Change in the Electrical Impedance Caused by Cornification of the Epithelial Cell Layer of the Vaginal Mucosa in the Rat

Masao KOTO, Masao MIWA, Ko-ichiro TSUJI,
Michio OKAMOTO, and Jiro ADACHI

*Drug Development Laboratories, CHUGAI Pharmaceutical Co., Ltd.,
Takada 3-41-8, Toshima, Tokyo 171, Japan*

(Received 22 August 1986/Accepted 14 January 1987)

The electrical impedance in the vagina (EIV) is significantly high in the proestrus stage compared with other stages of the estrous cycle in rats. Therefore, the EIV can be used to detect the optimum day for mating. The relation between the EIV and the conditions of the epithelial cell layer of vaginal mucosa were investigated. The EIV was at a high level (over $3,000\Omega$) in vaginas in the proestrus stage in either intact or excised vaginal mucus. But it decrease (under $3,000\Omega$) after the epithelium of the vaginal mucosa was removed. The EIV of ovariectomized rats was low, but increased after Estradiol administration. The cornification of the epithelial cell layer of the vaginal mucosa occurred concurrently with the high EIV in the proestrus stage and after Estradiol administration. This indicates that the cornification of the epithelial cell layer of the vaginal mucosa may cause the elevation of EIV in the proestrus stage, the optimum day for mating in the rats.

膣粘膜上皮の角化によるラットの膣インピーダンス (EIV) の変化

古藤正男・三輪政夫・辻 紘一郎・岡本道生・安達二郎

中外製薬㈱開発研究所

動物を計画的に交配し効率よく生産して行くためには交配適期を正確に知ることが必要である。交配適期の判定には種々の方法が用いられているが、その中でも発情期の膣粘膜や子宮頸管粘液の物性変化を数量的に捉え、明確に判定しようとする試みが盛んに行われるようになった。牛、羊、山羊、豚などの家畜では膣粘膜や子宮頸管粘液の pH [14, 15], 電気抵抗 [5, 6, 8, 17-19], 通電性 [1, 15] などの物性が発情期を中心に変化することが知られており、それらは交配適期の判定に応用され、有

効な方法と評価されている。

実験動物においても、ラットおよびモルモットでインピーダンス（交流電気抵抗）を指標とした交配適期の判定法が報告されている[2-4, 20]。また、著者らは著者らの開発した測定器を用いて Wistar-Imamichi 系ラットの性周期に伴う膣インピーダンス (EIV) の変化について観察し、EIV の値 $3,000\Omega$ を境とし、それより高いときは Proestrus に、それより低いときは他の相に区別され、EIV 測定がラットの交配適期の判定に利用でき、

その的確率が高いことを報告した [10]。しかし、なぜ Proestrus に EIV が上昇するのかについての詳細な検討はない。ラットの膣の性周期に伴う変化として pH [9]、細菌数 [9, 11]、粘膜上皮の変化 [7, 13] などがあり、いずれもが粘液あるいは粘膜のインピーダンスに影響していると考えられる。また、皮膚角化層が皮膚インピーダンスに大きく影響することが知られており [21, 22]、膣粘膜上皮の変化とくに Estrogen による粘膜上皮の角化が粘膜インピーダンスに大きく影響し、EIV を上昇させているのではないかと考えられる。そこで膣粘膜の性状の変化、とくに角化と EIV の上昇との関係について検討した。

本報告はラットの Proestrus における EIV の上昇が Estrogen (卵巣ホルモン) の作用による膣粘膜上皮の角化に起因していることを明らかにしたものである。

材料および方法

性周期が4日で回帰するように育種された Csk: Wistar-Imamichi 系ラット (自家繁殖) の8~12週雌雌を用いた。固形市販飼料 (CE-2: 日本クレア) と水 (市水と井水の混合水) を自由に摂取させ、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50~60%、5 時点灯 19 時消灯に設定された動物室で、金網床ブラケット型ケージ (660×310×220 mm) に 10 匹づつ収容して群飼育した。EIV 測定方法および機器はすでに報告した通りである [10]。

性周期各相の EIV は無処置、粘液除去、粘膜上皮除去の各処置群を設けた。まず EIV を測定したのち膣スメアを採取してそのスメア像を観察し、信永 & 中村の判定基準 [16] に従って性周期相を判定し、Proestrus, Estrus, Metestrus, Diestrus の4つの相を示すラットを各相 5 匹づつ用意した。次にラットを屠殺して膣を摘

出し、粘膜面をリン酸緩衝液 (pH 6.8) でよく洗浄して粘液を除去し、さらに脱イオン水でリン酸緩衝液を洗い流し、余分な水分を濾紙で除いたのち、その膣を測定用プローブに巻きつけるようにして密着させてインピーダンスを測定した。この値を粘膜除去状態における EIV とした。リン酸緩衝液 (pH 6.8) は第一リン酸ナトリウム 1 水塩 5.92g と第二リン酸ナトリウム 12 水塩 54.52g に蒸留水を加えて 1 ℓ としたものを用いた。さらにその膣の粘膜面をカミソリの刃で 10 回程度こすった後、同様にしてインピーダンスを測定した。この値を粘膜上皮除去状態の EIV とした。これらの処置および測定は 13 時から 15 時の間に速やかに行い、有意性の検定には t 検定を用いた。

性周期各相の膣粘膜組織像を観察した。前述の粘液除去状態の性周期各相の膣を 10% ホルマリンで固定した後、常法に従ってパラフィン包埋、薄切、HE 染色を施し鏡検した。材料の採取は 13 時から 15 時の間に行った。

また 4 日性周期を回帰している雌ラット 14 匹の卵巣を摘出し、卵巣摘出後の EIV の変化を観察した。次に卵巣摘出 4 週間後に性周期が消失していることを確認した後、5 匹に Estradiol-17 β (以下 E2) を 9 時に皮下投与し、投与後 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 時間の EIV を測定してその変化を観察した。投与量は予備検討で明らかな EIV の上昇が得られた 20 μg とし、E2 は 100 μg をオリーブ油 1 ml に溶解して用いた。対照として 5 匹にオリーブ油 0.2 ml を投与して同様に観察した。さらに 4 匹に E2 を同様に投与し、0, 24, 48, 96 時間後における膣粘膜の組織学的観察に各 1 匹づつ用いた。

成 績

性周期各相の膣の無処置および粘液除去、粘膜上皮除

Table 1. The EIV under different conditions of the vaginal mucosa.

Condition	EIV (Ω)			
	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Intact ¹	5,960 $\pm$ 2,420**	1,710 $\pm$ 620 ^a	1,670 $\pm$ 430	1,410 $\pm$ 450
After removing the mucus ²	7,840 $\pm$ 4,970**	2,160 $\pm$ 610	980 $\pm$ 430	1,360 $\pm$ 450
After removing the epithelia ³	2,160 $\pm$ 260	1,720 $\pm$ 590	800 $\pm$ 0	1,280 $\pm$ 440

1: Estrous stages were detected by vaginal smear cytology. The vaginal smear was taken after measuring the EIV in intact rats.

2: The mucus was washed off by phosphate buffer (pH 6.8).

3: The epithelia were scraped off with a razor blade.

** : Significant ($p < 0.01$) compared with other stages under the same condition,

a : mean $\pm$ S.D.

去の処置を行った状態での EIV を Table 1 に示した。各状態での値を性周期各相間で比較すると、無処置の場合は Proestrus だけが有意に高く、他の相の間には差がなかった。粘液除去状態でも Proestrus だけが有意に高かったが、粘膜上皮除去状態では Proestrus の値は低下し、他の相と差がなくなった。他の性周期相に関しては Metestrus で粘液除去により EIV の低下がみられたが、Estrus, Diestrus では粘液、粘膜上皮を除去しても EIV の変化はほとんどみられなかった。

4 日性周期を回帰し、性周期に伴う周期的な EIV の変化を示していたラットの卵巣を摘出すると、性周期およびそれに伴う周期的な EIV の変化は消失して EIV は低値 (800~1,200 Ω) を維持した。こうした卵巣摘出ラットに E2 を投与した後の EIV の変化を Table 2 に示した。E2 投与後の EIV は投与後36時間から上昇し、48時間には 5,000 Ω に達し、その後低下して96時間には 0 時間の値に復帰した。一方、オリーブ油のみを投与し

Table 2. Changes in EIV after Estradiol (20 μg) administration in ovariectomized rats.

Hours after administration	EIV (Ω)	
	Control ¹ (n=5)	Estradiol ² (n=5)
Pre	820±110 ³	750±130
12	840±110	820±150
24	1,080±180	1,020±150
36	920±80	1,480±260
48	900±100	5,200±2,350
60	900±100	2,320±720
72	880±110	1,540±240
84	880±110	1,360±230
96	900±140	980±110

- 1: Olive oil 0.2 ml s.c.
- 2: β-Estradiol 20 μg/0.2 ml of olive oil s.c.
- 3: mean±S.D.

た対照群では EIV は変化しなかった。
性周期各相の膣粘膜組織像を Fig. 1 に示した。性周期各相の膣粘膜の構築の違いは粘膜上皮にあり、固有層

A: Proestrus. B: Estrus. C: Metestrus. D: Diestrus. Note the cornified epithelial cells in A.
Fig. 1. Vaginal mucosa from rats at the 4 stages of the estrus cycle.

A: before. B: after 24 hrs. C: after 48 hrs. D: after 96 hrs. Note the cornified epithelial cells in C.

Fig. 2. Change in the vaginal mucosa after Estradiol administration in ovariectomized rats.

以下には違いを認めなかった。Proestrus の上皮では角化した上皮細胞の重積による角化層が形成されていた (Fig. 1-A)。また, Estrus の上皮は重層扁平上皮細胞で, Metestrus, Diestrus の上皮は円形の上皮細胞で構成されていた (Fig. 1-B~D)。

卵巣摘出後のラットの E2 投与前および投与後 24, 48, 96 時間の膣粘膜上皮組織像を Fig. 2 に示した。E2 投与前および投与後 24 時間の膣粘膜上皮は Metestrus や Diestrus のそれと同じ円形の上皮細胞で被われていた。投与後 48 時間の上皮では Proestrus のそれと同じ角化層が形成され、96 時間では Estrus のそれと同じ重層扁平上皮細胞で被われていた。

考 察

Proestrus の EIV は無処置の場合には他の相に比して有意に高く、粘液を除去した後も同様に高かった。し

かし膣粘膜上皮を除去すると大きく低下し、他の相と差がなくなった。他の相の値は膣粘膜上皮を除去しても大きく変化しなかった。このことから Proestrus における EIV の上昇は、膣粘膜の性状性質の違いによるものと考えられた。Proestrus, Estrus においては粘液を除去すると EIV が高まる傾向にあり、これらの相では粘液が EIV をわずかに低下させていることも考えられるが、その変化は膣粘膜上皮除去による変化に比べて小さく、粘膜上皮の性状、性質の違いの方が EIV に与える影響がはるかに大きいと考えられる。

Proestrus と E2 投与後 48 時間の膣粘膜上皮には角化上皮細胞層が形成されており、この時期に一致して高い EIV が観察された。他の各相の膣粘膜上皮は円形の上皮細胞あるいは扁平上皮細胞で構成されており、EIV は粘膜上皮の角化と密接に関係しており、角化により EIV が高まると考えられる。

E2 20 μ g の投与は膣スメア中への角化細胞出現に必要

な量としては大量であると思われるが、明らかな EIV の上昇を示すような重層の角化層の形成には 20 μ g 程度の E2 投与が必要と考えられる。

また、ラットのの性周期各相の腔粘膜組織の構築についていくつかの報告があるが、今回の成績では異なる点があった。すなわち、Long & Evans の報告によれば stage 1 (I) の腔粘膜上皮は同時期に腔スミア中に認められる円形上皮細胞で構築され、角化上皮は stage 2 (II) で認められている [13]。彼らの腔スミアによる性周期の判定基準の stage 1 (I) は信永 & 中村の基準 [16] に従った今回の Proestrus と一致する。また、Fox & Laird も腔スミアに円形上皮細胞のみが認められる Proestrus では腔粘膜上皮は円形上皮細胞で構築されていると報告している [7]。しかし、今回、Proestrus の腔粘膜上皮には円形上皮細胞層は認められず、すでに重層の角化上皮細胞層が形成されていた。これらの違いの原因としては、用いているラットの系統が異なることや、材料採取時刻、採取方法などに違いがある可能性が大きいこと、あるいは今回の検討では材料採取前に EIV を測定していることなどが考えられる。

皮膚インピーダンスに対する表皮角化層インピーダンスの影響は極めて大きく、とくに表皮に近い部分ほど抵抗値が大きいこと、表皮を剝離していくと抵抗値が減じてくることが知られている [21, 22]。同様に腔粘膜においても粘膜上皮の角化層が抵抗値に大きく影響していると考えられる。

以上のことから、EIV は測定時の粘膜上皮が角化しているか否かにより、その値は大きく変わり、ラットの Proestrus における EIV の上昇は Estrogen の作用による腔粘膜上皮の角化に起因していることが示唆された。

要 約

ラットの腔の交流電気抵抗 (EIV) は Proestrus に高い周期的な変化が認められ、交配適期の判定指標のひとつとして利用されている。今回、EIV の性周期に伴う変化の起因を明らかにする目的で、ラットの腔粘膜と EIV の値の関係について検討した。Proestrus の日の EIV は粘液を取り除いても高値 (3,000 Ω 以上) を維持したが、粘膜上皮を除去すると低値 (3,000 Ω 以下) になった。EIV が低値を維持している卵巣摘出ラットに Estradiol を投与すると投与 48 時間後に EIV は高値になった。Proestrus および Estradiol 投与後の EIV が高い時期には腔粘膜に必ず角化上皮細胞が観察された。

したがって、ラットの EIV が Proestrus に高く性周期にもなって変化するのは、Estrogen によって腔粘膜上皮が角化されることに起因していると考えられた。

文 献

- [1] Adam, L., Aizinbud, E., Tadmor, A., and Schindler, H. (1981). Impedometric properties of the vulvar and vaginal tissues of ewes during the estrous cycle. *J. Reprod. Fert.*, **61**, 11-17.
- [2] Bartoš, L. (1975). Oestral cycle phase determination by means of electrical impedance measurements of vaginal mucous membrane in rat. *Physiol. bohemoslov.*, **24**, 427.
- [3] Bartoš, L. (1977). Vaginal impedance measurement used for mating in the rat. *Lab. Anim.*, **11**, 53-55.
- [4] Bartoš, L., and Sedláček, J. (1977). Vaginal impedance measurement used for mating in the guinea pig. *Lab. Anim.*, **11**, 57-58.
- [5] Carter, P. D., and Dufty, J. H. (1980). Assessment of vaginal impedance measurements as an indicator of oestrus in cattle. *Australian Vet. J.*, **56**, 321-323.
- [6] Edwards, D. F., and Levin, R. J. (1974). An electrical method of detecting the optimum time to inseminate cattle, sheep and pig. *Vet. Rec.*, **95**, 416.
- [7] Fox, R. R., and Laird, C. W. (1970). Sexual cycles. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals, pp 115-118, Hafez, E. S. E. (edit.), Lea & Febiger, Philadelphia.
- [8] Gertland, P., Schiavo, J., Hall, C. E., Foote, R. H., and Scott, N. R. (1976). Detection of estrus in dairy cows by electrical measurements of vaginal mucus and by milk progesterone. *J. Dairy Sci.*, **59**, 982-985.
- [9] Koiter, T. R., Hazenberg, M. P., and Van der Scott, P. (1977). Regulation of the bacterial microflora of the vagina in cyclic female rats. *J. Exp. Zool.*, **202**, 121-128.
- [10] 古藤正男・三輪政夫・富樫 守・辻紘一郎・岡本道生・安達二郎 (1987). 腔電気インピーダンスによる 4 日性周期ラットの交配適期判定法. 実験動物, **36**, 195-198.
- [11] Larsen, B., Markovetz, A. J., and Galask, R. P. (1977). Relationship of vaginal cytology to alterations of the vaginal microflora of rats during the estrous cycle. *Appl. Environment. Microbiol.*, **33**, 556-562.
- [12] Leidi, W., and Stolla, R. (1976). Measurement of electric resistance of the vaginal mucus as an aid for heart detection. *Theriogenology*, **6**, 237-246.
- [13] Long, J. A., and Evans, H. M. (1922). The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.*, **6**, 1-148.
- [14] 森 純一・檜垣敏之 (1965). 乳牛における雌生殖器官の pH の変化について. 日本獣医学雑誌, **27**, 429.
- [15] 森 純一・富塚常夫・広末政昭・飯屋寛由 (1979). 牛の性周期中における子宮頸管粘液の pH ならびに電気伝導度の変化—生体内測定による検討. 家畜繁殖誌, **25**, 6-10.
- [16] 信永利馬・中村勝美 (1968). Wistar-Imamichi rat の

- 性周期（4日）ならびにこれに伴う生理学的諸現象に関する基礎検討Ⅰ．膣垢像の連続的観察．家畜繁殖誌，**14**，1-7.
- [17] Podany, J., and Muzikant, J. (1970). Cyclic changes in electric resistance measured on the vaginal mucous membrane of cows and heifers during the sexual cycle. *Vet. Med. (Praha)*, **15**, 671-680.
- [18] Podany, J., Muzikant, J., and Canderle, J. (1971). Electric resistance measured on vaginal mucous membrane in pregnant and non-pregnant sows. *Vet. Med. (Praha)*, **16**, 415-420.
- [19] Podany, J., and Muzikant, J. (1972). Electric resistance measured in the vaginal mucous membrane in the course of the sexual cycle in goat and sheep. *Vet. Med. (Praha)*, **17**, 483-486.
- [20] Teradach, C. (1982). Surveillance du cycle sexuel chez le rat par la mesure des variations de la valeur de l'impédance électrique au niveau de la cavité vaginale. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, **7**, 49-54.
- [21] 山本辰馬・山本尚武 (1973). 表皮角質層の電気物性について. 医用電子と生体工学, **11**, 337-343.
- [22] 山本辰馬・山本尚武 (1975). 表皮角質層の積層構造を考慮した皮膚インピーダンスについて. 医用電子と生体工学, **13**, 201-206.