Histochemical Changes in the Endometrium of the Goats during the Course of Estrous Cycle and Pregnancy

Suiho TOKASHIKI and Yoshitsugu KAWASHIMA

*Department of Animal Husbandry, College of Agriculture,
University of the Ryukyus, Naha-shi, Okinawa 903*

Makoto SUGIMURA and Norio KUDO

*Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine,
Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060*

(Received for publication May 25, 1976)

Abstract. Histochemical changes in the amount of glycogen and lipids in the endometrium were observed during the course of estrous cycle and pregnancy of goats, cross-bred of Saanen and native kind of Okinawa.

The results obtained were as follows: 1) In the layer of surface epithelium, a small amount of glycogen and lipids were detected during non-breeding season, while these substances showed a tendency to increase during pregnancy, 2) Glycogen was not present in the glandular epithelium during non-breeding season and estrus, but it tended to increase from the diestrus to the pregnancy. Lipids in the glandular epithelium also increased from diestrus to the pregnancy, and 3) Glycogen-containing cells and pigment cells showing PAS-positive reaction were found in the endometrial stroma. Numerous glycogen-containing cells were found during a certain stage of diestrus and in the all stages of pregnancy. On the other hand, pigment cells were variably observed during the sexual cycle, but were disappeared at the pregnant stage.

ヤギの発情，妊娠にともなう子宮内膜の組織化学的变化について

渡嘉敷 綏宝・川島 由次

琉球大学農学部畜産学科

杉村 誠・工藤 規雄

北海道大学獣医学部家畜解剖学教室

子宮内膜は発情周期ならびに妊娠期を通じて組織栄養素を分泌している。組織栄養素は胚ならびに胎児の栄養源として利用されるが、その分泌の消長については明らかでない面が多い。反芻動物では主としてウシについて Moss et al. [6, 7], Foley et al. [9], 山内ら [15, 16] などによって多くの組織化学的研究がなさ

れている。

一方、ヤギについてのこの種の研究はきわめて少ない。先に著者ら [13] は子宮内膜上皮の間に出現するいわゆる間在細胞や遊走細胞等について報告した。ここでは主として子宮小丘間領域の上皮細胞、子宮腺および内膜支質の若干の細胞と組織栄養素の主要物質と

されるグリコーゲンおよび脂質を指標として発情周期、妊娠の各期を通ずる栄養素の周期的変動を組織化学的にしらべた。

材料および方法

1. 実験材料: 本研究に用いた子宮は1970年9月26日から1975年11月21日の間に沖縄本島においてと殺したヤギ(ザーネン雑種)35例で、そのうち、グリコーゲンの検出に20例、脂質の検出に23例をあてた。

(1) 非繁殖期

ヤギの繁殖期は通常秋から冬の間の短日期にあって[12, 17] 妊娠しない場合はその間数回発情を繰返すようである。一方、春から夏にかけての長日期には通常排卵がないため卵巣には黄体が存在しないといわれている。しかしながらこのような繁殖季節のあるものはザーネン種のような乳用種であって沖縄の在来種は周年繁殖が可能であるといわれている。ザーネン雑種は春夏の候に発情を現わすものとまったく発情しないものがある。ここでは6月から8月にかけて採取した材料中、黄体がなく、卵巣が休止状態にあるものを非繁殖期として取扱った。

(2) 発情周期ならびに妊娠時期の判定

発情周期は発情前期、発情期、発情後期、発情休止期に区分される。使用した材料は生前の経歴が明らかでないため、卵胞の発育と成熟度、排卵の有無、黄体形成とその退化状態を、また、子宮頸管粘液について検垣ら[5]、渡辺ら[14]の方法によってその性状を観察し、両者の結果にもとづき発情周期の時期を判定した。また、妊娠時期については Zietzschmann u. Krölling [18] のヒツジの成績を参考として胎児体長の計測値から推定した。

(3) 妊娠前期、妊娠後期の区分

ヤギの妊娠期間は150～155日、平均152日とされている[10]ため、ほぼ22週とみなし、妊娠11週までを妊娠前期、12週以降を妊娠後期とした。

2. 実験方法: グリコーゲンおよび多糖類の検出には、組織片を80～99.5% alcohol または Carnoy 液で固定した後、常法によってパラフィンに包埋し、6～8 μm の切片を作り、PAS 染色を行なった。なお予め1% ジアスターゼ水溶液 37°C で1時間処理後 PAS 染色を行なった対照切片により、グリコーゲンと多糖類を区分した。

脂質の検出には、10%ホルマリンに固定した材料を10～30 μm の凍結切片とし、ethylene glycol に溶解し

た Sudan black B または 70% alcohol に溶解した Sudan III による脂肪染色を行なった。一方、色素細胞の検出には PAS, ベルリンブルー、トルイジンブルーの各染色を試みた。

グリコーゲン含有細胞と色素細胞の1 mm² 中の細胞数の測定には1 cm² の ocular micrometer を用いて100倍の倍率で4カ所を測定した後、その平均値で表わした。

成 績

1. グリコーゲンと多糖類

子宮内臓上皮(小丘間領域)、子宮腺体部のグリコーゲンの出現状態を発情周期、妊娠期ごとにまとめたものが Table 1 である。

Table 1. Appearance of glycogen in the surface and glandular epithelium in the various stages of estrous cycle and pregnancy

Estrous cycle and pregnancy	Number of Samples	Surface epithelium				Glandular epithelium			
		—	+	++	+++	—	+	++	+++
Non-breeding	2	2				2			
Estrus	4		1	3		3	1		
Diestrus	7	1	5	1		4	2	1	
Early stage of pregnancy	4		1	2	1	1	1	2	
Late stage of pregnancy	3			2	1			2	1

Remarks.

- : Absent.
- +: Trace.
- ++: Small amount.
- +++ : Moderate amount.

Table 2. Appearance of mucoprotein in the surface epithelium in the various stages of estrous cycle and pregnancy

Estrous cycle and pregnancy	Number of samples	Surface epithelium		
		—	+	++
Non-breeding	2		2	
Estrus	4		1	3
Diestrus	7		4	3
Early stage of pregnancy	4			4
Late stage of pregnancy	3			3

Remarks.

- : Absent.
- +: Trace.
- ++: Small amount.

子宮内膜上皮細胞のグリコーゲンの消長をみると非繁殖期では認められないが、発情期、発情休止期には認められる例が多く、妊娠期には増加の傾向が認められた。これらのグリコーゲンは主として上皮の遊離縁側に出現した (Fig. 1) が、一部は細胞質中に分散して存在した。また妊娠期の子宮腔面にはグリコーゲンを含む分泌物が認められた。

子宮腺体部ではグリコーゲンは非繁殖期、発情期には殆んど認められないが、発情休止期、妊娠前期には微量から中等量出現し、妊娠後期には増加の傾向を示した (Fig. 2)。

子宮内膜上皮における mucoprotein の出現状態を発情周期、妊娠期ごとにまとめたものが Table 2 である。

Mucoprotein は非繁殖期には極めて少ないが、発情期、発情休止期には中等量出現する例もあり、妊娠期にはやや増加する傾向がみられる。

内膜支質ではグリコーゲン含有細胞と色素細胞とが PAS 染色陽性を示した。これらの細胞の出現状態を発情周期、妊娠期ごとにまとめたものが Table 3 である。

グリコーゲン含有細胞は非繁殖期には認められないが、発情期、発情休止期には僅かに認められ、妊娠期には増加する。この細胞は緻密層に出現し、約 7 ないし 8 μm の大きさで円形ないし卵円形等多様な形態をとった。核は円く、細胞質は肥大し、グリコーゲン顆粒を含む (Fig. 3)。

色素細胞は非繁殖期や発情周期中に認められる場合

Table 3. Glycogen containing cells and pigment cells in the endometrial stroma in the various stages of estrous cycle and pregnancy

Estrous cycle and pregnancy	Number of samples	Glycogen cells				Pigment cells				
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	
Non-breeding	2	2						1		1
Estrus	4	1	3				2	1		1
Diestrus	7	2	3	2			1	3		3
Early stage of pregnancy	4		1	3		4				
Late stage of pregnancy	3			2	1	1	2			

Remarks.

—: Absent.

+: Trace.

++: Small number.

+++ : Moderate number.

||||: Large number.

Table 4. Appearance of lipids in the surface and glandular epithelium in the various stages of estrous cycle and pregnancy

Estrous cycle and pregnancy	Number of samples	Surface epithelium					Gland epithelium				
		—	+	++	+++		—	+	++	+++	
Nonbreeding	2		1	1			1		1		
Estrus	3			1	2			3			
Metestrus	3			3				2	1		
Diestrus	5			2	3			1	4		
Early stage of pregnancy	5		1	2	2				4	1	
Late stage of pregnancy	5			1	3	1				3	2

Remarks.

—: Absent.

+: Trace.

++: Small amount.

+++ : Moderate amount.

||||: Large amount.

が多いが、妊娠期には数が減少する傾向を示す。この細胞は H・E 染色で褐色にそまる顆粒を含む。この顆粒は PAS 染色で陽性、脂質および鉄反応に陽性であったが、トリインブルー染色ではメタクロマジーを示さなかった (Figs. 4—7)。

2. 脂 質

発情周期の各期における脂質は Sudan III, Sudan black B に好染したが、妊娠期のものは Sudan black B に強染する傾向が認められた。

子宮内膜上皮と子宮腺体部における脂質の出現状態を Sudan black B 染色所見を中心として発情周期、妊娠期ごとにまとめたものが Table 4 である。

子宮内膜上皮の脂質の消長をみると非繁殖期では僅かに観察されるにすぎないが、発情期、発情休止期には増加の傾向を示し、妊娠前期から後期にかけて更に増加した。これらの脂質は微細顆粒状を呈するものが主体である (Figs. 8, 9)。一方、子宮腺体部の脂質は非繁殖期、発情期、発情後期では僅かに認められるにすぎないが、発情休止期にはやや増加し、妊娠期にはさらに増加する傾向がみられた。また、妊娠後期に大量出現した例もあり (Fig. 10)、腺腔内に分泌されている像も認められた。

総括および考察

組織栄養素は着床時から胎盤循環に移行するまで胚ならびに胎児の栄養源として不可欠のものであるが、今回の観察においてはグリコーゲン、脂質とも妊娠が進むにつれてむしろ分泌の増加がみられた。

グリコーゲンは非繁殖期の子宮内膜上皮には認められないが、発情期、発情休止期のそれに出現する場合が多く、妊娠期には量的にも増加する傾向が認められた。子宮腺上皮では非繁殖期、発情期にほとんど認められず、発情休止期に観察された。妊娠期には明らかに認められ、更に妊娠の進むとともに増加する傾向が認められた。

Moss ら [6] はウシの子宮内膜上皮のグリコーゲンについて発情期と発情休止期の末期に多量のグリコーゲンが出現したと述べている。また、ウシの妊娠初期の子宮内膜上皮にグリコーゲン顆粒が多量存在し、子宮腔内にも見られたという [7]。ところが山内ら [16] は妊娠期のウシの子宮内膜上皮のグリコーゲンはきわめて微量であり、その出現例も少なく、また、腺上皮では腺頸部上皮に局在していたと述べている。菅ら [11] は発情休止期中期におけるウシとヤギの子宮内

膜上皮細胞層のグリコーゲン量を比較し、ヤギではウシより高い値が得られたという。一方、Hadek [4] はヒツジの発情周期において子宮内膜上皮と腺上皮細胞に PAS 陽性物質を認めたが、この物質はジアスターゼ、あるいはヒアルロニダーゼ処理、メタノール、クロロホルム処理後も変化しないことから mucoprotein であろうとしている。

本研究における子宮内膜上皮のグリコーゲンが発情期と妊娠期に増加することは Moss ら [6, 7] のウシについての所見と一致し、発情休止期に出現することは菅ら [11] のヤギの所見とその傾向を同じくしている。

Hadek [4] はヒツジの子宮内膜上皮と腺上皮細胞にはグリコーゲンは認められないと述べているが、ヤギとヒツジでは発情徴候の発現度が異なり、ヤギの方が強度に現われるので、その所見が異なることは十分考えられる。さらに土光 [2] もヒトの子宮内膜においてグリコーゲンと mucoprotein の共存について述べている点などを考え合せるとヒツジにおいてもグリコーゲンと mucoprotein の共存の可能性は否定できないのではなかろうか。

前述のごとく、今回の観察において発情周期の各期および妊娠の各期の子宮内膜上皮および子宮腺上皮内のグリコーゲン量の消長にはそれぞれ一定の対応関係の存在が認められた。グリコーゲンは発情後の細胞機能の充進に伴ないエネルギー源として利用され、また、妊娠期間中は子宮乳の成分として胚ならびに胎児の栄養素として利用されるものと考えられる。

ヤギの子宮内膜支質の緻密層に出現するグリコーゲン含有細胞は、妊娠期に増加する傾向が認められた。西田 [8] はヤギの妊娠初期の子宮内膜下層に PAS 陽性を示す結合組織細胞の存在を、また Moss ら [6]、山内ら [16] はウシにおいてその存在を報告しているが、この細胞の本態については未だ明らかでない。

色素細胞は今回の観察では非繁殖期や発情周期中に認められるが、妊娠期に入ると減少する。このことはウシについての山内ら [15] の記載とほぼ同じ結果である。ヤギの本細胞はしばしば子宮腺上皮にも認められることから妊娠時に子宮乳の成分の一つとなる可能性も推定される。

子宮内膜上皮の脂質の消長については発情期と発情休止期に増加の傾向を示し、妊娠前期から後期にかけて増加した。また、子宮腺上皮の脂質は発情休止期に増加する傾向がみられ、妊娠後期にはさらに増加して

腺腔内にも分泌されていた。

Hadek [4] はヒツジの子宮内膜上皮と子宮腺上皮に脂質を認め、その脂質は発情前期、発情期には認められないが、発情後期から出現して発情休止期にピークに達するような周期的変動を示すと述べている。また、Boshier ら [1] や藤原 [3] もラット子宮内膜上皮の脂質は発情期に減少し、発情休止期に増加すると述べている。

本研究において発情休止期に脂質が増加する点では Hadek [4] のヒツジや、Boshier ら [1] や藤原 [3] のラットの成績と一致する。また、妊娠期に脂質が増加することはウシについての山内ら [16] の所見とほぼ一致している。ところが発情期に脂質が増加することはヒツジ [4] やラット [1, 3] などの所見と異なるため、と場材料と生体との発情の判定法の差異についても検討を加えたが、その判定は卵胞の成熟度と子宮頸管粘液の結晶形の出現を基準に行なうため確率の高いものであり、従って発情期に脂質が増加することはヤギに特有の現象と思われる。これらの脂質は着床前から妊娠期を通じて胚ならびに胎児の栄養素として利用される可能性を示すものではなからうか。

要 約

沖縄産ヤギ（ザーネン雑種）の子宮内膜について、発情周期、妊娠にともなうグリコーゲンおよび脂質の推移を観察した。

1. 子宮内膜上皮細胞のグリコーゲン、脂質は非繁殖期では両者ともに乏しいが、発情期、発情休止期には両物質ともやや増加し、妊娠期にはさらに増加する傾向がみられた。

2. 子宮腺体部ではグリコーゲンは非繁殖期、発情期にはほとんど認められないが、発情休止期には僅かに認められ、妊娠後期に増加の傾向を示した。脂質は発情休止期から妊娠期にかけて増加する傾向が観察された。

3. 内膜支質の PAS 陽性を示す細胞には、グリコーゲン含有細胞と色素細胞とが区別された。グリコーゲン含有細胞は非繁殖期には認められないが、発情期、発情休止期と妊娠期に主として緻密層に出現した。また、色素細胞は非繁殖期や発情周期の各期に多少とも出現するが、妊娠期には減少の傾向がある。色素細胞は PAS 陽性物質の他に脂質および鉄反応陽性物質を含む。

4. 子宮内膜における組織栄養素の主要物質とされ

るグリコーゲン、脂質の消長と発情周期、妊娠の各期との間には一定の対応関係のあることが認められた。

このことからこれらの物質は着床前から妊娠期を通じて胚ならびに胎児の栄養素として利用されるものと思われる。

謝 辞

稿を終るにあたり終始御協力下さった琉球大学助手仲田正氏ならびに畜産学科学学生山城健永、照屋広の両君に感謝の意を表する。

文 献

- [1] Boshier, D. P., and Holloway, H. (1973). Effects of ovarian steroid hormones on histochemically demonstrable lipids in the rat uterine epithelium. *J. Endocr.*, **56**, 59-67.
- [2] 土光文夫 (1957). 人体子宮内膜の組織化学的研究の解説. *日産婦誌*, **9**, 811-815.
- [3] 藤原幸郎 (1957). 白鼠子宮内膜における Sudan 好性顆粒の出現について. *日産婦誌*, **9**, 261-270.
- [4] Hadek, R. (1958). Histochemical studies on the uterus of the sheep. *Amer. J. vet. Res.*, **19**, 882-886.
- [5] 檜垣繁光・粟井好次 (1953). 牛の子宮頸管粘液像に関する研究. 1. 粘液像の分類並に是等粘液像の性周期中における消長について. *農研報告 G*, **7**, 51-59.
- [6] Moss, S., Wrenn, T. R., and Sykes, J. F. (1954). Alkaline phosphatase, glycogen, and periodic acid-schiff positive substances in the bovine uterus during the estrous cycle. *Endocrinol.*, **55**, 261-273.
- [7] Moss, S., Sykes, J. F., and Wrenn, T. R. (1956). Some observations on the bovine corpus luteum and endometrium during early stages of pregnancy. *Amer. J. vet. Res.*, **17**, 607-614.
- [8] 西田隆雄 (1970). 韓国在来山羊の生殖器官の形態学的研究. *日本在来家畜調査団報告*, **4**, 91-130.
- [9] Foley, R. C., Reece, R. P., and Leathem, J. H. (1954). Histochemical observations of the bovine uterus, placenta, and corpus luteum during early pregnancy. *J. Anim. Sci.*, **13**, 131-137.
- [10] 佐々木清綱 (1966). 畜産大事典. 養賢堂, 東京 397.
- [11] 菅 徹行・居在家義昭・住吉健也 (1976). 牛, 馬, 豚および山羊の子宮液と子宮内膜組織中における糖質組成. 第65回日本畜産学会講演要旨, 19.

- [12] 渡嘉敷綏宝(1961). 山羊の人工発情及び排卵の研究. 家畜繁殖誌, **6**, 106-108.
- [13] 渡嘉敷綏宝・川島由次・工藤規雄(1973). ヤギ子宮の発情周期, 妊娠に伴う変化. 琉大農学報, **20**, 191-201.
- [14] 渡辺 彰・高嶺 浩(1957). 山羊の発情期子宮頸管粘液における精子受容性及び結晶形成現象について. 日獣誌, **19** (学会号), 80.
- [15] 山内昭二・小寺敬一・垣下奉史(1968). 牛妊娠子宮の組織学的研究. I. 子宮小丘間領域の内膜について. 日畜会報, **39**, 487-504.
- [16] 山内昭二・垣下奉史・小寺敬一(1969). 牛妊娠子宮の組織学的研究. III. 子宮内膜(小丘間領域)の脂肪, グリコーゲンおよび炭水化物群について. 日畜会報, **40**, 520-536.
- [17] 吉岡善三郎(1960). めん・山羊の雌性性活動の人為支配に関する研究. 家畜繁殖誌, **7**, 93-102.
- [18] Zietzschmann, O., und Krölling, O. (1955). In *Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte der Haustiere*, Paul Parey, 102.

Explanation of Figures

- Fig. 1. Glycogen in the surface epithelium of a pregnant goat (No. 177, pregnant 13 weeks). PAS-reaction counterstained with hematoxylin, $\times 400$.
- Fig. 2. Glycogen in the glandular epithelium (No. 177). $\times 400$.
- Fig. 3. Glycogen containing cells in the endometrial stroma of a pregnant goat (No. 198, pregnant 8 weeks). PAS-reaction counterstained with hematoxylin, $\times 400$.
- Fig. 4. Pigment cells in the endometrial stroma of a diestrous goat (No. 167). Notice the cells are PAS-positive. PAS-reaction counterstained with hematoxylin, $\times 200$.
- Fig. 5. Same cells and portion as above. Notice the cells are Berlin-blue positive. Berlin-blue stain, $\times 400$.
- Fig. 6. Same cells as above in the endometrial stroma of a diestrous goat (No. 164). Notice the cells are metachromasia-negative. Toluidine blue stain, $\times 400$.
- Fig. 7. Same cells and portion as above of an estrous goat (No. 173). Notice the cells contain lipid granules. Sudan black B stain, Kernechtrot counterstain, $\times 400$.
- Fig. 8. Lipids in the surface epithelium of a diestrous goat (No. 139). Sudan black B stain, Kernechtrot counterstain, $\times 200$.
- Fig. 9. Same substances and portion as above of a diestrous goat (No. 160). Sudan III stain, hematoxylin counterstain, $\times 200$.
- Fig. 10. Same substances as above in the glandular epithelium of a pregnant goat (No. 175, pregnant 16 weeks). Sudan black B stain, $\times 200$.