

氏 名 (本籍)	Missaka Priyadarsana (スリランカ民主 Bandara WIJAYAGUNAWARDANE 社会主義共和国)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第66号
学位授与年月日	平成11年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Cyclic Regulation of Local Oviductal Contraction in the Cow
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 佐藤 邦 忠 副査 帯広畜産大学 教授 西村 昌 数 副査 岩手大学 教授 三宅 陽 一 副査 東京農工大学 教授 金田 義 宏 副査 岐阜大学 教授 鈴木 義 孝

### 論文の内容の要旨

卵管は、単なる受精卵の通過管ではなく精子の移動や受精能獲得、排卵した卵子の成熟と移動、並びに受精・初期胞胚の分化と子宮への移動など妊娠にとって重要ないくつかの過程がスムーズに進行するための環境を調節している。

しかし、この生殖生理的な現象の微妙な調節は内分泌、パラクリン、並びにオートクリンなどにより行われているが未だ十分には解明されていない。そこで、卵管局所における発情周期中の調節因子を明らかにするため、卵管組織中の性ステロイドホルモンとペプチド類の測定、微細管を挿入する還流試験、並びに卵管の収縮性の測定を行い卵管の生理機能を明らかにすることを目的とした。

試験は、食肉検査時に肉眼的に異常所見の認められない牛の卵管について以下の実験を行った。

実験1：牛卵管組織中のProgesterone ( $P_4$ )、Estradiol- $17\beta$  ( $E_2$ )、Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ )、Prostaglandin  $F_2\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ )、Oxytocin (OT)、並びにEndothelin-1 (ET-1)などについての測定を行った。結果は、卵巣で分泌される物質 ( $P_4$ 、OTと、 $E_2$ ) と卵管局所で生産される物質 ( $PGE_2$ 、 $PGF_2\alpha$ と、ET-1) は卵管の収縮を相乗的に調節していることが明らかとなった。

実験2：LHと、卵巣よりの性ステロイドホルモンやOTが、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>αと、ET-1の卵管局所での生産に影響をおよぼすかどうかを調べるため、牛卵管上皮細胞(COEC)の培養試験を行なった。結果は、PGとET-1の生産がE<sub>2</sub>+低濃度P<sub>4</sub>、LH+E<sub>2</sub>+低濃度P<sub>4</sub>、並びにLH+E<sub>2</sub>により刺激された。さらに、E<sub>2</sub>+ET-1はPG生産を刺激したが、OTはPG並びにET-1の生産に影響がなかった。

実験3：発情周期中の卵管腔の変化を調べるため、Microdialysis system(MDS)を用いて試験を行った。結果は、LH感作4～8時間目にPGとET-1の明瞭な増加が見られた。さらに、E<sub>2</sub>はPGとET-1を放出したが短時間であった。LHとP<sub>4</sub>、E<sub>2</sub>あるいはET-1を組み合わせて作用させると、PG放出が高まったが、OTは卵管でのLHの分泌を抑制した。

実験4：発情周期中の卵管の収縮性を、Force displacement transducer with metric amplifierを用いて観察した。Lock Ringer液に、LH、ET-1、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>α、LH+P<sub>4</sub>+E<sub>2</sub>あるいはET-1を添加して1時間作用させた時、卵管の収縮性は増大した。

実験5：Angiotensin-II(Ang-II)とAtrial natriuratic peptide(ANP)による、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>α、ET-1と、Ang-IIの放出について、in vitro MDSにより調べた。結果は、Ang-IIはPGとET-1を、ANPはPGを、さらにANPはAng-IIの分泌をそれぞれ増加した。

実験6と7：牛卵管上皮細胞と胚の共培養と、in vitro MDSを組み合わせた実験を行った。結果は、Tumor necrotizing factor-α(TNF-α)とInterleukin-1β(IL-1β)が排卵前後の卵管でPG、ET-1とAng-IIの分泌を高めた。さらに、胚が存在する時には牛卵管上皮細胞でのPGE<sub>2</sub>の分泌を刺激した。

以上の結果、排卵前のLH増加は退行期の黄体からのP<sub>4</sub>分泌の低下と、グラーフ卵胞から分泌される高濃度のE<sub>2</sub>の局所循環により、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>αとET-1の卵管での生産能を最大限に高め、生殖細胞の移動のために必要な卵管の収縮性を引き起こすと考える。

Ang-IIとANPは排卵前後の卵管の収縮性を増加し、胚はPGE<sub>2</sub>生産性を高め、卵管の局所収縮性を増加するが、新しく形成された黄体からのOTはこの作用を抑制し、これらのことが胚の移動速度に微妙に作用していることが明らかとなり、卵子の成熟、受精、胚の分化、着床といった一連の生殖現象と関係が強い物質を解析したことは繁殖障害の予防法を検討するために非常に価値のある実験結果と考える。

## 審 査 結 果 の 要 旨

卵管は、単なる受精卵の通過管ではなく精子の移動や受精能獲得、排卵した卵子の成熟と移動、並びに受精・初期胚の分化と子宮への移動など妊娠にとって重要ないくつかの過程がスムーズに進行するための環境を調節している。

この生殖生理的な現象の微妙な調節は内分泌、パラクリン、並びにオートクリンなどにより行われているが未だ十分には解明されていない。そこで、卵管局所における発情周期中の調節因子を明らかにするため、卵管組織中の性ステロイドホルモンとペプチド類の測定、微細管を挿入する還流試験、並びに卵管の収縮性の測定を行い卵管の生理機能を明らかにすることを目的とした。

試験は、食肉検査時に肉眼的に異常所見の認められない牛の卵管について以下の実験を行った。

実験1：牛卵管組織中のProgesterone ( $P_4$ )、Estradiol- $17\beta$  ( $E_2$ )、Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ )、Prostaglandin  $F_2\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ )、Oxytocin (OT)、並びにEndothelin-1 (ET-1) などの測定を行った。結果は、卵巣で分泌される物質 ( $P_4$ 、OTと、 $E_2$ ) と卵管局所で生産される物質 ( $PGE_2$ 、 $PGF_2\alpha$ と、ET-1) は卵管の収縮を相乗的に調節していることが明らかとなった。

実験2：LHと、卵巣よりの性ステロイドホルモンやOTが、卵管局所での $PGE_2$ 、 $PGF_2\alpha$ と、ET-1の生産に影響をおよぼすかどうかを調べるため、牛卵管上皮細胞 (COEC) の培養試験を行なった。結果は、PGとET-1の生産は $E_2$ +低濃度 $P_4$ 、LH+ $E_2$ +低濃度 $P_4$ 、並びにLH+ $E_2$ により促進された。さらに、 $E_2$ +ET-1はPG生産を刺激したが、OTはPG並びにET-1の生産に影響がなかった。

実験3：発情周期中の卵管腔の変化を調べるため、Microdialysis system (MDS) を用いて試験を行った。結果は、LH感作4～8時間目にPGとET-1の明瞭な増加が見られた。さらに、 $E_2$ はPGとET-1を放出したが短時間であった。LHと $P_4$ 、 $E_2$ あるいはET-1を組み合わせると、PG放出が高まったが、OTは卵管でのLHの作用を抑制した。

実験4：発情周期中の卵管の収縮性を、Force displacement transducer with metric amplifierを用いて観察した。Locke Ringer液に、LH、ET-1、 $PGE_2$ 、 $PGF_2\alpha$ 、LH+ $P_4$ + $E_2$ あるいはET-1を添加して1時間作用させた時、卵管の収縮性は増大した。

実験5：Angiotensin-II (Ang-II) とAtrial natriuretic peptide (ANP) による、 $PGE_2$ 、 $PGF_2\alpha$ 、ET-1と、Ang-IIの放出について、in vitro MDSにより調べた。結果は、Ang-IIはPGとET-1を、ANPはPGを、さらにANPはAng-IIの分泌をそれぞれ刺激した。

実験6と7：牛卵管上皮細胞と胚の共培養と、in vitro MDSを組み合わせた実験を行った。結果は、Tumor necrotizing factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) とInterleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) が排卵前後の卵管でPG、ET-1とAng-IIの分泌を高めた。さらに、胚が存在する時には牛卵管上皮細胞での $PGE_2$ の分泌を刺激した。

これらのことから、排卵前のLH増加は退行期の黄体からの $P_4$ 分泌の低下と、グループ卵

胞から分泌される高濃度のE<sub>2</sub>の局所循環により、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>αとET-1の卵管での生産能を最大限に高め、生殖細胞の移動のために必要な卵管の収縮性を引き起こす。さらに、Ang-IIとANPは排卵前後の卵管の収縮性を増加し、胚はPGE<sub>2</sub>生産性を高め、卵管の局所収縮性を高めるが、新しく形成された黄体からのOTはこの作用を抑制することから、胚の移動速度が微妙に調節されていることが明らかとなり、卵子の成熟、受精、胚の分化、着床といった一連の生殖現象と関係が強い物質を解析したことは繁殖障害の予防法を検討するために非常に価値のある試験と考える。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

基礎となる学術論文は、*Theriogenology*, 46, 1149-1158, (1996)と、*Theriogenology*, 49, 607-618, (1998)に発表した。

1. Wijayagunawardane MPB, Cerbito WA, Miyamoto A, AcostaT J, Takagi M, Miyazawa K and Sato K. Oviductal progesterone concentration and its spatial distribution in cyclic and early pregnant cows. *Theriogenology* Vol 46 pp 1149-1158 (1996).
2. Wijayagunawardane MPB, Miyamoto A, Cerbito WA, AcostaT J, Takagi M and Sato K. Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology*, Vol 49 pp 607-618 (1998).