Scanning Electron Microscopic Observations of the Luminal Surface of the Rat Uterus in the Process of Implantation and Its Hormonal Regulation

Kaname HAYASHI, Shozo HAMANISHI, Wenyuan LEE and Shimpei TOJO

Department of Obstetrics & Gynecology Kobe University School of Medicine,
Kobe, Ikutaku (650), Hyogo, Japan (Director : Professor Shimpei Tojo)

In order to study the real ultrastructural changes and the hormonal regulation in the process of the implantation, scanning electron microscopic observations were made on the endometrial surface of delayed implantation and castrated rats.

1) In delayed implantation, many large cellular protrusions, dense arrangement of microvilli and several microapocrine-like structures were observed.

2) Around eight hours after the injection of estradiol, which dose was enough to induce the implantation, features such as a lot of macroapocrine-like and microapocrine-like structures, bulging of the cellular surface suggested the increase of secretion.

Subsequently, the decrease of the secretion activity was implied from such features as wrinkling of the cellular protrusions, shortening or bending of the microvilli, and flattening of the cellular surfaces.

3) In the castrated rats, the microvilli were short and sparsely distributed.

Under the administration of progesterone in these rats, microvilli were arranged densely and a large cellular protrusion was distributed on every cell.

In contrast, at twelve hours after the administration of estradiol in these rats, many microapocrine-like structures were observed.

Moreover, under the sequential administration of progesterone and estradiol, these findings well resembled those with estradiol injection in delayed implantation.

4) The significance and relation of those ultrastructural changes with the ovum-implantation were discussed.

(See pp. 813~827)

着床過程に關与する内膜上皮表面の 超微細構造の変化とその内分泌調節

神戸大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 東條伸平教授)

林 要, 浜西 正三, 李 文遠

(昭和49年1月26受付)

胚着床に關与する子宮内膜上皮表面の微細構造の変化とこのさいの性ステロイドの演ずる役割を究明する目的で、ラット内膜について走査型電顕を用い觀察した結果、遅延着床時の内膜では巨大な細胞質突起と比較的繁茂する微絨毛が認められ、着床量の estradiol 投与後は分泌現象の亢進を示唆する apocrine 様突起の著明な形成をみ、ついでおそらくは分泌物の放出に原因すると思われる上皮の菲薄化が認められた。また著者らの実験条件下では protrusion の形成は主として progesterone 依存性、apocrine 様突起の形成は主として estrogen 依存性であることも判明した。

は じ め に

複雑な胚着床過程を解析する一つの方法論として遅延着床実験がある。本条件下では胚の viability は維持されるものの、内膜への trophoblastic invasion はおこらないので、妊卵保持あるいは胚着床阻止に關与する progesterone の作用のメカニズムを研究する上に有用な実験モデルとなる。

ところで、このさい適量の estrogen を投与すれば、着床は直ちに誘起される。すなわち、この間の消息を経時的に追求することは estrogen の胚着床促進作用のメカニズムを分析する上に有用である。

さて胚着床にさいして妊卵と最初に接触する場合は附記するまでもなく、内膜表面上皮であるが、内膜表面上皮は胚性刺激を内膜間質に伝達する transducer として機能することも明らかにされている (Blandau, 1961)¹⁾。

したがって、胚着床と前後して生ずる内膜の超微細表面像の変化を追究することは、胚着床の機序の実態を解明する上に極めて重要な課題と考えられる。

ところで従来着床周辺期にみられる内膜表面上皮の微細構造の変化につき検討した研究として、Enders ら (1967)²⁾、Mayer ら (1967)³⁾ をはじめ、Potts (1969)⁴⁾、Nilsson (1970)⁵⁾、Tachi ら (1970)⁶⁾、飯塚 (1971)⁷⁾、著者ら (1972⁸⁾、1973⁹⁾) の報告がみられるが、これらの報告はいずれも透過型電顕を用いた成績で、このさいの内膜表面上皮に生ずる微細構造の変化を広範囲、かつ立体的に追究することは、その方法論上、おのずと一定の制約が残されていた。

そこで著者らは、本研究において、走査型電顕を用い、遅延着床内膜の上皮表面、さらに estrogen 投与後誘起される内膜上皮表面の微細構造の変化、ことにその微絨毛や原形質突起に生ずる三次元像の変化、あるいはこれら細胞表面の分泌動態などにつき検討した。

また次に、このさい惹起される超微細表面像の変化に關与する性ステロイドの役割を解析する目的で、ステロイドホルモン投与下の去勢内膜上皮表面についてあわせ觀察した。

なお走査型電顕を用いたこの方面の研究に關しては、現在のところ、ラット着床前期内膜を觀察した Nilsson の報告 (1972)¹⁰⁾、遅延着床ラット、マウスの内膜を検討した Psychoyos ら (1971)¹¹⁾、Bergström

ら (1973)¹²⁾, 著者ら (1974)¹³⁾, の報文を散見するに過ぎない。

I 実験材料および方法

1. 実験材料 (Fig. 1.)

A. 遅延着床ラットを用いた estradiol 投与実験

体重 150~200gm の Wistar 系処女ラットを用い, 発情期に雄と同居させ, 翌朝陰脂膏中の精子が確認された日を妊娠第1日 (L_0) とした。そして Fig. 1. のごとく L_2 午前中に両側卵巣剔除を行ない以後, progesterone を1日 4 mg 連日皮下投与し, L_7 に hexobarbital 麻酔下で試験開腹して, 明らかな着床部膨隆 (node formation) のないことを確かめ遅延着床ラットとした。この L_9 相当日に estradiol 0.1 μ g を皮下投与し, 経時的 (8, 12, 16, 24時間) にそれぞれ3匹の動物を hexobarbital 麻酔下で開腹し, 子宮を剔除した。

B. 卵巣剔除ラットを用いた性ステロイド投与実験

正常周期ラットの卵巣を両側剔除し, 少なくとも2週間以上無処置の動物を用い, 前記の遅延着床実験において投与した性ステロイドを同期間, 同量を投与した。即ち, progesterone は 4 mg/日, 7日間連日投与, estradiol は 0.1 μ g 投与し, さらに progesterone を 4 mg/日 7日間投与した後 estradiol 0.1 μ g を順次投与し, その12時間後にAと同様に子宮を剔除した。

2. 走査型電顕資料作製方法 (Fig. 2.)

1) 洗浄, 固定

上記のごとく剔除した子宮はその周囲の脂肪, 血管を除去し, 生理的食塩水にて子宮外面及び子宮腔内 (flush out 法による) を洗浄し, 直ちに 5% glutaraldehyde (0.1M Sørensen リン酸緩衝液 pH 7.4) で30分間, 前固定を施し, 実体顕微鏡下で組織を長さ 3~4 mm に輪切し, さらに広間膜側を trimming し同緩衝液中で30分間再洗浄を行なった。この後 1% Osmium 酸 (同緩衝液にて希釈) で4時間30分の後固定を実施した。

2) 脱水, 乾燥

70% ethanol からの上昇系列により脱水を行ない, 徳永氏¹⁴⁾ による有機溶媒置換後自然乾燥法あるいは, 酢酸 isoamyl に置換の後, 液体 CO_2 を用いて HCP-1 による臨界点乾燥を行ない, デシケーター内

A. Delay-Estrogen

B. Ovariectomy-Sex steroids

Progesterone, Progesterone-Estrogen

Estrogen

O: ovariectomy
E: estradiol 0.1 μ g
P: progesterone 4mg/day
A: autopsy

1) Hysterectomy

2) Clean up (removal of fat and blood);
0.9% NaCl sol. by flush out method

3) 1st Fixation; 5% glutaraldehyde (0.1M Sørensen phosphate buffer pH 7.4) 1/2 hr

4) Trimming ; chips of 3-4 mm length under the stereo microscope

5) Clean up ; 0.1M Sørensen phosphate buffer pH 7.4 1/2 hr

6) 2nd Fixation; 1% OsO₄ 4 1/2 hrs

7) Dehydration; ethanol gradient

8) Drying iso-amyl-acetate : ethanol = 5 : 1
(Tokunaga's method)

or Critical Point Drying with HCP-1
(Tanaka's method)

9) Keeping ; desiccator (CaCl₂)

10) Coating ; 1st carbon) or 1st Crom
2nd gold) 2nd Platinum -Paradium

11) Observation: JEOL JSM-U3 or HSM-2 (20KV)

Fig. 1. Outline of Experimental Procedure

Fig. 2. Preparation of the specimen for SEM

で保存した。

3) 蒸着, 観察

carbon—金または chrome—白金・palladium の二重蒸着を施して, JEOL JSM-U 3 または HSM-2 (加速電圧 10KV, 20KV) を用い鏡検した。

II 実験成績

A. estradiol 投与後誘起される遅延着床内膜の経時的な変化

i) 遅延着床時の内膜上皮表面の微細構造 (Fig. 3a, 3b)

遅延着床時の内膜上皮表面の微細構造は, 既報 (1974)¹³⁾ したごとく, その上皮表面は細胞境界が比較的明瞭で, その輪郭は少し丸味をもち, 細胞表面はやや陥凹もしくは褶曲しており, 1細胞につき2~3個の直径 $1 \sim 3 \mu$ 大の細胞質突起が分布している。そしてこのような所見は透過型電顕像においても同様に豊富な微絨毛, 巨大な細胞質突起として把握可能である (Fig. 3b)。

この外, 多数の触手状構造の集合した突出物すなわち Psychoyos (1971)¹¹⁾ の指摘する “sea-anemone-like formations” が観察された。

微絨毛は一般に棍棒状を呈し, 比較的均等かつ密に分布しており, また比較的稀ではあるが微絨毛の先端部に一致して直径 $0.2 \sim 0.3 \mu$ の小型の apocrine 様突起を認めることもある。

Fig. 3a. Luminal epithelial surface of rat uterus in delayed implantation (with critical point drying).

Arrangement of microvilli is dense. Many large cellular protrusions or “sea-anemone-like formations” among the microvilli are seen. $\times 4460$.

Fig. 3b. Profile of luminal epithelium of rat uterus in delayed implantation. A large cytoplasmic protrusion, densely arranged microvilli and many apical vesicles are shown. $\times 12200$.

ii) estradiol 投与後 8 時間目の上皮表面の微細構造 (Fig. 4.)

estradiol $0.1\mu\text{g}$ 投与後 8 時間目では, 細胞境界は陷凹して不明瞭となり, その輪郭は不鮮明ながら長楕円形を呈している. またその表面構造には著変がみられる. すなわち, 表面は 0.4 から 12μ 大の大小さまざまな多数の半球状ないしは球状突出物によつて被われており, これらのあるものは明らかに茎をもつて内膜表面から突出している. またこのような apocrine 様に膨隆する細胞表面には短小な微絨毛がきわめて疎に附着しているものもある.

微絨毛は一般にやや短小化し, その太さは必ずしも一様でない. また, 内膜表面全般に直径 $0.2\sim 0.3\mu$ 大の小球状の構造が微絨毛の先端部にほぼ一致して多数観察された.

iii) estradiol 投与後 12 時間目の上皮表面の微細構造 (Fig. 5.)

estradiol 投与 12 時間目では上皮表面はまだ細胞質が膨隆しているため粗造であるが, 一部ではやや平坦化している. また細胞境界は一般に細胞質の膨隆のため相対的に陷凹しているところが多く, 谷間のようにみられるが, 一部は細胞質の褶曲により, 境界が不明瞭となつている. 他方 8 時間目にみられた大型の球状突出物は減少して, 直径 $0.5\sim 2\mu$ 大のさまざまな細胞質突起が 1 細胞あたり 4 個分布している. これらの突起は膨満しているもの, あるいは褶曲が強く萎縮したかにみられるものも多く, 極稀れであるが, その細胞質突起の上に箔状の構造物が付着してみられることがある.

また微絨毛は全般的に短く不整で, その形状は先端部が風船状に膨隆したもの, あるいは円錐状に尖がつているものなどが混在しており, その配列は著しく不規則化している.

iv) estradiol 投与後 16 時間目の上皮表面の微細構造 (Fig. 6.)

Fig. 4. Luminal surface of rat uterus, at 8 hour after the injection of estradiol $0.1\mu\text{g}$ (with Tokunaga's method).

Some large globular protrusions are originated from the endometrial surface with stalk. On the protrusions, a few short microvilli are attached. A large number of similar protrusions are observed. $\times 1500$.

estradiol 投与16時間目になると、内膜表面は明らかに平坦化し、細胞境界は突出して明瞭となる。またこの時期の特徴的な所見として、小型の apocrine 様構造はなおかなり多数認められるが、8時間目の内膜表面にみられた大型の apocrine 様球状突出物は明らかに減少しており、このような所見に加えて、膨隆した細胞膜の破綻を思わせる、その中央部の陥凹したあるいは小孔を有する細胞質突起が多数みられた。

他方、微絨毛は繁茂しているが、その形状は対象の遅延着床内膜と比較して、太く海草状を呈しており、またその多くは屈曲していた。

v) estradiol投与後24時間目の上皮表面の微細構造 (Fig. 7a, 7b)

この時期の上皮表面は、その細胞境界は隆起して明瞭となり、細胞質の中央部が浅い陥凹を示し、細胞表面は全般的に鱗片状として観察される。また細胞質突起は明らかに小型化しており、その数も1細胞につき1~2個と減少していた。

他方、微絨毛は依然繁茂しているが、その長径は明らかにより短小化しており、また屈曲している。またこのさいの透過型電顕所見では、細胞表面の微絨毛の短縮やその配列の不規則化がみられ、apical vesicles

Fig. 5. Luminal surface of rat uterus, at 12 hour after the injection of estradiol 0.1 μ g. (with C.P.D.).

Many cellular protrusions are wrinkled. Occasionally thin foil like structure is attached to the protrusion. Microvilli are short, irregular. Some of them show baloon-like bulgings.
×9800.

は著明に減少, Golgi 装置も縮少していた (Fig. 7b).

B. 性ステロイド投与による卵巢剔除ラット内膜の表面超微細構造の変化

i) 卵巢剔除無処置群の内膜上皮表面 (Fig. 8.)

本群の内膜表面上皮は, 既報¹³⁾した L₂ 卵巢剔除無処置ラットの L₁₀ 相当内膜上皮表面と, きわめて近似しており, 細胞境界は突出して明瞭で, その輪郭は亀甲状を呈して sharp であり, 丈の短い長径 0.2~0.5 μ 大の微絨毛が粗に分布しているのが観察された. 他方, 巨大な細胞質突起はほとんど認められず, 小型 apocrine 様の突出物が極少数散見されるのみであつた.

ii) progesterone 投与 (4 mg/日 7 日間) 群の内膜上皮表面 (Fig. 9, 10a, 10b, 10c, 11)

本群の内膜表面上皮は, 細胞境界は少しく突出して明瞭で, その輪郭は多角形を呈し, その表面は少しく陥凹やや褶曲しており, 形の整つた微絨毛が繁茂して, 直径 1~3 μ の細胞質突起が各細胞にほぼ 1 個ずつ分布していた (Fig. 9). これら細胞質突起の形態はさまざまで, 微絨毛がクレーター状に隆起した細胞質の表面を被うもの (Fig. 10a), 微絨毛を欠く巨大な細胞質突起の中央部が陥凹して, その陥凹部内にさらに隆起物のみられるもの (Fig. 10b), さらに突起全体が入道雲のように物質の放出を思わせるもの (Fig. 10c)

Fig. 6. Luminal surface of rat uterus, at 16 hour after the injection of estradiol 0.1 μ g. (with Tokunaga's method).

A cellular protrusion concaved in the center and many small macroapocrine-like structures are seen. Microvilli are densely arranged but shorter and more bended than those before the treatment of estradiol. $\times 4500$

Fig. 7a. Luminal surface of rat uterus, at 24 hour after the injection of estradiol $0.1\mu\text{g}$. (with Tokunaga's method). Most of cellular protrusions are wrinkled. Cellular surface is generally flattened. Microvilli are shortening and are more bended. $\times 4500$.

Fig. 7b. Profile of luminal epithelium of rat uterus, at 24 hour after the injection of estradiol $0.1\mu\text{g}$. Microvilli are shortened and sparsely arranged. Apical vesicles are mostly disappeared. $\times 10500$

Fig. 8. Luminal surface of rat uterus castrated for 2 weeks (with C.P.D.). Cellular border is markedly clear and cellular surface is generally concave. Short microvilli distribute very sparsely. Occasionally small globular bulging at the top of the microvillium is observed. $\times 10005$

Fig. 9. Luminal surface of a rat treated with daily injection of progesterone 4mg for 7 days. (with C.P.D.). Arrangement of microvilli is dense, a large cellular protrusion and a few "sea-anemone-like formations" are seen. $\times 9000$.

Fig. 10. Various forms of cellular protrusions. Treated with daily injection of Progesterone 4mg for 7 days. (with C.P.D.).

- a. A crater-like protrusion with many microvilli on its surface. $\times 12000$.
- b. Note the globular structure in the center of the protrusion. $\times 12000$.
- c. Protrusion with a structure like a gigantic column of clouds, releasing from it. $\times 11300$.

などが観察できた。

すなわち、これらの所見は細胞質突起が黒住のいう放出機序Ⅱ型を営む可能性のあることを示唆している。

このほか、ほとんどの細胞表面に微絨毛あるいは触手様構造の集合した突出物が認められており、とくにこの内巨大なものは、腺開口部様陥凹部近傍で多く認められた。すなわち本構造は *Psychoyos* (1971)¹¹⁾ のいう、いわゆる “sea-anemone-like formations” に相当するものと思われる。また少数ではあるが、微絨毛の先端部に一致して球状の構造が認められる (Fig. 11.)。

iii) estradiol 投与群の内膜上皮表面 (Fig. 12a, 12b)

estradiol 投与 (0.1 μ g) 12時間目における上皮表面の構造は、卵巣剔除時内膜とその概観はかなり近似しているが、このさいの微絨毛は明らかに伸長しており、またその先端部に一致して 0.4~1.2 μ 大の球状の構造物が付着、分布しており、その小さいものは微絨毛と明らかに連続性をもっていることが観察できた。このような特異な形態像は、われわれの行なつた estradiol 2 μ g 子宮腔内注入後、24時間目の卵巣剔除内膜表面上皮にみられた微絨毛の先端部膨潤あるいは polyp 様変形と符合する所見 (Fig. 12b) であり、本所見は明らかに黒住のいう分泌様式第Ⅲ型 (microapocrine) の走査型電顕所見を示すものと思われる。

iv) progesterone-estradiol 順次投与群の内膜上皮表面 (Fig. 13.)

progesterone を 4 mg/日、7日間投与した後、estradiol 0.1 μ g を投与し、その12時間目の内膜を観察した。このさいの内膜は全般的に褶曲し、細胞境界は少しく突出するものの概して不明瞭である。またその輪郭は丸味を帯び、細胞質突起の数は1細胞あたり3~4個と progesterone 単独投与群と比較して明らかに増加しており、またその大きさも直径 0.4~2.4 μ 大とさまざまであるが、estradiol 投与後の遅延着床内膜

Fig. 11. Luminal surface of a rat treated with daily injection of progesterone 4mg for 7 days. (with C.P.D.).

A large “sea-anemone-like formation” near-by a concave suggested the glandular orifice and small globular bulgings at the top of microvilli are seen. $\times 15000$.

において觀察された細胞質突起と同一性格の, つまり macroapocrine 様分泌放出後の細胞質突起とも思われるものを数多く認めた。

またこのさいの微絨毛は短小化し, その先端部は太く, その多くは屈曲化しており, さらに微絨毛先端部の microapocrine 様突起も progesterone 単独投与群に比し増加していた。

Fig. 12a. Luminal surface at 12 hour after the injection of estradiol 0.1μ . (with C.P.D.).

Globular structures are attached to the top of microvilli and small one is continued with the underlying microvillium.

Generally, the microvilli are slightly longer than those of castrated rats, but they are bulged and clubbed like at the top of them. $\times 15000$.

Fig. 12b. Profile of the luminal epithelium in the castrated rat, at 24 hour after the intraluminal injection of estradiol 2μ g.

Note the marked bulging at the top of the microvillium. $\times 18300$.

Fig. 13. Luminal surface, at 12 hour after the sequential administration of progesterone and estradiol (with C.P.D.). Similar picture to those observed at 12 hour after the injection of estradiol in delayed implantation are seen. $\times 4500$.

Fig. 14. Estrogenic Transformation of Luminal Epithelium in Delayed Implantation.

— SEM and TEM findings —

III 考 按

組織の表面構造はそれ自体固有の機能を何等かの形で表現しているものである。

そこで著者らは胚着床の機序を形態学的に究明する手段の一つとして、以上のごとき実験を行なつた。

まず、胚着床阻止環境にある遅延着床時内膜の表面上皮超微細構造に関して、Enders (1967)²⁾ は透過型電顕を用い、このさいの内膜表面上皮の微絨毛は粗に分布し、また短小であるとしているが、この見解は著者らの走査型電顕を用い繁茂せる微絨毛の存在を確かめ得た今回の検索結果と明らかに相反するものである。

また Nilsson (1972)¹⁰⁾ はこのさいの微絨毛に microdroplet の付着をみ、こうした小構造は恐らくは微絨毛の分泌機能と相関を持つであろうと推定しているが、著者らの今回の成績では microdroplet の付着は必ずしも明確でなく、この点標本作製技術の問題をも含め、さらに詳細な検討を要するものと思われる。

しかしながら、Nilsson (1972)¹⁰⁾ や Psychoyos ら (1971)¹¹⁾ の指摘する細胞質突起やいわゆる “sea-anemone-like formations” に関しては、本研究においても豊富に認めることができた。前者は透過型電顕所見上のいわゆる “fungus-like protrusion” に明らかに該当するものと考えられるが、後者の透過型電顕像の詳細に関しては現在のところ明確でなく、Psychoyos ら (1971)¹¹⁾ は単に protrusion に相当するとしており、なお今後の検討が必要である。

ところでこのような protrusion や “sea-anemone-like formations” についてであるが、Psychoyos (1971)¹¹⁾、Nilsson (1972)¹⁰⁾、Berrgström ら (1973)¹²⁾ は胚は遅延着床下においても protrusion と密接し、加えて protrusion は表面上皮から離出、その胞体内に含まれる蛋白性物質を放出するという観点から、protrusion は微絨毛とともに、胚への重要な蛋白性物質、アミノ酸補給路と考えている。事実、谷 (1974)¹⁵⁾ も妊娠ラットを L₂ に卵巣剔除、以後 progesterone を投与せずそのまま放置すると、胚回収率は L₈ 以降著しく低下することを認めており、またこのさいの上皮表面構造について検討した著者らの研究結果 (1974)¹³⁾ によると後述する卵巣剔除時内膜と同様に、protrusion を欠いているのでこの可能性はきわめて強いと推定される。

また本研究においては微絨毛に明確な microdroplet こそ認め得なかつたものの、前述した通り、微絨毛に少数の microapocrine 様突起の形成や分泌物の流出を思わしめる不規則な陥凹を持つ protrusion を認めており、本所見は上皮胞体内に豊富にみられる限界膜を持つ apical vesicles の存在、あるいは発達した Golgi 装置の所見などととも、微絨毛や protrusion の分泌能を明示するものとも考えられる。

次に著者らは遅延着床ラットに着床誘導量の estradiol を投与、このさい生じる内膜の超微細表面像の変化を経時的に追究してみた。

この結果、estradiol 投与 8 時間後に内膜被覆上皮表面の一般的な膨隆、微絨毛の短小、増巾、または不整化、さらに多数の apocrine 様突起の形成をみ、16 時間後では微絨毛が一層短小、屈曲し、扁平化するほか、恐らくは胞体内容の流出に起因すると考えてよい細胞質表面の平坦化、あるいは中央部が陥凹し、表面の著しく褶曲した細胞質突起が多数観察された。

すなわち、これらの所見は遅延着床内膜表面上皮は estradiol の投与を trigger として開口分泌 exocytosis, eruptocrine あるいは apocrine 分泌の著しい亢進をみ、その後分泌の低下をきたすとともに、胞体内容の流出に基づく上皮の扁平化を招来することを示唆するものと解釈することも可能である。

またこれに関連して、このさいの従来の組織化学的検索結果についてみれば、estrogen 投与後表面上皮の核下脂肪の減少 (Takano, 1972¹⁶⁾、Elfrman 1958¹⁷⁾) や上皮遊離面に局在する alkaline-phosphatase 活性の一過性の増強とそれに引き続く低下 (Takano, 1972¹⁶⁾) あるいは上皮胞体の ³H-cystidine, ³H-uridine のとりこみ増加 (Prasad ら 1968¹⁸⁾、Takekida, 1971¹⁹⁾) などの変化が観察されており、この中でも alkaline-phosphatase 活性の上昇や ³H-uridine のとりこみの増加は estradiol によつて誘起される細胞膜透過性の変化あるいは胞体内の蛋白合成の高まりを端的に示唆するものと思われる。

またわれわれの行なつた、このさいの透過型電子顕微鏡所見 (1973)²⁰⁾ を、今回の走査型電子顕微鏡所見

と対比すると Fig. 14 のようである。

すなわち estradiol 投与4時間後に表面上皮の polysome は明瞭となり粗面小胞体の内腔拡大像がみられ、12時間後では apical vesicles の減少、Golgi 装置の縮小、lysosome 系顆粒の増加をみ、24時間後にはこれらの所見に加えて微絨毛の短縮やその配列不整化が出現し、前述の走査型電顕所見とよく符号する所見が多く認められた。

そしてとくに、このさいの表面上皮の attachment reaction つまり同部にみられる apical vesicles の減少、lysosome 系顆粒の増加、微絨毛の短縮不整化が開口分泌もしくは apocrine 様分泌の動態と恐らくは密接な関連性をもつことは、Douglas ら (1971)²⁰⁾ の提唱する exocytosis-endocytosis cycle の問題にも関連して、一応注目すべき所見と考えられる。

また Potts ら (1967)²¹⁾ は透過型電顕を用いて、このさいの apical vesicles の減少が上皮表面からの protrusion の遊離もしくはその崩壊に起因すると解釈しているが、こうした考え方も protrusion の開口分泌を思わせる所見を認め得た今回のわれわれの成績を支持するものと考えられる。

ところで、性ステロイドの投与により誘起される卵巣剔除時内膜の超微細表面像の変化に関しては、前述したごとく、卵巣剔除時の内膜表面構造は平坦で、短い微絨毛が粗に分布、極少数の小型 apocrine 様突起の散在を認め得たに過ぎなかつたが progesterone 投与下では、その様相は一変し、繁茂する微絨毛や少数の小型 apocrine 様突起のほか、このさいの特異的な構造として cellular protrusion あるいは “sea-anemone-like formation” の出現をみ、一見して遅延着床時のそれときわめて近似する所見が得られた。

またさらに、progesterone 投与下にみられる protrusion の形態はさまざまで、その間にいくつかの移行型とみてよい多彩な構造を認め得ることについては前記した通りである。

これに対して estradiol 投与下では、その特徴的な所見として微絨毛に多数の microapocrine 様突起の形成が認められたが、本所見は同じ条件下で透過型電顕による観察を行なつた Ljungkist (1972)²²⁾ の報告では明確な記載がなされていない。

さらに progesterone と estradiol の順次投与で microapocrine 様突起の形成のほか、macroapocrine 様分泌後の protrusion を思わせる構造を多数観察できた。

すなわち、以上の知見から、少なくとも著者らの行なつた実験条件下では protrusion の形成は主として progesterone 依存性、他方 microapocrine 様突起の形成はおもに estradiol に依存していることが明らかであり、また progesterone-estradiol 順次投与下の超微細表面像は estradiol 投与後の遅延着床内膜ときわめて類似していることも判明した。

ところで腺細胞の分泌物放出過程に関しては、古く Ranvier (1887)²³⁾ により全分泌 holocrine と部分分泌 merocrine に二大別されており、その後、Schiefferdecker (1992)²⁴⁾ は後者をさらに離出分泌 apocrine と漏出分泌 eccrine とに細別している。

また比較的最近になつて黒住 1965²⁵⁾ は透過型電顕所見から、分泌物の放出形態を i) 全分泌 holocrine mechanism, ii) 大離出分泌 macroapocrine mechanism, iii) 小離出分泌 microapocrine mechanism, iv) 開口分泌 eruptocrine, reverse pinocytosis, v) 透出分泌 transmembranous permeation の5型に分類し、臓器特殊性はあるが、一般に正常状態では多くの場合 iv), v) の様式をとることが多く、これに対して ii), iii) の分泌型式は強い刺激下でのいわば強制放出様式とみなすことが可能であると、また Smith (1971)²⁶⁾ や菅野 (1972)²⁷⁾ らはいわゆる Ca 依存性開口分泌は内分泌性、外分泌性腺細胞のみならず、コリン作働性、アドレナリン作働性 neuron や多型核白血球、塩基性白血球、肥満細胞、血小板などの遊離細胞においても認められることを明らかにした。

しかしながら、これらの分泌形態とくに macroapocrine, eruptocrine についての走査型電顕像に関する知見はなお乏しく、また macroapocrine 分泌自体の実在に関しても黒住 (1971)²⁸⁾ が述べているように、今後追求する余地が多々残されているというのが実状である。

したがって、こうした問題点はここでは一応おくとしても、estrogen の投与によつて誘導される表面上

皮の apocrine 様突起の形成は、膜透過性の変化に基づく、おそらくは一種の強制放出様式とみることも可能であり、このような分泌物の放出は胚着床過程において恐らくは胚の活性化 (active blastocyst) に直接役立つとともに、分泌物自体の胞体外流出に由来する表面上皮の扁平化を必然的に招来し、このようにして菲薄化した表面上皮は、胚の内膜固定化に、あるいは胚性刺激伝達路として、より有効に機能することが考えられる。

他方 estrogen の生物学的作用に関しては、従来主としてその gene regulation に起因する細胞増殖作用が注目されてきたが、progesterone priming 下の内膜上皮において、estrogen は一過性の分泌機能を誘起したのち、ついで上皮の菲薄化さらに autodegeneration を招来するという事実は、Saunders ら (1962)²⁹⁾ の細胞変性も gene regulation の統御下にあるという見解を考慮するとき、trophoblastic invasion の機序 (Finn ら 1964)³⁰⁾ と関連して、はなはだ興味ある知見であると思われる。

結 論

ラット着床過程における子宮内膜上皮表面の微細構造の変化とその内分泌調節の実態を究明する目的で、遅延着床、卵巣剔除動物を用いて、走査型電子顕微鏡による観察を行ない、次のような結果を得た。

1) 遅延着床時内膜の上皮表面は数多くの巨大な細胞質突起を認め、微絨毛は比較的繁茂しており、少数ながら microapocrine 様突起の形成も認められた。

2) 遅延着床ラットに着床誘導量の estradiol を投与した結果、投与8時間目を中心に内膜上皮の分泌亢進を思わせる像が出現し、その後、分泌現象の低下をきたすとともに、上皮の扁平化や細胞質突起の萎縮、微絨毛の短小屈曲化などの所見が観察された。

3) 卵巣剔除ラット内膜表面の微絨毛は短小でその分布も粗であつたが、progesterone 投与時では比較的繁茂する微絨毛と巨大な細胞質突起の形成が観察でき、一方 estradiol 投与群ではその12時間目に微絨毛の先端部に多数の microapocrine 様突起の形成が認められた。またさらに progesterone-estradiol 順次投与群においては同様の microapocrine 様突起が多数形成されるとともに、macroapocrine 様分泌後と思われる細胞質突起が多数認められ、これらの状態は、estradiol 投与後の遅延着床内膜ときわめて類似していた。

4) 最後にこのような内膜上皮表面の微細構造の変化とその胚着床に關与する機能的意義についても論及を加えた。

おわりに本研究の遂行にあたり、御指導、御校閲賜りました東條伸平教授に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Blandau, R.J.: Biology of eggs and Implantation in "Sex and internal secretions" (Young, W.C.; ed.), 3rd. (1961) Vol. 2, 797, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- 2) Enders, A.C. and S.J. Schlafke: Am. J. Anat., 120: 185, (1967).
- 3) Mayer, G., O. Nilsson and Reinius: Z. Anat., 126: 43 (1967).
- 4) Potts, M.: The ultrastructure of egg implantation. In advances in reproductive physiology (McLaren, A.; ed.), Vol. 4, (1969), 241, Logos Press, London.
- 5) Nilsson, O.: Ovo-Implantation. Human Gonadotropins and Prolactin, (1970), 52, S. Karger Basel München, New York.
- 6) Tachi, S., C. Tachi and H.R. Linder: J. Reprod. Fert., 21: 37, (1970).
- 7) 飯塚理八: 第23回日本産科婦人科学会総会宿題報告要旨, (1971).
- 8) 林 要, 李文遠, 松岡謙二, 武木田博祐: 日内泌誌, 48: 533, (1972).
- 9) 林 要, 李文遠, 松岡謙二: 日産婦誌, 25: 1208, (1973).
- 10) Nilsson, O.: J. Ultrastructure Research, 40: 572, (1972).
- 11) Psychoyos, A. and P. Mandon: J. Reprod. Fert., 26: 137, (1971).
- 12) Bergström, S., and O. Nilsson: J. Reprod. Fert., 32: 531, (1973).
- 13) 林 要, 浜西正三, 李文遠: 日産婦誌, 26(1), 69: (1974).
- 14) 徳永純一, 幡場良明: 細胞, 3(13): 17, (1971).
- 15) 谷立夫: 日産婦誌,

- 26(4), in press, (1974). 16) Takano, S. : Kobe Journal of Medical Science ; 18 : 179, (1972).
17) Elftman, H. : Endocrinology, 62 : 410, (1958). 18) Prasa, M.R.N., C.M.S. Dass and S. Mohla : J. Reprod. Fert., 16 : 97, (1968). 19) Takekida, H. : Acta Obstetrica et Gynecologica Japonica, 18 : 200, (1971). 20) Douglas, W. W., J. Nagasawa and R. Schulz : Mem. Soc. Endocrinol., 19 : 353, (1971). 21) Potts, M. and A.C. Psychoyos : r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris. 264 : 370, (1967). 22) Ljukvist, I. : Fert. Steril., 23 : 847, (1972). 23) Ranvier, L. : J. de Microgr., 11 : 7, (1887). 24) Schiefferdecker, P. : Zoologica, 72 : 1, (1922). 25) 黒住一昌 : J. Electron Microscopy, 14 : 12, (1965). 26) Smith, A.D. : Phil. Trans. Ray, Soc. Lond. B., 261 : 423, (1971). 27) 菅野富夫 : 臨床生理, 2 : 35, (1972). 28) 菅野富夫, 柴崎晋, 中尾真, 渡辺陽之輔, 山元寅男, 黒住一昌 : 医学のあゆみ, 79 : 267, (1971). 29) Saunders, J.W. JR., M.T. Gasseling and L.G. Saunders : Devl. Biol., 5 : 147, (1962). 30) Finn, C. A. and J.R. Hinchliffe : J. Reprod. Fert., 8 : 331, (1964).