な所見が得られる。17 β -エストラジオールを卵巣摘出マウスに投与すると、微量で子宮重量の増加がみられ、光顕的には子宮内膜や子宮筋層の肥厚を伴っていることが報告されて

いる²⁾。このような光顕レベルでみられた変化について、その微細構造を観察することは、内分泌かく乱作用を持つ物質の作用機序の解明に有用である。電顕を用いてラットの膣の微細構造を観察すると、粘膜上皮細胞の角化が亢進され、膣内腔側の上皮細胞で扁平化がみられるとの報告がある³⁾。今回、既知のエストロゲンである17 β -エストラジオールを用いて、哺乳期雌マウスに大量投与した時の子宮及び膣の微細構造に及ぼす変化を電顕で観察し、エストロゲン作用による基礎的变化を検索した。

実 験 方 法

被験物質及び実験動物 : エストロゲンは、シグマ社の17 β -estradiol (Lot No.28H0818, E2と略す) を使用した。また動物は、日本チャールスリパー社のCD-1マウスの哺乳期雌を実験に供した。

実験方法 : E2はdimethylsulfoxide (DMSO, 和光) に溶解し、100 μ g/体重kgをマウスの生後1日目から21日目まで、1週当たり5日、1日1回マイクロシリンジを用い皮

* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 毒性部薬理研究科

下注射した。投与量は、体重1g当たり1 μ Lとした。対照には、DMSOを実験量と同様に与えた。生後22日目に解剖し、子宮と膈を細切して、速やかに2.5%のグルタルアルデヒドの固定液(0.1M磷酸緩衝液)に浸漬し前固定を行った。

試料作製法: 4で3日間の前固定を行った後、磷酸緩衝液で十分に洗浄し、1%オスミウム酸(pH7.3, 0.1M磷酸緩衝液)に浸漬して、後固定を2時間行った。その後、後固定液を緩衝液で洗浄して、エタノールで脱水し、置換処理を経て、Polybed 812とAralditeを混合したエポキシ樹脂に平板包埋した。電顕で観察する前に、約1 μ mの光顕用のトルイジンブルー染色の準超薄切片を作製して、全体像の観察を行った。超薄切片は約80nmの厚さとし、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重電子染色を施し、透過型電顕(日立、H-7000型)の加速電圧75kvで観察を行った。

実験結果

子宮の所見

対照動物の内腔側の粘膜上皮細胞をFig.1に示した。比較的球形な核を持ち、単層の円柱上皮で構成され、細胞間には接着装置が存在していた。細胞質に占める核の割合は大きく、内腔面は微絨毛の小突起で被われていた。細胞質には、大小不揃いの丸い形状をした電子密度の高い分泌顆粒の蓄積が観察された。上皮細胞の背高は、20 μ m前後であり、若干伸長した細胞もみられた。上皮細胞の下部には基底膜があり、結合組織の多い粘膜固有層と境界を分けていた。

Fig.2は、対照群の子宮腺を示した。子宮腺は粘膜固有層に存在しており、内腔側上皮細胞と同様に単層の円柱上皮で、大きな球形の核を有していた。管腔側の遊離表面では、多数の微絨毛が認められた。

E2投与群(Fig.3)では、粘膜上皮細胞の背高は著しく長く伸び、細胞の幅が縮小する傾向がみられた。対照群と比べると、約2倍の背高を呈した。核は扁平化して、固有層側に寄り集まり、また内腔面での微絨毛は、対照群よりもやや長く伸びていた。固有層に接する基底膜は、多数の屈曲がみられた。しかし細胞質内の分泌顆粒の蓄積は、対照群と比べ減少していた。一部に核が重なって、多列化した細胞が散見された。

E2投与群の子宮腺をFig.4に示した。固有層の子宮腺は著しく肥大しており、円柱上皮細胞の多列化が観察された。核は不整な形状を呈し、クロマチンの分散がみられた。

またE2投与群では、粘膜固有層や子宮筋層で電子密度の低い浮腫状態が観察された。

これらの内腔上皮細胞の比較に関しては、屈曲等の物理的影響を避けるために、出来るだけ平坦な部位で観察を行った。

膈の所見

対照動物の膈の上皮細胞をFig.5に示した。この部の上皮細胞は、3~4層の重層扁平上皮で内腔側では、剥離や脱落がみられた。剥離した部で残存している細胞の表面には、微絨毛突起が観察された。粘膜固有層との境界部には、

基底膜が存在し、その基底層板に接する基底細胞は、立方形を示して紡錘形の核を有していた。

Fig.6の内腔への剥離や脱落の著しい対照群の上皮細胞は、細胞層が減少し、比較的大きな核を持つ基底細胞が認められた。基底細胞の上部では、有棘細胞がみられた。内腔に脱落がみられた部位で残存している上皮細胞では、その表面で微絨毛に似た小突起が観察された。

Fig.7は、E2投与群の内腔側上皮細胞を示した。対照のFig.5と同倍率であるが顕著な細胞の重層化がみられ、内腔面では角質層が形成されていた。この角質層は8~10層の均質な角質細胞からなり、細胞内小器官は消失していた。角質層の下部では、電子密度の高いケラトヒアリン顆粒が細胞質内に散在している顆粒細胞が明瞭に認められた。この細胞の細胞内小器官は、存在しているが不明瞭であり、張原線維の凝集が主に認められた。中間部の細胞は、上位有棘細胞であり著しい扁平化がみられ、細胞間隙の離開は少なかった。

E2投与群の固有層側に接する下部上皮細胞をFig.8に示した。固有層との境界には、基底膜の存在が認められ、これに接する基底細胞は、細胞質の大部分を占める大きな核を有し、肥大した核小体がみられた。基底細胞の棘状突起は、その上部に位置する有棘細胞と比較して顕著ではなかった。基底細胞側の下位有棘細胞は、上位に比べ円形を呈し、棘状突起を隣接する細胞の細胞間隙に突出させ、互いに細胞間橋を形成している像がみられた。間橋の接合部は、約2,000倍の低倍率では電子密度が高い塊状を呈しているが、10,000倍以上ではデスモゾームの接着装置が観察された。下位有棘細胞の細胞間隙の離開は大きく、多数の棘状突起の形成が認められ、突起部への張原線維の集合がみられた。細胞質内の張原線維の発達は、極めて良好で、束を形成する線維がみられた。基底細胞と基底膜との境界では、対照と比べ半デスモゾームの増加が認められた。

考 察

微細形態学的観点からE2投与によるエストロゲン作用の特徴的所見を検討した。子宮重量を増加させるE2は、細胞の増殖と共に浮腫を伴っているが、浮腫の程度から弱いエストロゲン様作用を見いだすことは、容易ではない。子宮で、結合組織が多い粘膜固有層や筋層に浮腫が認められたことは、E2の作用が比較的強く現れたためと思われる。従って、内分泌かく乱作用が疑われる物質の様に弱い作用を検索するためには、浮腫を指標にするより上皮細胞の構造の変化を検索することが重要と考える。

E2による子宮及び膈の粘膜上皮細胞の変化は、トルイジンブルー染色の光顕でも細胞の背高が伸びているのが観察されるが、内腔側の微絨毛や細胞質内の変化を把握することは困難である。子宮の上皮細胞の背高は、対照に比べ約2倍の伸長がみられ、核と共に細長い形状を呈した。核は固有層側に偏在し、基底膜に接する部位では、細胞膜の屈曲が認められた。このことは子宮の肥大に伴って、上皮

細胞が圧迫された結果の像と考えられる。また本来、1層の細胞であるが、増殖したように重なってみえる多列化という所見が散見された。E2の大量投与によるエストロゲン作用の強さの結果、細胞質内の分泌顆粒の減少は、広範囲で認められた。このことはE2により顆粒の放出機能が亢進されたと考えられる。光顕的観察で、体重1kg当たり0.02 µgの低用量のE2を卵巣摘出（卵摘と略す）マウスに与えたところ、子宮重量の変化はみられないが、上皮細胞の背高が約2倍に変化し、それ以上の用量で更に背高が増加して、多列化するという報告がある²⁾。更に今回子宮腺で、E2による肥大や円柱上皮の多列化が認められた。このことは、子宮では上皮細胞に対してE2の作用が強く働くと思われる。

子宮の内腔側の遊離表面でみられた微絨毛は、E2で長くなる傾向がみられた。これは上皮細胞の背高の伸長との関係が示唆されるが、超薄切片像では顕著な変化ではなかった。卵摘ラットにE2を体重1kg当たり1 µg皮下投与して、走査型電顕で子宮粘膜の表面構造を観察したところ、対照では細胞表面が平たく、短い微絨毛で被われているのに対して、E2投与では微絨毛が長く伸びていることが報告されている⁴⁾。また、透過型電顕での観察によりE2を投与した卵摘ラットの子宮内腔面の微絨毛が、2倍以上の伸長を示し、細胞骨格であるアクチンの微細線維を比較した時、E2投与では束を形成して細胞質に深く入り込んだ線維を観察している報告⁵⁾がある。この時プロゲステロンでは、線維の束を形成するが内腔への伸長はみられていない。エストロゲンとプロゲステロンでみられる差の様にこの微絨毛における変化は、ホルモン作用を検討する際の重要な指標になると考えられる。

腔では、E2の投与により著しい角化が惹起された。粘膜上皮細胞の重層化がみられ、特に表層の扁平化した角質細胞では、細胞内小器官が消失していた。その下部の細胞では、ケラトヒアリン顆粒の蓄積が認められた。ラットの腔上皮細胞を各性周期で比較すると、発情期で角化や上皮細胞の剥離が観察され、また卵摘後E2投与で、角化や基底細胞の増殖、中間層や表層細胞での扁平化、デスモゾームの増加等を観察した報告がある³⁾。このエストロゲンの腔に対する作用は、マウスとラットで同等と思われる。またマウスでE2を20 µg投与した報告では、24時間後から粗面小胞体やゴルジ装置の増加がみられ、基底細胞からの増殖及びデスモゾームや張原線維の増加がみられている⁶⁾。今回の検索は比較的低倍率で行ったため、細胞内小器官の変動を十分に捉えられなかった。多数の細胞の分化や増殖がみられることから、更に詳細な観察を行う必要があると考える。

腔の内腔側遊離表面の微絨毛は、対照群で剥離、脱落した後の細胞に子宮とは若干異なる形状でみられたが、E2投与で角化した表面の角質細胞では、微絨毛の伸長した像が確認できなかった。むしろ、平坦な細胞表面に小さな規則的な突起として観察された。このことは卵摘ラットにE2を投与すると、細胞表面が盛り上がり崩壊状態を呈し、

細胞間の離開と共に短い微絨毛を走査型電顕で観察している報告と一致していると思われる⁷⁾。

E2で重層化した腔上皮細胞の下部は、有棘細胞の増殖がみられ、細胞間隙が拡張して棘状突起を出し、細胞間橋を多数形成していた。この顕著な構造は、エストロゲン作用に特徴的であると考えられる。固有層に接する上皮下部の基底細胞では、有棘細胞と同様に核及び核小体の肥大を伴っていた。更に屈曲している基底膜で、半デスモゾームの増加がみられた。このことは、細胞の活発な分化を裏付けていると思われる。透過型電顕で、ラット腔の基底細胞に対するE2の影響をみた報告では、細胞の容積や電子密度の増加がみられ、更に粗面小胞体やリボゾームの増加及びゴルジ装置の拡張、糸粒体の崩壊を認めている⁸⁾。

微細構造の変化から、子宮及び腔へのエストロゲン作用をE2と比較した報告がある。殺虫剤のメトキシクロル(MXC)投与でマウスの子宮の上皮細胞の背高を比較した時、その高さはMXCの用量に比例して高くなり、E2と同様な構造変化がみられた。低濃度で微絨毛の伸長がみられ、高濃度で糸粒体の空胞化、膨化及びゴルジ装置の拡張等の所見を報告している⁹⁾。更にマウスでMXCの影響を調べると、子宮重量の増加や微絨毛の発達及び腔の角化、またE2と若干異なるが、規則的な微絨毛の配列の崩壊像を走査型電顕で観察している¹⁰⁾。

この様にE2の変化を指標にして、内分泌かく乱作用が疑われる物質の微細構造の所見と比較することにより、その物質のエストロゲン作用の推察が可能になると思われる。光顕で把握できない所見や低用量でのE2との共通した微細構造の変化を比較検索することは、内分泌かく乱作用を持つ物質の検索や作用機序の解明に有効な一方法と考える。

文 献

- 1) 化学編集部：環境ホルモンとダイオキシン，2-94，1998，化学同人，京都。
- 2) Papaconstantinou, A. D., Umbreit, T. H., Fisher, B. R., et al.: *Toxicol. Sci.*, **56**, 332-339, 2000.
- 3) Gupta, P. D., Vijayasaradhi, S. and Reddy, A. G.: *Biol. Cell*, **65**, 281-289, 1989.
- 4) Craig, S. S. and Jollie, W. P.: *Anat. Embryol.*, **169**, 205-208, 1984.
- 5) Luxford, K. A. and Murphy, C. R.: *Anat. Rec.*, **233**, 521-526, 1992.
- 6) Cunha, G. R., Lee, A. K. and Lung, B.: *Am. J. Anat.*, **152**, 343-382, 1978.
- 7) Terry, V., Murphy, C. R. and Shorey, C. D.: *Acta. Anat.*, **148**, 14-21, 1993.
- 8) Tileva, M. D., Christozova, A. and Dragiev, M.: *Folia Morphol.*, **25**, 283-288, 1977.
- 9) Swartz, W. J., Wink, C. S. and Johnson, W. D.: *Reprod. Toxicol.*, **8**, 81-87, 1994.
- 10) Eroschenko, V. P.: *Reprod. Toxicol.*, **5**, 427-435, 1991.

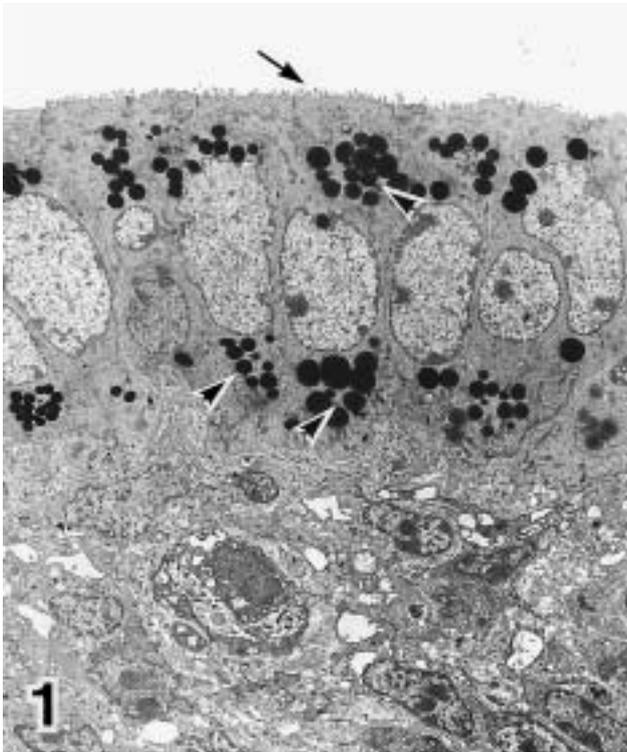


Fig.1. Electron micrograph of uterine epithelium from a control mouse. The columnar epithelium containing the secretory granules (arrow heads) is covered with short microvilli (arrow). ($\times 2,200$)

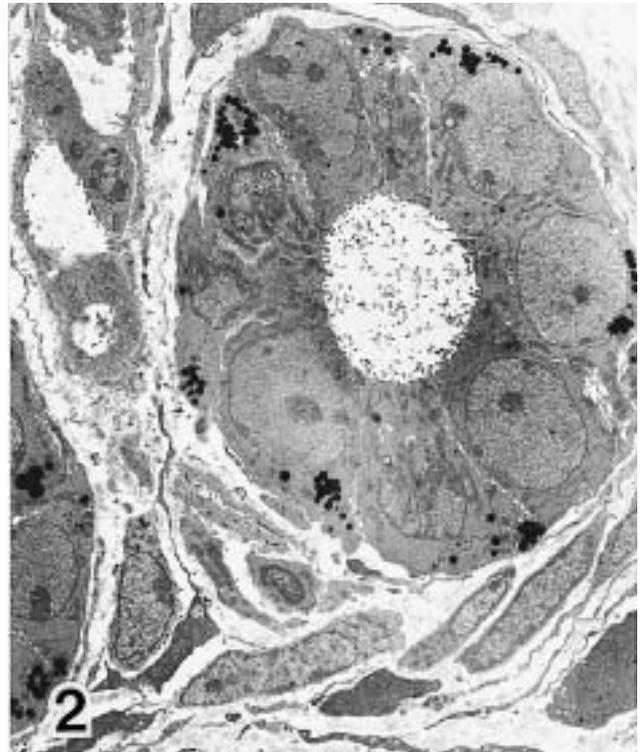


Fig.2. Uterine gland of the control mouse showing regularly arranged simple columnar epithelium. ($\times 2,200$)

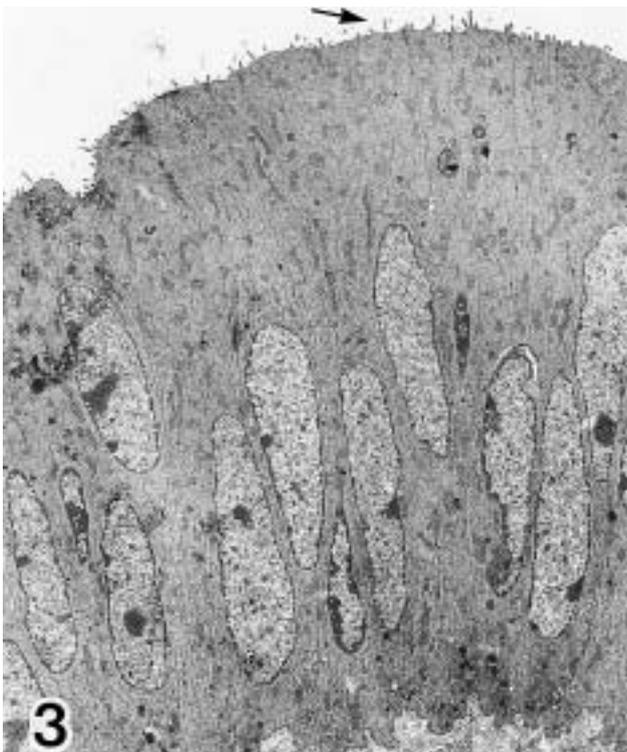


Fig.3. Uterine epithelium of E2-treated mouse showing the increase of luminal epithelial height compared to the control. The microvilli (arrow) appear longer than those of the control group. ($\times 2,200$)

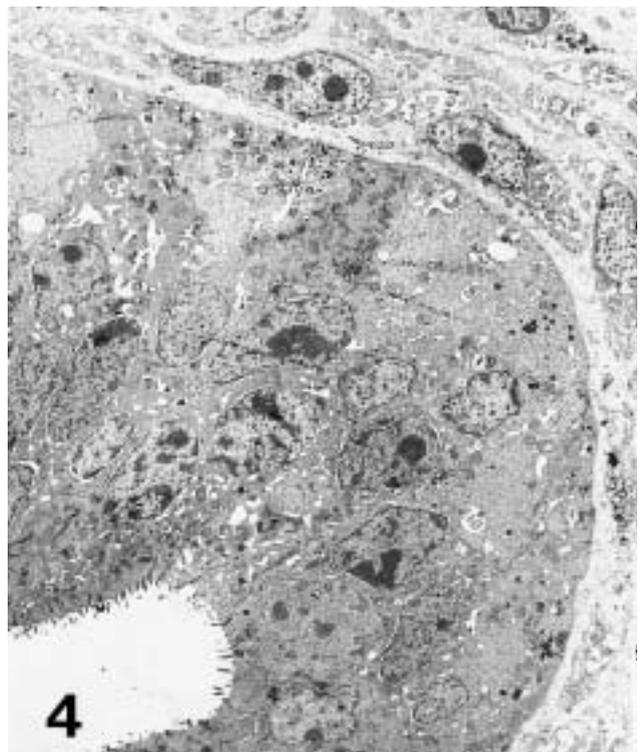


Fig.4. Uterine gland from a mouse treated with E2. The epithelial cells are pseudostratified columnar and the enlargement of the gland size is observed. ($\times 2,200$)

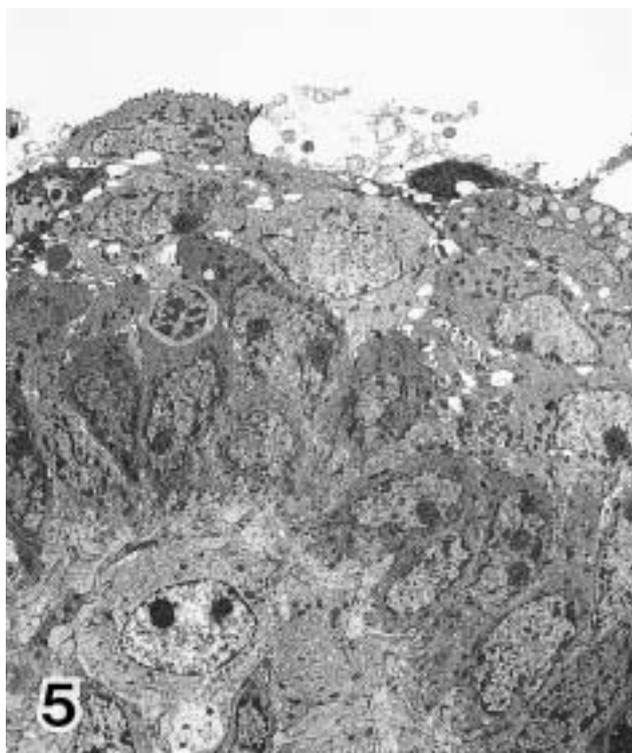


Fig.5. Vaginal epithelium of a control mouse. The stratified squamous epithelium is the polygonal large cells. ($\times 2,600$)

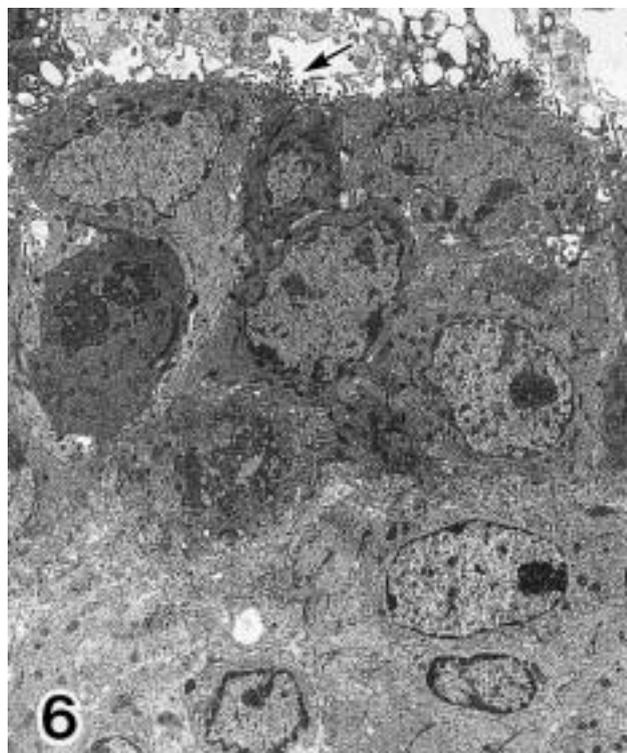


Fig.6. Higher magnification of vaginal epithelium from a control mouse. Note the exfoliation of cells in the lumen. The surface of luminal cells shows a few blunt microvilli (arrow). ($\times 3,300$)

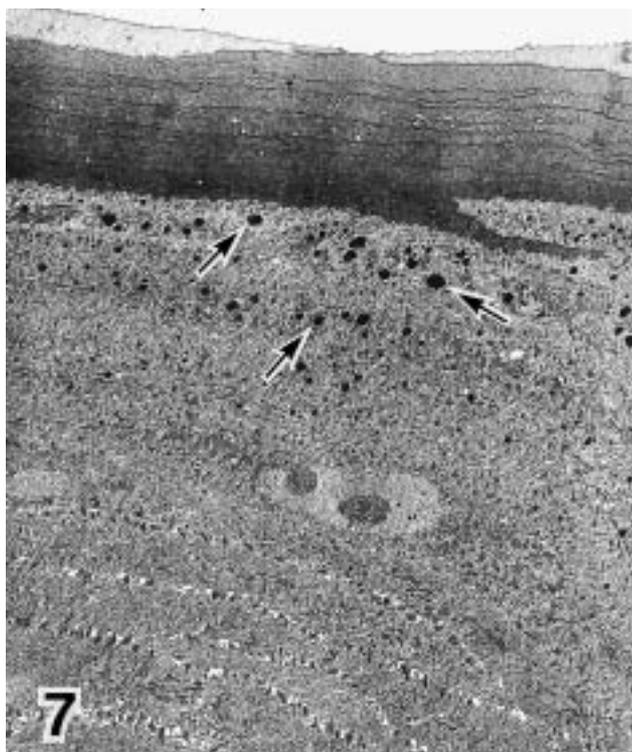


Fig.7. The surface layers of vaginal epithelium in the mouse treated with E2 show the cornification. The increase of epithelial cell layers and keratohyalin granules (arrows) are observed. ($\times 2,600$)

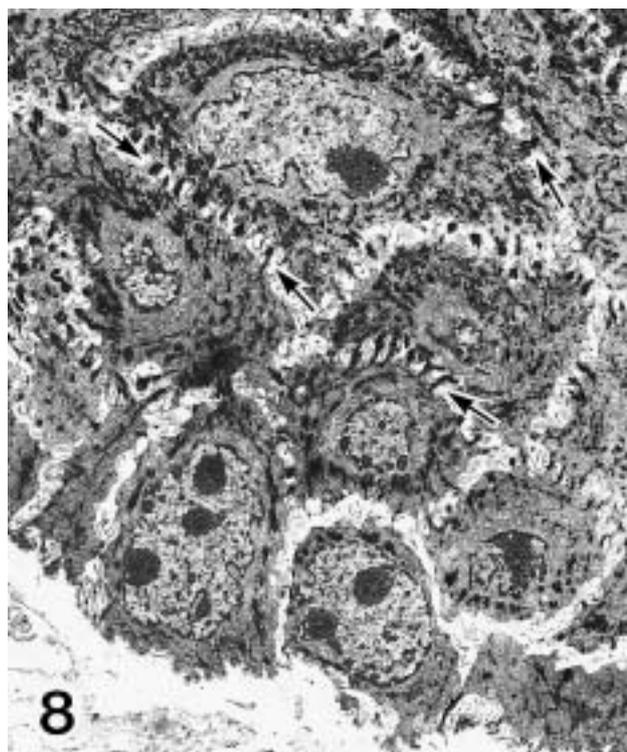


Fig.8. A lower part of epithelium in the vagina from a mouse treated with E2. The intercellular bridges (arrows) and the well-developed tonofilaments are observed in the prickle cell layers. ($\times 3,300$)