

実験的卵管水腫の超微形態と細胞表面負電荷の変動

東北大学医学部産科学婦人科学教室

森 良 一 郎

Variations of Ultrastructures and Negative Charges on the Experimental Hydrosalpinx

Ryoichiro MORI

Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

概要 卵管水腫の病態生理学的解明のために、日本白色家兎にヘモクリップによる実験的卵管水腫を作製し、肉眼的所見、光学顕微鏡的所見、走査型電子顕微鏡所見 (SEM)、透過型電子顕微鏡所見 (TEM) を検討した。また TEM ではカチオン化フェリチンを用いて卵管水腫内膜細胞の表面電荷の変動をも検討した。

卵管水腫の最大径は結紮後20週目では増大傾向をしめした。蠕動運動は結紮後7週以降は認められなかった。光顕所見では結紮後週数が進むにつれて粘膜ヒダの減少、分泌物の減少、上皮細胞の扁平化が観察されたが、線毛の消失は認められなかった。TEM 所見では結紮後1週から線毛の減少が見られ、その後週数が進むにつれて線毛の萎縮、減少が広範に見られた。結紮後7週においては一部上皮剝離が見られるようになり、結紮後20週では上皮剝離が広範に見られるようになった。しかし、線毛の減少は認められるが消失は認められなかった。TEM における細胞表面電荷の検索では、結紮後週数が進むにつれて分泌細胞、線毛細胞両者において細胞表面電荷の減少が見られた。電荷の極性は明らかではなかった。線毛及び微絨毛の太さに関しては正常卵管、卵管水腫の間に有意の変化はなかった。

ヘモクリップを用いた実験的卵管水腫では結紮後20週で卵管水腫が完成し、結紮後週数が進むにつれて分泌細胞の障害が推定された。TEM によれば、卵管水腫は結紮後7～8週で卵管上皮の変化は完成した。SEM では、結紮後週数が進むにつれて線毛細胞、分泌細胞の表面電荷が減少したが、このことは上皮細胞の活性が低下していることをしめしている。

Synopsis It is not so difficult to operate on the hydrosalpinx with macrosurgical or microsurgical methods, but difficult to initiate pregnancy after the operation because little is known about the post-operative condition of the hydrosalpinx.

In this study time sequential observations of the growing experimental hydrosalpinx with the two hemoclip method was performed during morphological change using the microscope, sequential electron microscope and transmission electron microscope with cationized ferritin as an ultrastructural marker. The following results were obtained:

- 1) Size of hydrosalpinx: Until 15 weeks after the operation, the hemo-clipping hydrosalpinx became longer but thereafter there was no change. The maximum diameter of the hydrosalinx became wider until 20 weeks after treatment.
- 2) Peristaltic of hydrosalpinx: Tubal peristaltics were observed until 7 weeks after treatment, but not thereafter.
- 3) SEM findings: Decreases in the amount of cilia started 1 week after treatment, and 7 weeks after treatment partial excoriations of epithelium were observed. 20 weeks after treatment excoriations of epithelium were observed widely. A decrease in the amount of cilia was observed but no loss was observed.
- 4) The negative charges on the tubal endometrium due to TEM using cationized ferritin: The negative charges on the tubal endometrium were decreasing both on the secretory cells and ciliary cells.

Key words: Hydrosalpinx • Ultrastructure • Negative charge • Tubal sterility

緒 言

卵管の障害は不妊症の原因となる。卵管水腫もその障害の一つであるが、卵管水腫の術後妊娠率

は低く、その病態に関しては未だ不明の点が多い。卵管の機能及び形態に関しては数多くの研究があるが、卵管における細胞表面電荷についての報告

1986年11月

森

1983

はない。また卵管水腫に関しての実験では、機械的卵管水腫と感染モデルによる卵管水腫の報告がある。感染モデルによる卵管水腫では機械的なものよりも卵管上皮の変化はより早く強いと言われている。機械的卵管水腫の実験では最終的には線毛がほとんど消失してしまうという報告⁹⁾と、卵管上皮にはほとんど変化は見られないという相反した報告⁷⁾がある。そこで私は、卵管水腫の形成過程における形態学的、生理学的変化を検討するため、ヘモクリップによる実験的卵管水腫を作り形態学的観察を行い、また透過電顕にて卵管内膜の細胞表面電荷の変化を検索した。

実験方法

成熟日本白色家兎の雌で、3.0kg から4.0kg のものを用いた。これに麻酔としてネンブタール6 ml を筋注してから約40分後にエーテル麻酔下仰臥位にして下腹正中切開にて開腹した。卵管はヘモクリップにて子宮側及び卵管采のすぐ内側を結紮した。結紮後1週から24週までの卵管水腫を作製し、肉眼的観察を行い、さらに走査電顕日立 S-450、透過電顕 H-600にて観察した。透過電顕では正常卵管、結紮後2週の卵管水腫、結紮後24週の卵管水腫の細胞表面電荷と線毛及び絨毛の太さを観察し、線毛細胞・分泌細胞を各々比較検討した。線毛細胞においては主として線毛の横断面の電荷を検討した。細胞表面電荷の検索には免疫電顕法のマーカーとして広く用いられているフェリチン分子にアミンを化学的に導入したカチオン化フェリチンを用いた⁴⁾。カチオン化フェリチンは等電点 $pI \approx 8.5$ であり、中性領域で正に荷電している。カチオン化フェリチンはリン酸緩衝生理的食塩水 (Phosphate-buffered saline, PBS) にて濃度 0.3mg/ml に希釈したものを使用した。

卵管蠕動運動の評価法としては、麻酔下開腹時摂子による機械的刺激にてその有無を調べた。

卵管上皮には、光学顕微鏡的に線毛細胞・分泌細胞 (無線毛細胞)・支持または小桿細胞・基底明澄細胞の4細胞が認められている²⁾が、光顕及び電顕において卵管上皮の大部分を占める線毛細胞と分泌細胞の観察を行った。

走査電顕観察においては一般的手順に従い金蒸

着後走査電顕日立 S-450にて観察した。

細胞表面電荷の検索手順は、 3×3 mm に臓器の切出しを行つた後、2.5%グルタルアルデヒドで 4°C 1時間前固定し、PBS にて3回洗浄後カチオン化フェリチン (PBS にて濃度0.3mg/ml に希釈) と室温にて30分間反応させ、さらに PBS にて3回洗浄後1%四酸化オスmium 4°C 1時間固定し、常法に従い包埋切片標本を作製し、鉛にて染色後透過電顕 H-600にて観察した。

実験成績

1) 肉眼所見 (写真1)

日本白色家兎の正常卵管は長さが約7~10cm、太さが2~4mm であつた。卵管水腫は結紮後15週までは増長傾向を示し、それ以後は変化が少なかった。また卵管水腫の最大径に関しては結紮後20週までは増大傾向を示した。

水腫卵管は半透明を呈し、表面は光沢を持つて張りつめ、貯留した液は漿液性、無色透明の液であつた。ほとんどの卵管水腫に卵管周囲癒着が見

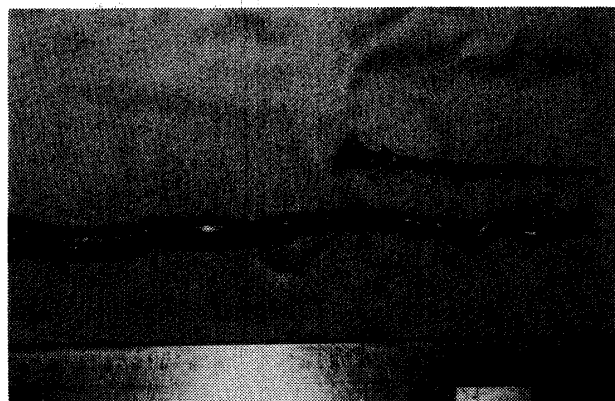


写真1 正常卵管と結紮後15週卵管水腫

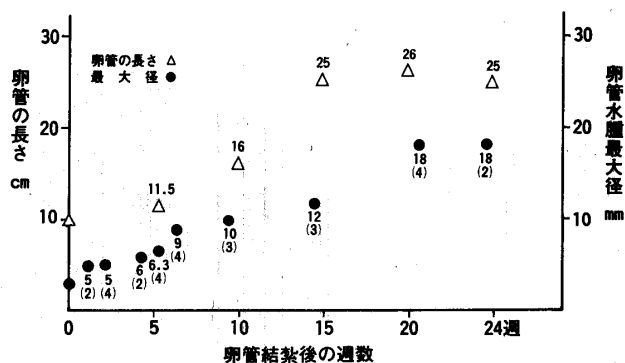


図1 家兎卵管水腫の最大径及び卵管の長さ

られ、結紮後開腹した際、卵管水腫を示したものは約70%であつた。卵管蠕動運動に関しては、正常卵管でもすべてのものに蠕動運動が見られたわけではないが、水腫卵管では結紮後5週の卵管水腫までは認められたが、結紮後7週以降は認められなかつた。

2) 光顕所見 (写真2, 3)

a) 正常卵管

多数の粘膜ヒダが認められ、線毛細胞はヒダの先端部に比較的多く底部には少ない。逆に分泌細胞は底部に多く認められる傾向がある。上皮細胞の核は両方の細胞を合わせて長円形であり2～3層の配列を示す。

b) 結紮後5週の卵管水腫峽部

粘膜ヒダのたけが低くなり乳頭状となつている。細胞の背は高く、核も長円形を保っている。線毛はよく保たれており分泌物もかなり多数認め

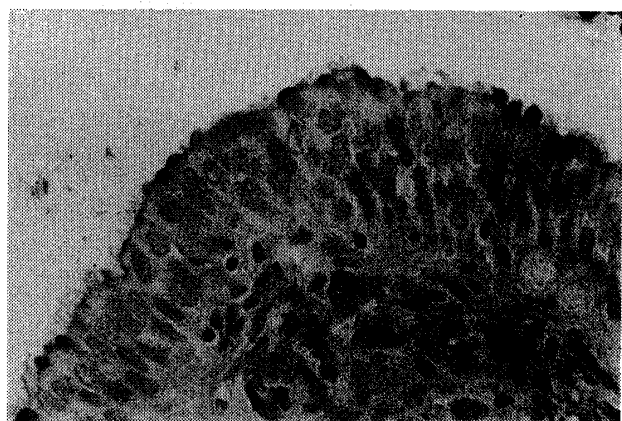


写真2 正常卵管, 光顕 (×400)



写真3 結紮後5週卵管水腫, 光顕 (×400)

られる。粘膜下層に脱落膜様変化と粘液様変化が認められる。

c) 結紮後5週の卵管水腫膨大部

粘膜ヒダのたけは峽部より低く乳頭状構造も著明でない。一部で細胞のたけが低くなり核も球状になつている。線毛は比較的よく保たれているが、分泌物はほとんど認められない。粘膜下層は粘液様変性が主で、脱落膜様変化は著明でない。

d) 結紮後7週の卵管水腫峽部

粘膜ヒダがかなり消失し、細胞はまだ比較的背が高く、線毛や分泌物も保たれている。核は楕円形となり1層から2層に並び多列比は正常のように著明に認められない。粘膜下層に脱落膜様変化と極度の粘液様変化を認める。

e) 結紮後7週の卵管水腫膨大部

粘膜ヒダがかなり消失し、細胞の背が低く円柱状になり、核も球状でほぼ1層に配列している。線毛は比較的よく保たれているが分泌物はほとんど認められない。粘膜下層の変化は峽部と同様であるがより強い。

f) 結紮後10週の卵管水腫峽部

粘膜ヒダはほとんど認められず、ごく少数乳頭状の突起を呈している。細胞のたけは一般に低く、核も1層に配列している。乳頭状の部分では細胞・核ともに比較的保たれている。線毛は認められるが、分泌細胞は乳頭状の部分以外ではあまり認められない。粘膜下層は菲薄で直下に筋層が認められる。

g) 結紮後10週の卵管水腫膨大部

粘膜ヒダはほとんど認められず、ごく少数乳頭状の突起を呈している。細胞はほとんど円柱状にまで扁平化しており、核も1層に配列し細胞質は少ない。線毛は乳頭状の部分では保たれているが、その他の部分ではかなり減少している。分泌物はほとんど認められない。粘膜下層は菲薄ですぐ筋層が接している。

3) 走査電顕所見 (写真4, 5, 6)

a) 正常卵管

日本白色家兎の正常卵管も、ヒト卵管と同じように粘膜ヒダは卵管采に近づくにつれ数と厚みを増し、線毛細胞の割合も同様に高くなる。線毛細

1986年11月

森

1985

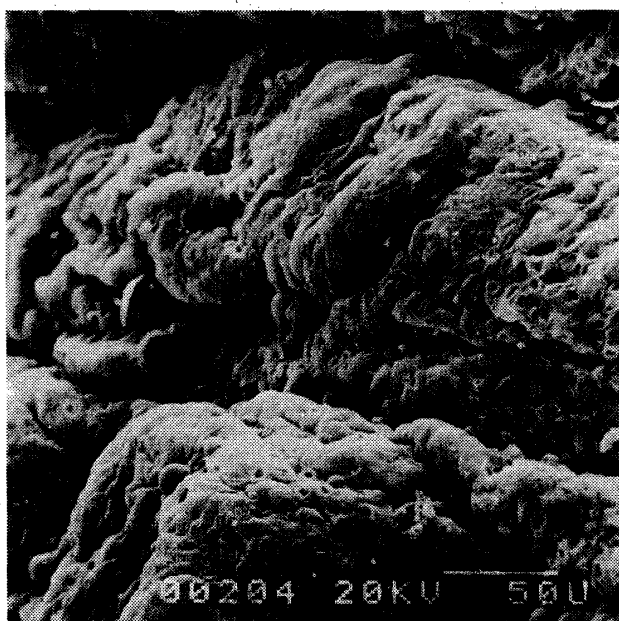


写真4 結紮後5週卵管水腫, 走査電顕 (×400)

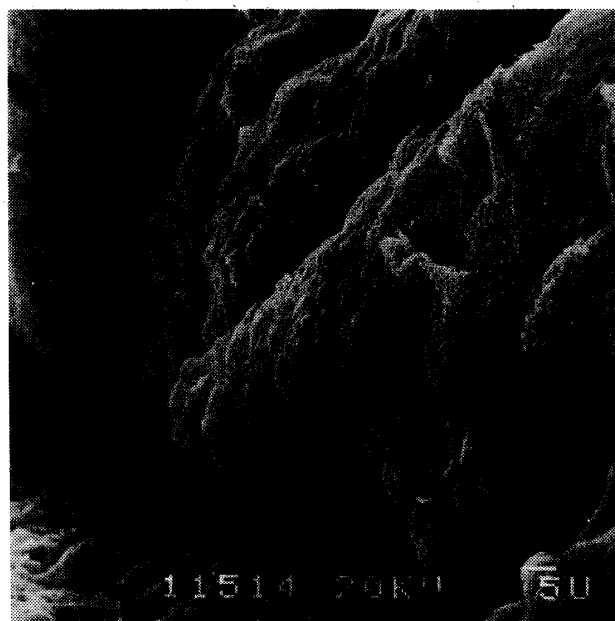


写真6 結紮後15週卵管水腫, 走査電顕 (×1,000)

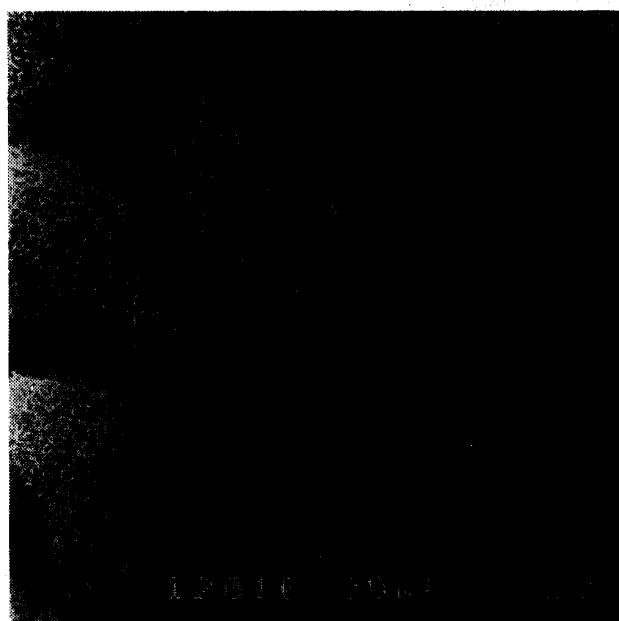


写真5 結紮後7週卵管水腫, 走査電顕 (×2,000)

胞と分泌細胞は長い線毛と, 短い微絨毛により明確に区別できる。

b) 結紮後1週の卵管水腫

粘膜ヒダが減少し, 線毛の走行に乱れが見られる。峽部においては線毛細胞が減少しているように観察される。

c) 結紮後4週の卵管水腫

分泌細胞が膨化しているように見られ, 線毛の減少・萎縮が見られる。

d) 結紮後5週の卵管水腫

分泌細胞・線毛細胞の区別がはつきりしなくなりその表面に萎縮・減少した線毛が見られる。分泌細胞がつぶれたような状態のものが認められる。

e) 結紮後7週の卵管水腫

5週とほぼ同様の所見であるが, 一部上皮剥離が見られるようになる。

f) 結紮後15週の卵管水腫

卵管上皮の剥離が広汎に見られる。

g) 結紮後20週の卵管水腫

20週においても場所により線毛細胞・分泌細胞がはつきりと区別できるが, 障害の強いところでは分泌細胞と線毛細胞の区別が明かでない。

各週数の峽部卵管と膨大部卵管を比較して見ると, 膨大部の方がより障害されているように観察された。

4) 透過電顕所見 (写真7, 8, 9, 10)

正に荷電したカチオン化フェリチンを卵管上皮と反応させ, 日本白色家兎の正常卵管, 結紮後2週の卵管水腫, 結紮後24週の卵管水腫の細胞表面電荷を調べた。分泌細胞の微絨毛と線毛細胞の線毛の横断面を主として観察した。

a) 正常卵管

分泌細胞では, カチオン化フェリチンが細胞表

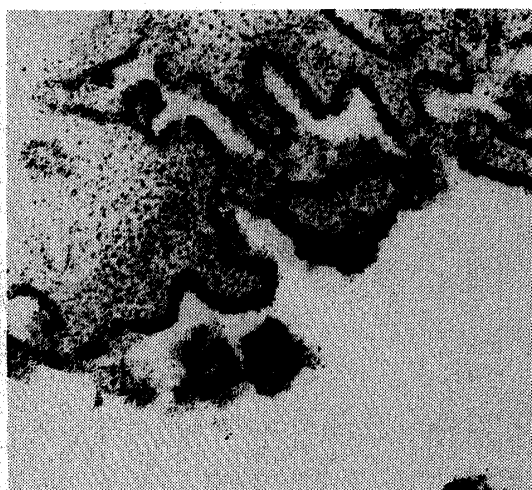


写真7 正常卵管分泌細胞, 透過電顕 (×40,000)



写真8 結紮後2週卵管水腫分泌細胞, 透過電顕 (×40,000)

面に数えきれぬ程付着しているのが観察された。その付着の仕方には特に極性は見られなかった。

線毛細胞では、線毛の横断面で微小管の9+2構造³⁾がはつきりと認められる部分の検討を行った。カチオン化フェリチンは分泌細胞同様、数多く付着していて、部分的に一塊となつて付着しているのが見られた。

b) 結紮後2週の卵管水腫

分泌細胞・線毛細胞ともにカチオン化フェリチンの付着が見られるが、正常卵管より少ないよう

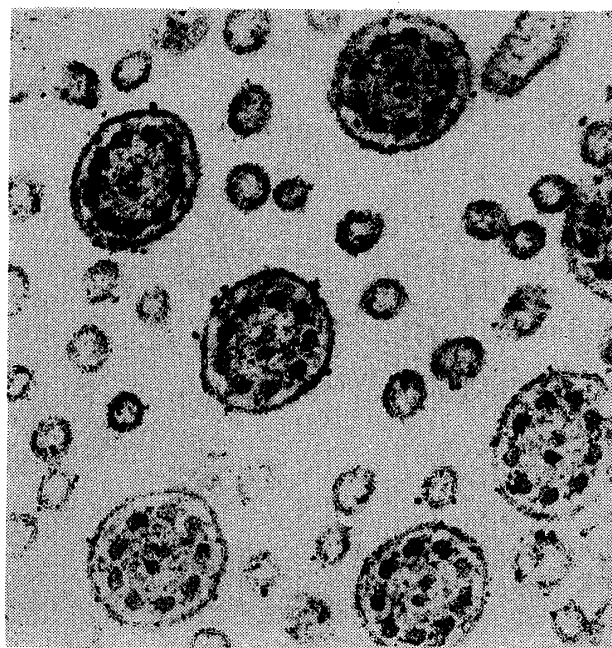


写真9 正常卵管, 線毛及び微絨毛横断面, 透過電顕 (×40,000)

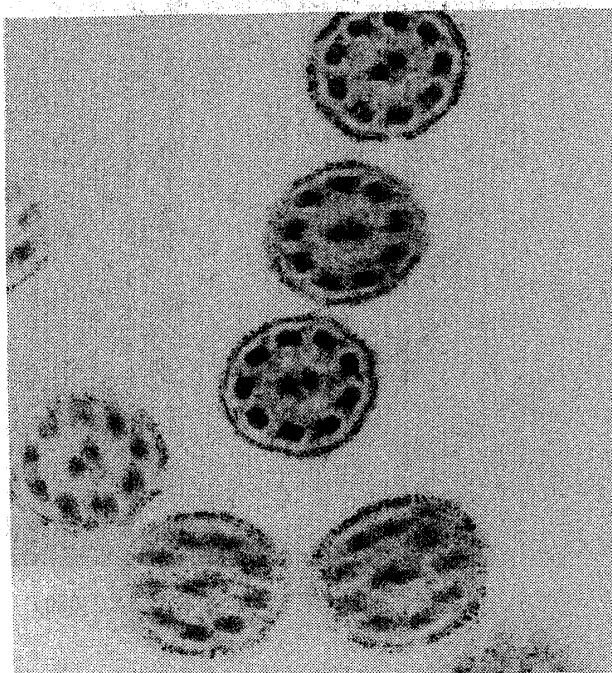


写真10 結紮後24週卵管水腫線毛横断面, 透過電顕 (×40,000)

に観察された。

c) 結紮後24週の卵管水腫

分泌細胞・線毛細胞ともにカチオン化フェリチンの付着が見られるが、正常卵管と比較すると明らかに付着数は少なく、線毛横断面には正常卵管に見られるようなカチオン化フェリチンの粒子の

表1 線毛及び微絨毛の太さ

結紮後週数 部 位	0	2	24
線 毛 nm (n=15)	211.3 ±9.13	212.5 ±95.0	215.0 ±7.00
微絨毛 nm (n=10)	66.25±6.00	66.88± 5.88	71.88±8.50

塊は見られない。

次に走査電顕において線毛の萎縮が観察されたが、透過電顕にて線毛及び微絨毛の最大径が卵管水腫の程度により変化するかどうか検討した。線毛及び微絨毛とも正常卵管、結紮後2週卵管、結紮後24週卵管の間に有意の変化は見られなかった。

考 案

肉眼所見においては、卵管水腫の最大径は結紮後20週が最大であり、また卵管の長さも15週以降はほとんど変化がなかった。ヘモクリップを用いた機械的卵管水腫では、肉眼的には結紮後約20週で卵管水腫が完成されるものと思われる。水腫卵管最大径に関しては他の報告者より大きな水腫が形成された。Patton et al.⁸⁾は52週まで観察し最大径8mmと報告している。ヘモクリップを用いた方法では約6週で最大径8mmとなる。卵管の蠕動運動は結紮後5週までは認められたが、積極的に蠕動運動を確かめた訳ではなく、週数を経るごとに卵管の拡張が増し、なおかつ卵管周囲の癒着により固定されるために蠕動運動が確認できなかったものと思われる。クリップ後に卵管水腫を示したものは約70%であるが、実際に週数相当の大きさを示したものは約50%位であった。しかしこれは単に技術的なものと思われる。

光顕所見においては卵管水腫の場合、粘膜ヒダの消失・上皮細胞の扁平化・線毛の減少・分泌物の減少・上皮剝離が認められたが、結紮後24週の卵管水腫においても線毛は認められた。線毛の減少は卵管腔が拡張するために、単位面積あたりの線毛細胞が少なくなるためと思われる。Winston et al.⁹⁾は卵管水腫が進むにつれて線毛の減少、消

失が見られると報告しているが、結紮後24週においても線毛の消失は見られなかった。

走査電顕では7～8週位で卵管上皮の変化が固定されるように観察された。さらに週数が進むと上皮剝離が広汎に見られるが線毛の消失は認められなかった。Patek et al.⁷⁾が報告したように、つぶれた分泌細胞が結紮後5週位に観察されたがこの意味に関しては不明である。光顕所見同様、膨大部の方がより上皮の障害が強いように観察されたが、水腫による卵管の拡張度合が膨大部の方がより大きいことを考えると当然であるかも知れない。

透過電顕では卵管上皮細胞の表面電荷と線毛及び微絨毛の太さに関して検索した。動物細胞の表面は生理的な条件下では一般に負に荷電している。そこで中性領域で正に荷電しているカチオン化フェリチンを用いて卵管上皮と反応させた。カチオン化フェリチンは電顕下では通常フェリチンと同じく均一な大きさの電子密な粒子として観察されるため、結合した粒子数を数えることにより半定量的な取扱いができる。

正常卵管においては分泌細胞表面には一面にカチオン化フェリチンが付着しているのに反し、微小管が9+2構造を示す線毛横断面ではカチオン化フェリチンが部分的に一塊となつて付着しているのが認められる。川越¹⁾はヒト胎盤絨毛細胞表面の負電荷の規則的な極性を報告しているが、今回の実験では負電荷の極性及び規則性は明らかではなかった。

卵管水腫の週数が進むにつれてカチオン化フェリチンの付着数が線毛細胞・分泌細胞において減少することが観察されたが、このことは卵管上皮細胞の活性が低下していることを示しているが、妊孕性にどのようにかわっているかは不明である。

走査電顕において線毛の萎縮が観察されたが、透過電顕における線毛及び微絨毛の太さに関しては正常卵管と結紮後24週卵管において有意の変化は見られず、また線毛の走行に関しても線毛横断面での中心小管を見ると、結紮後24週卵管において一定の方向に中心小管が向いているのが観察さ

れた。

卵管の機能の一つに卵の輸送があり線毛が大事な役割を果たしていると考えられてきた。しかし、*immotile cilia syndrome*のように先天性に線毛運動が見られない婦人でも子宮内妊娠ができる⁶⁾ということは、卵の輸送が卵管の運動だけでなく腹腔内と卵管・子宮腔内との *hydrostatic pressure* の差による卵管内の子宮方向への受動的流れとの協調作用、あるいはむしろ後者である⁵⁾という説明以外に卵管上皮の細胞表面電荷がなんらかの関与をしているのではないかと思われる。

文 献

1. 川越 厚：ヒト胎盤絨毛細胞表面の負電荷とその生物学的役割。日産婦誌，34：497，1982。
2. 樫木 勇，田中正男，寺西二郎，森本義晴，渋谷嘉之，福永正平，河田泰彦：卵管上皮の超微形態。臨婦産，38：91，1984。
3. 重中義信：微小管の微細構造。細胞，3：2，1971。

4. 高田邦昭，平野 寛：組織細胞化学1983，133，学際企画，東京，1983。
5. Afzelius, B.A., Camner, P. and Mossberg, B.: On the function of cilia in the female reproductive tract. *Fertil. Steril.*, 29: 72, 1978.
6. Jean, Y., Langlais, J., Roberts, K.D., Chapdelaine, A. and Bleau, G.: Fertility of a woman with nonfunctional ciliated cells in the fallopian tubes. *Fertil. Steril.*, 31: 349, 1979.
7. Patek, E. and Nilsson, L.: Hydrosalpinx simplex as seen by the scanning electron microscope. *Fertil. Steril.*, 28: 962, 1977.
8. Patton, D.L. and Halbert, S.A.: Mechanically-induced hydrosalpinx: Long-term oviductal dilatation does not impair ciliary transport function. *Fertil. Steril.*, 36: 808, 1981.
9. Vasquez, G., Obertic, C., Boeckx, W., Winston, R.M.L. and Brosens, I.: The evaluation of experimentally induced hydrosalpinges in rabbits. *Fertil. Steril.*, 35: 342, 1981.

(No. 5908 昭61・2・4受付)