

前着床期におけるウシ子宮内膜の機能に及ぼす黄体
の局所的作用に関する研究

2015 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(帯広畜産大学)

高橋 啓人

目 次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 黄体期における子宮内膜 P_4 濃度とその受容体について	6
2-1. 序論	7
2-2. 材料および方法	7
2-3. 結果	10
2-4. 考察	11
2-5. 小括	15
図・表	16
第 3 章 黄体と第 1 卵胞波主席卵胞の局所的作用がウシ子宮内膜の P_4 および E_2 濃度と その受容体に与える影響について	25
3-1. 序論	26
3-2. 材料および方法	26
3-3. 結果	31
3-4. 考察	34
3-5. 小括	41
図・表	43
第 4 章 総合考察	68
謝辞	74
参考文献	75

略語

ANPEP : Alanine (membrane) aminopeptidase

BSA : Bovine serum albumin (牛血清アルブミン)

cDNA : complementary DNA (相補的 DNA)

CL : Corpus luteum (黄体)

DF : Dominant follicle (主席卵胞)

E₂ : Estradiol-17 β (エストラジオール-17 β)

EIA : Enzyme immuno assay (酵素免疫測定法)

ESR1 : Estrogen receptor 1

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素
酵素)

GnRH : Gonadotropin releasing hormone (性腺刺激ホルモン放出ホルモン)

hCG : Human chorionic gonadotropin (ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン)

LH : Luteinizing hormone (黄体形成ホルモン)

LPL : Lipoprotein lipase

OXR : Oxytocin receptor

PCR : Polymerase chain reaction

P₄ : Progesterone (プロゲステロン)

PGR : Progesterone receptor

PGRMC1 : Progesterone receptor membrane component 1

PGRMC2 : Progesterone receptor membrane component 2

第 1 章

緒言

第1章 緒言

近年、世界各国でウシの受胎率は年々低下しており、家畜改良事業団の受胎調査成績によると日本においても同様であると報告している。ウシは分娩して初めて乳汁を生産することができ、収益を得ることができる。すなわち、繁殖効率の低下は、直接的に酪農家の経済的な損失に影響を及ぼしている(33)。一般的に P_4 は、子宮平滑筋の運動抑制、子宮腺の発達および子宮乳と呼ばれる胚への栄養成分の分泌促進、子宮内での胚に対する免疫細胞反応の制御などに関与し、妊娠の成立および維持に働いている(76)。ウシにおいても、古くから P_4 が妊娠維持に必要であると考えられてきた。妊娠のある時期までは、黄体の摘出により妊娠は中断されるが、妊娠後期に黄体を摘出しても、妊娠が中断するとは限らない(14)ことから、妊娠早期には、卵巣内の黄体からの P_4 が妊娠維持に重要であることが考えられる。一方、近年の受胎率の低下の一因は、妊娠前期、特に受精から胎盤形成完了までの過程に存在すると考えられている(18, 74)。この過程には排卵、受精、受精卵の発育、胚の着床および胎盤の形成が含まれている。受精して主要な組織や器官が形成される前は胚と称し、それ以降分娩までを胎子と呼ぶ(39)。この胚が死滅する現象を胚死滅と呼び、その発生時期により区分され、発情周期の延長がみられない場合を早期胚死滅、正常な発情間隔である18から24日を超えて発情が回帰する場合を後期胚死滅と呼んでいる(32)。

正常に受精が行われた場合、卵管内で受精卵は卵割を始め、受精後3日までに2, 4, 8および16細胞期、4から6日までに桑実胚、6から7日目に胚盤胞へと至る。受精卵はおおよそ7日目頃には子宮内へ到達することが知られている(31)。近年のウシにおける受胎率低下の原因のひとつに早期胚死滅が関与していると考えられている。経産牛において、受精後に胚死滅および流産を合わせた発生頻度はおおよそ45から50%とされ、そのうち早期胚死滅の発生頻度は20から30%と報告されており、早期胚死滅がウシの受胎率へ影響を及ぼすことが示唆されている(5, 18, 74)。この早期胚死滅

を回避するために、人工授精後の早期の P₄ 製剤処置によって受胎率を向上させる報告 (73, 77, 79) がある。Lonergan ら (47) は、排卵後早期における P₄ の濃度と胚の発育について着目した研究を行っている。これらの研究では、排卵後早期への P₄ 製剤処置は、胚の発育を促進し、さらに、母体妊娠認識に関わる胚からのシグナルである Interferon- τ 分泌の産生を促進することで、妊娠成立を促すことを示唆している。

Clemente ら (15) は、体外受精卵への P₄ 添加処置を行い、胚移植を行った場合に、添加した群と添加しなかった群に受胎率に差は認められなかったと報告した。これらの結果を考慮すると、排卵後早期の P₄ 製剤処置が受胎率を高める理由として、P₄ が胚へ与える影響よりも子宮内に与える影響が大きいと考えられる。すなわち、P₄ の暴露を受けた子宮から栄養素が分泌され、胚発育を促し、母体妊娠認識のシグナルを強化していると考えられている。これらの報告は、P₄ による胚発育に関わる子宮内環境の調節が受胎率に影響を与える要因であることを強く支持するものである。

P₄ は受容体に結合することで作用することが古くから知られており、古典的な核内受容体は 1984 年頃から哺乳類においてアミノ酸配列のクローニングが行われた (35, 48, 52, 58)。その後、2000 年代の始めには、細胞膜上に P₄ 受容体の存在が確認された (43, 86)。これらの存在によって、P₄ の機能は、核内受容体 (PR) と膜受容体を介して発現されることが考えられるようになった。P₄ の核内受容体には、PR-B と PR-A の 2 つのアイソフォームが存在し、これらは同一遺伝子から産生され、PR-A は PR-B の N 末端のアミノ酸が 164 個欠落したものである (8)。PR-B はリガンドの非存在下では細胞質と核の両方に分布するが、PR-A はリガンド非存在下でも核内に局在し、いずれも標的遺伝子の転写を調節する (8)。ウシ子宮内膜における PR 発現は多数報告されている (9, 41, 69)。Bridges ら (6) は、受胎牛と不受胎牛における子宮内膜の PR 発現を調べ、PR の存在の重要性を示唆している。膜受容体は、membrane-associated-progesterone receptor-family (MAPR 群) である

Progesterone membrane component 1 (PGRMC1), および 2 (PGRMC2) と, AdipoQ-progesterone-receptor 群に含まれる Membrane progesterone receptor (mPR)- α , - β および - γ に分類され, PGRMC1 は 1 回膜貫通型の膜受容体 (42), mPR は 7 回膜貫通型受容体であることが報告されている (23)。これらの膜受容体は, 様々な哺乳類の生殖器において存在することが報告がされている (22, 37, 40, 80)。また, ウシにおいて, 卵母細胞 (49), 顆粒層細胞 (50), 子宮 (6, 44), 卵管 (72) 等の様々な生殖器において PGRMC1, PGRMC2 および mPR 群の発現および作用が確認されている。

受容体の発現数およびその結合親和性は様々な要因により増大 (上方制御), または減少 (下方制御) されることが古くから知られている。ウシ子宮内膜において, PR の発現は黄体期に低く, 発情期前後の期間において高く発現することが一般的に知られており, ウシ子宮内膜の PR 発現は E_2 によって上方制御され, P_4 によって下方制御されていると考えられている (19, 66)。一方で, 膜受容体における発情周期の変動に関する報告は少なく, その制御因子についても不明である。

ウシでは排卵した卵巢側, つまり黄体が存在する卵巢側の子宮角 (同側角) で胚が発育することが知られている (75)。この現象は, 他の単排卵動物の羊, 豚, ウマと異なっている。これらの動物では子宮内で胚が遊走することによって, 必ずしも同側角に胚が発育するとは限らない (17, 28, 75)。ウシにおいて, 子宮内膜 P_4 濃度は, 黄体が存在しない子宮角 (反対側角) と比較して同側角で高いこと (11,84), 同側角と反対側角に胚移植した場合に同側角で受胎率が高いことが過去に報告されている (16)。つまり, 同側角において子宮内膜 P_4 濃度が高いことは, 黄体の子宮内膜への局所的な作用があることを示し, 同側角におけるウシの妊娠成立において重要な役割を果たしていることが考えられる。

しかしながら, これらの研究では, 同側角および反対側角の組織中 P_4 濃度を測定し

ているのみであり、その受容体の発現に対する評価は行われていない。

第 2 章では、ウシ子宮内膜に与える黄体の局所的な影響を明らかにする目的で、と畜場から採取したウシ子宮を用いて発情周期における子宮内膜 P_4 濃度およびその受容体発現を同側角、反対側角に分けて比較検討を行った。

近年、排卵後に出現する第 1 卵胞波主席卵胞が同一卵巢に黄体と共存した場合と、共存しない場合とで受胎率に違いがあることが示された (60)。この要因については、黄体と共存する第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内膜に何らかの作用を与え、受胎性に負の影響を及ぼすと推測されている。第 3 章では、黄体と第 1 卵胞波主席卵胞の位置関係が、子宮内環境に与える影響を明らかにする目的として、第 1 卵胞波主席卵胞が黄体と共存する群（共存群）と共存しない（非共存群）に区分し、それぞれについて子宮内膜バイオプシーを行い、子宮内膜 P_4 濃度およびその受容体発現を比較した。さらに、hCG 投与により第 1 卵胞波主席卵胞を排卵させることで卵胞の影響を排除する実験区を設定し、排卵を誘起しない対照群と比較した。第 2 章での P_4 を中心とした項目に加え、第 3 章では追加項目として、第 1 卵胞波主席卵胞の子宮内膜に対する局所的作用を評価するために血中 E_2 濃度、子宮内膜 E_2 濃度および E_2 受容体の発現についても調べた。さらに、胚発育へ及ぼす子宮内環境要因として子宮に関与する因子の発現についても調べた。

第 2 章

黄体期における子宮内膜 P_4 濃度と その受容体との関連について

2-1. 序論

ウシでは黄体が存在する卵巢側の子宮角（同側角）の子宮内膜 P_4 濃度は，黄体が存在しない卵巢側の子宮角（反対側角）と比較して高いことが知られている（11,84）。同側角において，子宮内膜 P_4 濃度は黄体期初期で高く，黄体期中期および後期にかけてその濃度が低下することが報告されている（44）。また， P_4 核内受容体は，黄体期間中に低く，発情期前後の期間において高く発現することが多く報告されている（9, 41, 69）が， P_4 膜受容体の発情周期の動態に関する情報は少ない（44）。これまで，同側角と反対側角における子宮内環境の違いを明らかにする目的で，子宮内膜 P_4 濃度を測定することが行われてきた。しかし，子宮角を同側角と反対側角に分け，発情周期における子宮内膜 P_4 濃度とその受容体発現の動態との関係を調べた報告は見当たらない。また，ウシ胚移植において子宮角の体部に移植を行うよりも子宮角の先端部に移植した場合に受胎率が高いことが知られている（4）ことから，子宮角の部位によって子宮内環境が異なることが推測される。そこで本章では同側角および反対側角の子宮角を先端部と中腹部に分け，発情周期における子宮内膜 P_4 濃度とその受容体発現の動態を比較検討した。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 供試動物

と畜場から採取したホルスタイン種経産牛の生殖器を用いた。Miyamoto ら（62）の報告を基に卵巢内構造物である黄体および卵胞の形状から，発情周期を初期（排卵後 4～5 日， $n=6$ ），中期（排卵後 8～12 日， $n=6$ ）および後期（排卵後 15～17 日， $n=5$ ）の 3 つのステージに分類した。次に，同側角および反対側角から，先端部と中腹部の子宮内膜組織を採取した。先端部は，子宮先端から約 2cm の部位，中腹部は子宮広間膜付近から採取し，液体窒素にて凍結した。採取した子宮内膜は実験に供するまで，

-80℃の冷凍庫で保存した。

2-2-2. 子宮内膜組織中 P₄濃度の測定

子宮内膜 P₄濃度の測定は、2 抗体法による酵素免疫測定法 (EIA) によって測定した。EIA の手順は以前の報告に基づいて行った (61)。測定には、Dr. K. Okuda (Laboratory of Reproductive Endocrinology, Okayama University, Japan)より提供された P₄ポリクローナル抗体 (OK-1)を用いた。子宮内膜組織 0.1g 当たり 1 ml のアッセイ・バッファー (7.12g ; Na₂HPO₄, 8.5g; NaCl, 1.0g; BSA, pH7.2; 1N-HCl で調整)を加えて、15000rpm で 2 分間ホモジナイズ (MultiPro, DREMEL, Germany)を行った。その後、混濁液を 1450×g で 15 分間遠心分離を行い、上澄み 200 μl にジエチルエーテル 1 ml (関東化学, 東京, 日本)を加え、攪拌機 (DM-301, アズワン, 大阪, 日本)を用いて 30 分間ボルテックスし、その後室温にて 40 分間静置した。その後、-30℃の冷凍庫に移動し、24 時間かけて完全に凍結させた。凍結後、液層部分を 5 ml 試験管にデカントし、ドラフト内のウォーターバスに浸し、40℃まで上昇させながらジエチルエーテルを揮発させた後、50℃まで上昇させ、無臭になるまで完全に揮発させた。揮発後、試験管にアッセイ・バッファーを 100 μl 加え、20 分間ボルテックスした。この測定法による P₄の抽出効率は 83%であった。EIA は抗ウサギ IgG 抗体 (12.5 μg/ml; 生化学工業株式会社, 東京, 日本)で覆われた 96 穴 ELISA プレート (Corning Glass Works, Corning, New York, USA)を用いて行った。濃度測定は、スタンダードおよびサンプル 15 μl と 100 μl の P₄ポリクローナル抗体溶液 (1:300,000) と horseradish peroxidase (1:50,000) を混和し、4℃にて 20 時間以上浸透させた。P₄の標準曲線は 0.05~50ng/ml の範囲で、測定内変動および測定間変動係数はそれぞれ 8.5%および 10.5%であった。

2-2-3. RNA 抽出と cDNA 合成およびリアルタイム PCR

Total RNA の抽出は以下の手順で行った。液体窒素にて冷やしたすり鉢の中に凍結した子宮内膜サンプルを置き、液体窒素中でサンプルをすり潰した後に、1 ml の Isogen II (ニッポンジーン, 東京, 日本) の中に粉末状のサンプルを入れた。これに 400 μ l のジエチルピロカーボネイト (DEPC) -処理水を加えて、激しく混和させた後、10 分間静置した。静置後、4°C, 12000 \times g, 15 分間の遠心分離を行った。上澄み 1 ml を吸引し、これに 75%エタノールを加えて、10 分間静置した。静置後、4°C, 12000 \times g, 8 分間の遠心分離を行い、RNA のペレットを確認した。デカントした後、75%エタノールをさらに加えて 4°C, 8000 \times g, 2 分間の遠心分離を行う工程を 2 回行った。エタノールの除去後、6 μ l の DEPC-処理水を加えた。

逆転写は Superscript VIRO Reaction Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。まず、Nano-Drop 2000 (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA) を用いて RNA 濃度を算出した。次に、RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA) を用いて DNase 処理を行った。RNA が 1 μ g 含まれる RNA 溶液、1 μ l の DNase 10 \times Reaction Buffer および 2 μ l の RNase-Free DNase を混和し、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、1 μ l の DNase Stop Solution を加え 65°C で 10 分間インキュベートした。DNase 処理したサンプルに 5 \times VILO Reaction Mix を 4 μ l, 10 \times Super Script Enzyme を 2 μ l 加え、総量が 20 μ l になるように DEPC 処理水を加えた後、25°C で 10 分間、42°C で 60 分間および 85°C で 5 分間インキュベートし、cDNA を作成した。

2-2-4. リアルタイム PCR による mRNA 発現量の測定

リアルタイム PCR は SYBR Green (SYBR® Premix Ex Taq™ Tli RNaseH Plus, タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を使用し、Rotor-Gene Q (キアゲン, 東京, 日

本) を用いて行った。7.5 μ l の SYBR Green Master Mix, 5.75 μ l の DEPC 処理水, Forward と Reverse のプライマーを各 0.375 μ l を加え, 最後に 1.0 μ l のサンプルを加えて反応させた。測定する mRNA は, 核内 P₄ 受容体 (PGR), PGRMC1, PGRMC2 およびグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) である。GAPDH は内部標準遺伝子として用い, その発現との割合をもとめ, Pfaffl ら (67) の報告を基に相対定量解析を行った。プライマーは Primer3 を用いて設計した。リアルタイム PCR の反応条件は 94°C で 10 分間処理した後, 94°C で 30 秒, 各々のアニーリング温度で 30 秒 および 72°C で 30 秒のサイクルを 40 回行った。それぞれの mRNA のプライマーの塩基配列を示した表を Table 2-1 に示した。

2-2-5. 統計処理

結果は全て平均値±標準誤差で示した。子宮内膜組織中 P₄ 濃度の差の検定を行うにあたって, 2 元配置分散分析を行い, 全体の変化の有意差を調べ, 交互作用が有意であった場合, Bartlett 検定を行い分散の均一性を検定した後, Post-hoc 検定として Scheffe の多重比較検定を用いた。危険率 5%未満 ($P < 0.05$) で有意差ありとした。統計処理には統計処理ソフトである StatView (Abacus Concepts, Inc, Berkeley, CA, USA) を用いた。

2-3. 結果

先端部における子宮内膜組織中 P₄ 濃度を Table 2-2, 中腹部における結果を Table 2-3 に示した。先端部における子宮内膜 P₄ 濃度は分散分析の結果, 反対側角と比較して同側角で高くなったが, 経時的变化は認められなかった。両者に位置関係の作用と経時的な作用との交互作用は認められなかった。また, 中腹部においては, 分散分析の結果, 同側角と反対側角で差異はなく, 経時的な変化も認められなかった。

子宮角先端部の子宮内膜における PGR 発現は分散分析の結果、同側角と反対側角との間で差異は認められなかったが、経時的な変化が認められた。両者に位置関係の作用と経時的な作用との交互作用は認められなかった。そこで、同側角と反対側角との結果を合わせて、先端部における結果を Fig. 2-1 に、中腹部の結果を Fig.2-2 に示した。PGR 発現は、黄体期初期において高い発現が認められたが、中腹部においては周期による変化は認められなかった。PGRMC1 について先端部における発現を Fig.2-3 に、中腹部を Fig.2-4 に示した。PGRMC1 発現は分散分析の結果、黄体と子宮角との位置関係による作用と経時的な作用との間に交互作用が認められ、同側角の黄体期初期において高い発現が認められた。一方、中腹部では同側角および反対側角における差は認められなく、周期による変化も認められなかった。PGRMC2 について先端部における発現を Fig.2-5 に、中腹部における発現を Fig.2-6 に示した。PGRMC2 は先端部、中腹部において同側角および反対側角における差は認められなく、周期による変化も認められなかった。

先端部における子宮内膜 P₄濃度と PGR 発現、子宮内膜 P₄濃度と PGRMC1 発現との相関関係を調べたところ、黄体期初期においてのみ、子宮内膜 P₄濃度と PGR 発現には負の相関関係($r = -0.871$, $P < 0.05$)が、PGRMC1 には正の相関関係($r = 0.913$, $P < 0.05$)が認められた。

2-4. 考察

本章の結果から、子宮の先端部において、子宮内膜 P₄濃度は黄体期中を通じて同側角で高くなった。先端部の子宮内膜での PGR 発現に関しては、同側角と反対側角には差が認められないが、黄体期初期に高くその後、低値になることが示された。PGRMC1 発現に関しては、同側角と反対側角において差が認められ、さらに同側角の黄体期初期に高いことから、発情周期に変動することが示された。一方、中腹部における子宮

内膜組織の P_4 濃度、PGR と PGRMC1 の発現、先端部と中腹部における PGRMC2 発現は、同側角および反対側角で差がなく、黄体期間中に変化しなかった。

本章の結果から、同側角の子宮内膜組織 P_4 濃度が反対側角よりも高いことは、過去の報告 (11, 84) と一致し、発情周期中の変化についても同様の結果となった (44)。これは、黄体期における同側角と反対側角の子宮内膜組織 P_4 濃度の違いが、同側角への黄体の局所的作用に起因していることを示唆している。この作用機序については、卵巢から子宮への血流の動態が関連すると考えられ、これには、卵巢静脈、動脈、および子宮動脈の間でカウンター輸送システムの関与が推測される。雌ヒツジにおいて、 P_4 は、卵巢静脈から卵巢動脈へ輸送されることが示されている (83)。ウシでは、卵巢静脈から卵巢動脈へ E_2 が輸送されることが報告されている (45)。また、卵巢動脈と子宮動脈枝が血管の吻合によって相互接続されている (29)。さらには、同側角で分布する子宮動脈における P_4 濃度は、反対側角へ分布する子宮動脈における濃度よりも高かった (84)。これらの研究から、卵巢静脈のステロイドホルモンが動脈吻合によって卵巢動脈へ輸送され、その後、卵巢動脈や子宮動脈枝から卵管や子宮角へ供給されることが予想される。したがって、黄体から放出された P_4 は卵巢静脈、動脈、および子宮動脈内に輸送された後、子宮内膜に供給される可能性がある。このようなカウンター輸送システムによる子宮への P_4 供給が、同側角での高い P_4 濃度に寄与すると考えられた。

同側角における子宮内膜組織 P_4 濃度は、経時的な変化が認められなかった。一般的に、ウシの血中 P_4 濃度は黄体期初期に徐々に増加し、中期および後期に最大の濃度に達することが知られている (21, 38)。本研究の結果は、黄体期の子宮内膜組織 P_4 濃度の動態が、同側角および反対側角の両方において、血中 P_4 濃度と異なっていることを示した。子宮内膜組織 P_4 濃度の動態が、血中 P_4 濃度とは異なっていた理由は不明である。しかしながら、ウシにおいて、発情期前後の期間に黄体から子宮に向かう血流

が効率的に増加することが報告されている (24)。さらに、本研究から、黄体期初期において子宮内膜での P_4 受容体 mRNA の高い発現が得られたことから、血中の P_4 を子宮内膜組織へ取り込む機構があると考えた。以上のことから、子宮内膜組織 P_4 濃度の動態が血中の濃度と異なる原因として、①発情期前後の黄体から子宮に向かう血流の増加や②黄体期初期における子宮内膜での P_4 受容体 mRNA の発現が高いことが推測された。子宮内膜組織と血中における P_4 濃度の関係については、今後さらなる研究が必要である。

ウシにおいて、 P_4 の機能は、妊娠の成立に適する子宮内環境をもたらすと考えられている (81)。また、 P_4 受容体の発現は妊娠の確立のための重要な調節因子として認識されている (7)。黄体期中期および後期での子宮内膜における PGR 遺伝子発現の減少は、発情後 8~10 日で PGR 発現が減少する過去の報告 (9, 41, 69) と一致した。Bridges ら (6) は PGR 遺伝子発現の消失は、同側角における妊娠成立を支持するために必要とされる子宮腺からの分泌と関連する可能性を示唆している。

Kowalik ら (44) は、同側角のウシ子宮内膜における PGRMC1 と PGRMC2 遺伝子の発現が、発情周期中で差がなかったことを報告している。本研究結果では、同側角および反対側角に関わらず、黄体期中の PGRMC2 の遺伝子発現に変化は認められなかった。同側角におけるこれらの結果は、これまでの報告と一致していた (44)。一方、先端部における同側角で PGRMC1 遺伝子発現は、黄体期初期に高かった。本研究が示した PGRMC1 遺伝子発現の動態が、以前の研究と本研究の間で異なっている理由は不明であるが、Kowalik ら (44) の報告では、サンプルの採取部位に関する詳細記載がされていないため、採取部位の違いが本研究と Kowalik ら (44) の報告との違いに関与した可能性は大いに考えられる。ウシ子宮内膜における PGR 発現はステロイドホルモンによって調節されている (19, 66)。しかし、PGRMC1 を制御する要因については明らかではない。本研究では、黄体期初期における同側角の先端部の P_4 濃度

と PGRMC1 遺伝子発現の間に正の相関があることを示した。卵巣割去を行ったマウスの子宮において、PGRMC1mRNA は P_4 投与によって上方制御されることが示された (85)。先端部において、黄体期初期の同側角における P_4 濃度および PGRMC1 mRNA 発現はその他の黄体期と比較して高値であったことから、同側角の先端部における PGRMC1 mRNA 発現は、子宮内膜組織における高い P_4 濃度によって調節される可能性が示された。ウシ子宮内膜において、 P_4 核内受容体および膜受容体が妊娠成立に及ぼす役割は不明であるが、胚が存在するであろう黄体期初期の同側角先端の P_4 濃度および PGRMC1 発現が他の部位や時期と異なっていた事は、それらが胚発育のための子宮内環境調節に関与している可能性を示している。

子宮内膜 P_4 濃度と PGR および PGRMC1 遺伝子発現との相関関係が黄体期初期の同側角でのみ認められたことから、PGR と PGRMC1 の発現への P_4 の作用が同側角と反対側角との間に子宮内環境の違いを作り出すと考えられた。一方、 P_4 受容体にはその他の膜受容体である mPR (α , β および γ) を介する経路も存在し (23)、その作用が同側角と反対側角との子宮内環境の違いを制御している可能性がある。ウシにおいて、妊娠牛と非妊娠牛を比較したところ、15.5 日時点での子宮内膜組織の mPR (α , β および γ) 遺伝子発現における差は認められなかった (6)。しかしながら、ウシ子宮内膜における黄体期初期に関して、mPR (α , β および γ) の発現は調べられていない。今後、黄体期初期におけるウシ子宮内膜の mPR (α , β および γ) 発現を調査する必要があると考えられた。

PGR 遺伝子発現は、同側角と反対側角で差は認められなかった。一般的に、ウシ子宮内膜における PGR 遺伝子発現は、 P_4 によって下方制御されることが知られている (66)。子宮内膜組織 P_4 濃度は、反対側角に比べて同側角で高かったが、本研究では、同側および反対側角の PGR 遺伝子発現の差は認められなかった。本研究から、子宮内膜 P_4 濃度と PGR 遺伝子発現の負の相関が、黄体期初期の同側角に確認された。これ

らの結果から、PGR 遺伝子発現の下方制御は、同側角は P₄ 濃度による下方制御が関与するものの、反対側角では P₄ 濃度との関連は低いと考えられた。妊娠牛における子宮での PGR 遺伝子発現は、非妊娠牛に比べて低いことが報告されている (6, 66)。また、Forde ら (27) は、排卵後の血中 P₄ 濃度が低値である場合、PGR 遺伝子発現の下方制御を遅延させることを報告した。このことから、PGR 遺伝子発現の下方制御が同側角における高い子宮内膜組織 P₄ 濃度に起因し、その下方制御が同側角の子宮内環境を制御するために必要であると考えられた。

2-5. 小括

本研究では、黄体の同側角と反対側角の子宮内膜組織 P₄ 濃度および P₄ 受容体の発現の動態の違いを明らかにした。PGR または PGRMC1 の発現は、同側角の先端部で子宮内膜組織の P₄ 濃度と、負または正の相関を示した。同側角および反対側角の先端部における子宮内膜組織 P₄ 濃度および P₄ 受容体の発現の動態の違いが、同側角と反対側角の子宮内環境の違いを引き起こすと考えられ、黄体の同側角の子宮内環境を、胚の発育や受胎成立へ適したものへと制御する機構の一部であることが推察された。

Table 2-1. Primers used in real-time PCR

Gene		Sequence of nucleotide (5'-3')	Size (bp)	Annealing temperature (°C)	Accession no.
PGR	F ^a	TAATCTGTGGGGATGAAGCA	181	58	NM 001205356
	R ^b	CAGCACTTTCTAAGGCGACA			
PGRMC1	F	AGGAGTGAGGTCGGAAAGGT	165	59	NM 001075133
	R	ATCAATGGCAAGGTGTTTCG			
PGRMC2	F	CCAGAGGACTGGCAACATTT	167	56	NM 001099060
	R	ACGGTTCTTCCCCTGGTTT			
GAPDH	F	CCACTTGATGTTGGCAGGAT	66	59	XM 001252511
	R	GAAGCTCGTCATCAATGGAAA			

^a Forward^b Reverse

Table 2-2. Concentration of endometrial tissue P₄ in cranial part of the ipsilateral and contralateral horn

Stages (n)	Endometrial tissue P ₄ (ng/g)		
	Ipsi-horn	Contra-horn	Overall means
ELP (6)	32.6 ± 3.7	15.9 ± 2.0	24.3 ± 3.2
MLP (6)	25.8 ± 1.4	14.4 ± 2.7	20.1 ± 2.2
LLP (5)	18.8 ± 3.7	12.5 ± 2.7	13.7 ± 2.4
Overall means	26.1 ± 2.1 ^a	14.4 ± 1.4 ^b	

Significant differences at $P < 0.01$ between ipsilateral horn (ipsi-horn) to a CL and contralateral horn (contra-horn) are indicated by *ab*.

The luteal phase divided into three stages (ELP: early luteal phase, n=6; MLP: mid-luteal phase, n=6; LLP: late luteal phase, n=5)

Values are mean ± SEM.

Table 2-3. Concentration of endometrial tissue P₄ in middle part of the ipsilateral and contralateral horn

Stages (n)	Endometrial tissue P₄ (ng/g)		
	Ipsi-horn	Contra-horn	Overall means
ELP (6)	16.4 ± 4.2	14.4 ± 2.7	15.4 ± 2.4
MLP (6)	11.9 ± 2.6	9.2 ± 2.3	10.6 ± 1.7
LLP (5)	15.6 ± 4.7	8.9 ± 3.0	12.3 ± 2.9
Overall means	14.6 ± 2.1	10.9 ± 1.6	

The luteal phase divided into three stages (ELP: early luteal phase, n=6; MLP: mid-luteal phase, n=6; LLP: late luteal phase, n=5)
Values are mean ± SEM.

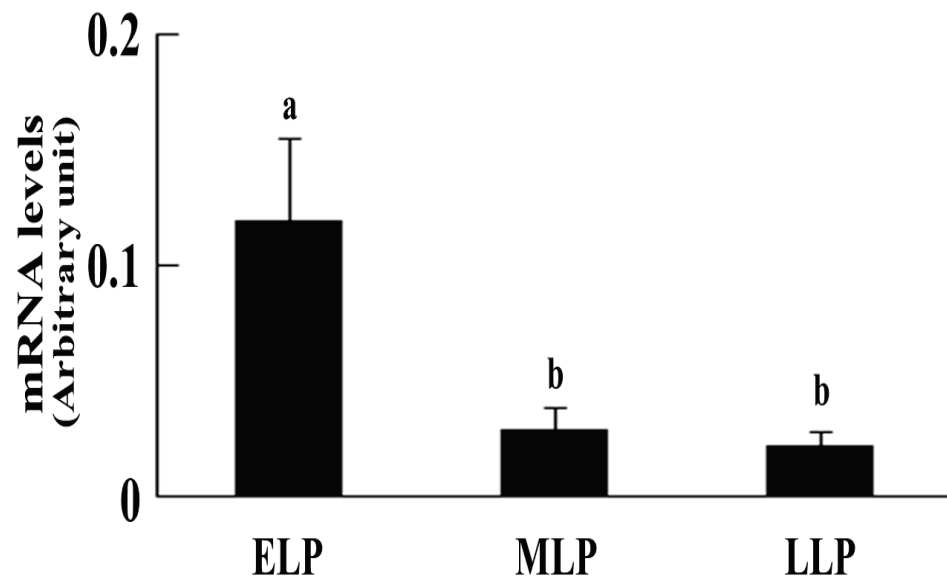


Fig. 2-1.

Comparative changes of the relative amounts of mRNA of PGR during the luteal phase (ELP, n=12; MLP, n=12; LLP, n=10) in the cranial part of the uterus. Since the effect of location was not observed, data of ipsilateral (ELP, n=6; MLP, n=6; LLP, n=5) and contralateral (ELP, n=6; MLP, n=6; LLP, n=5) were combined. Significant differences at $P < 0.05$ within the respective day are indicated by the symbol ab. Values are mean \pm SEM. The luteal phase divided into three stages (ELP: early luteal phase; MLP: mid-luteal phase; LLP: late luteal phase).

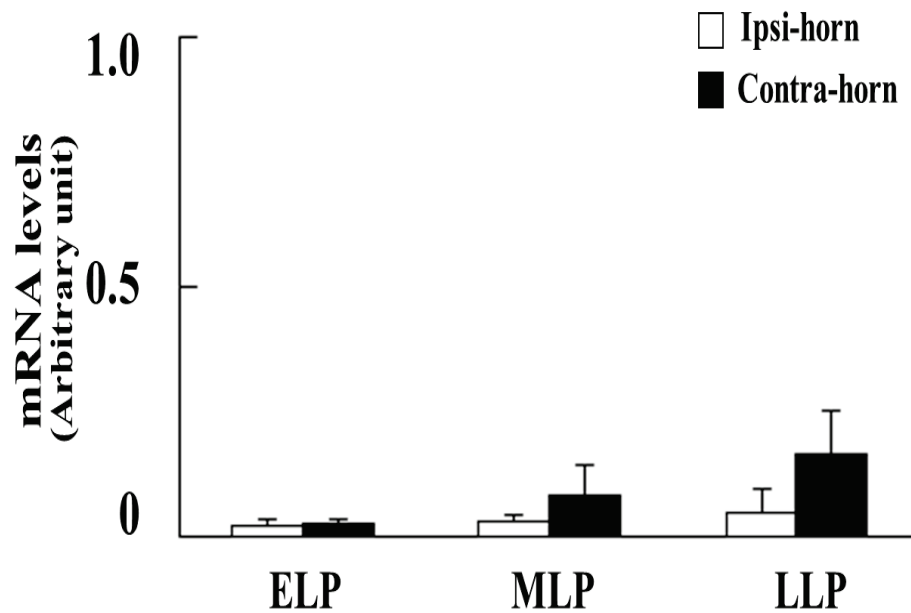


Fig. 2-2.

Comparative changes of the relative amounts of mRNA of PGR during the luteal phase (ELP, n=6; MLP, n=6; LLP, n=5) in the middle part of the uterus. In the middle part, both main effects (location and day) and the location by day interaction were not significant. Values are mean \pm SEM. The luteal phase divided into three stages (ELP: early luteal phase; MLP: mid-luteal phase; LLP: late luteal phase).

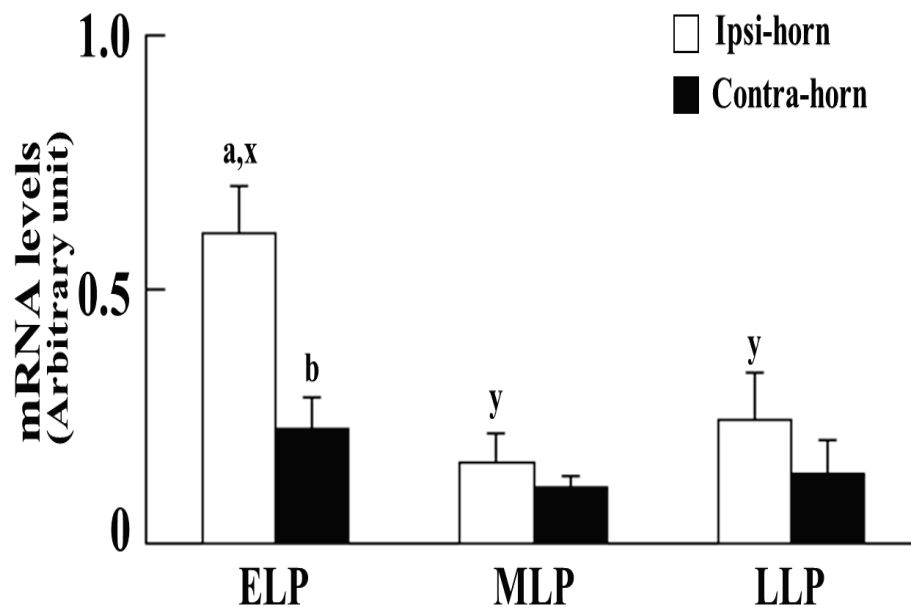


Fig. 2-3.

Comparative changes of the relative amounts of mRNA of PGRMC1 during the luteal phase (ELP, n=6; MLP, n=6; LLP, n=5) in the cranial part of the uterus. In the cranial part, both main effects (location and day) and the location by day interaction were significant. Significant differences at $P < 0.05$ within respective day between the horns ipsilateral (ipsi-horn) and contralateral (contra-horn) to a CL are indicated by the symbol ab, whereas differences within the ipsi-horn among the three day are indicated by the symbol xy. Values are mean \pm SEM. The luteal phase divided into three stages (ELP: early luteal phase; MLP: mid-luteal phase; LLP: late luteal phase).

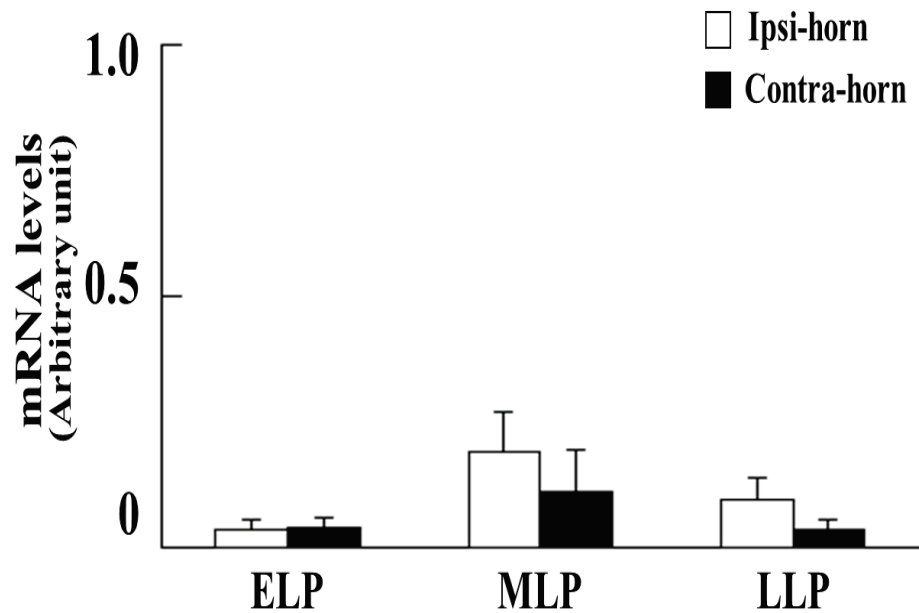


Fig. 2-4.

Comparative changes of the relative amounts of mRNA of PGRMC1 during the luteal phase (ELP, n=6; MLP, n=6; LLP, n=5) in the middle part of the uterus. In the middle part, both main effects (location and day) and the location by day interaction were not significant. Values are mean \pm SEM. The luteal phase divided into three stages (ELP: early luteal phase; MLP: mid-luteal phase; LLP: late luteal phase).

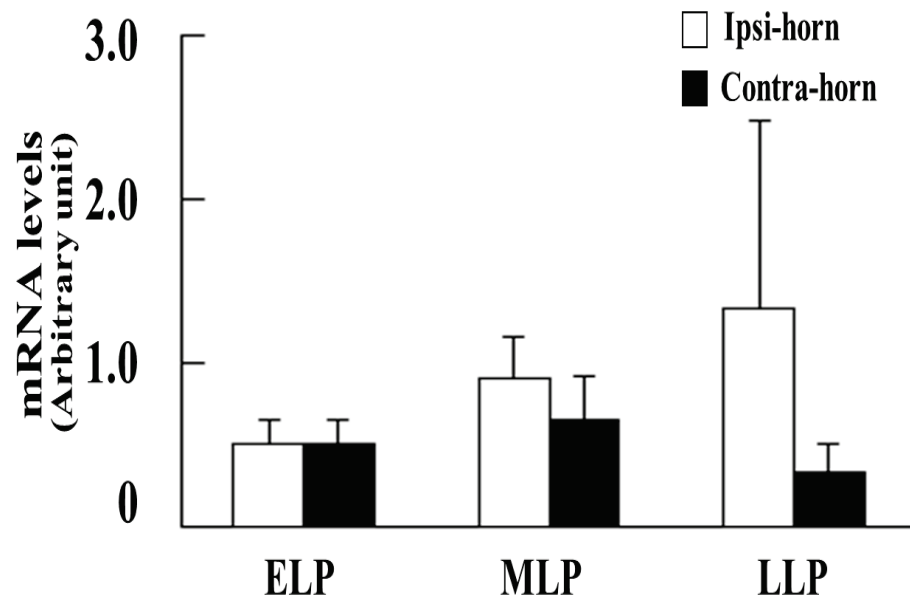


Fig. 2-5.

Comparative changes of the relative amounts of mRNA of PGRMC2 during the luteal phase (ELP, n=6; MLP, n=6; LLP, n=5) in the cranial part of the uterus. In the cranial part, both main effects (location and day) and the location by day interaction were not significant. Values are mean \pm SEM. The luteal phase divided into three stages (ELP: early luteal phase; MLP: mid-luteal phase; LLP: late luteal phase).

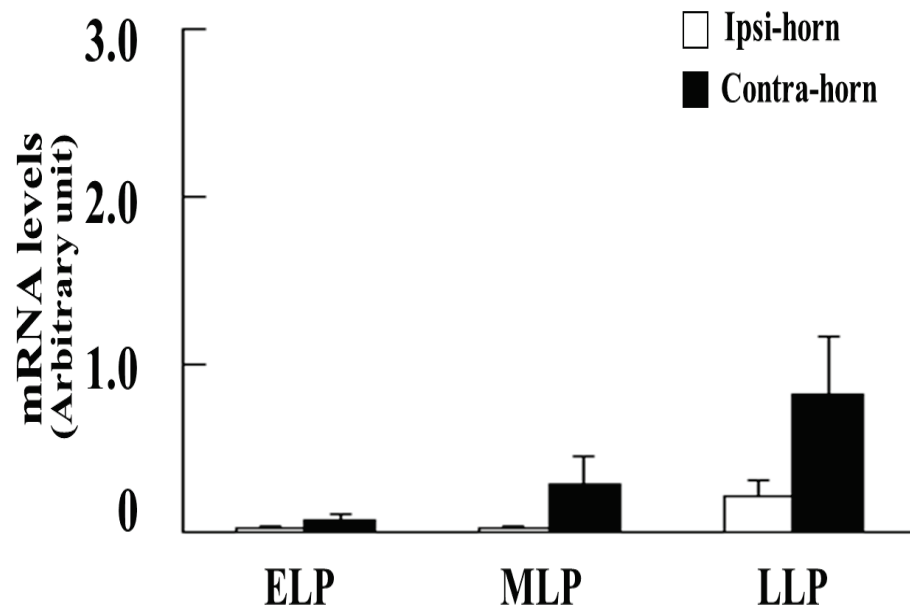


Fig. 2-6.

Comparative changes of the relative amounts of mRNA of PGRMC2 during the luteal phase (ELP, n=6; MLP, n=6; LLP, n=5) in the middle part of the uterus. In the middle part, both main effects (location and day) and the location by day interaction were not significant. Values are mean \pm SEM. The luteal phase divided into three stages (ELP: early luteal phase; MLP: mid-luteal phase; LLP: late luteal phase).

第 3 章

黄体と第 1 卵胞波主席卵胞の局所作用が
ウシ子宮内膜の P_4 および E_2 濃度と
その受容体に与える影響について

第3章

3-1. 序論

ウシの子宮内膜組織中の P_4 濃度の動態について、黄体と同側角で高いことが知られており (11, 84)、発情周期においても黄体期に高いことが示されている。また、同側角あるいは反対側角に受精卵移植を行った場合、同側角で受胎率が高いことが知られている (16)。一方、子宮内膜組織中の E_2 濃度は過去に報告されている (57) が、発情周期における子宮内膜 E_2 濃度の推移に関する検討はされていない。近年、人工授精後に第1卵胞波主席卵胞が黄体の存在する卵巣に共存する場合、黄体の存在しない卵巣に主席卵胞が発育する場合と比べ受胎率が低いことが報告された (60)。第1卵胞波主席卵胞は、排卵後の低 P_4 濃度の期間中に発育することから、黄体期に存在しながらも、第2卵胞波主席卵胞に比べ高い機能を有する特徴を持つ卵胞として知られている (3, 59)。このことから、第1卵胞波主席卵胞から分泌される E_2 が黄体を有する卵巣側の子宮角の子宮内膜に局所的な影響を与える可能性があり、人工授精後の第1卵胞波において黄体が存在する卵巣で主席卵胞が発育する場合（共存）と、存在しない場合（非共存）では、子宮内膜組織中 E_2 濃度が異なることが推測される。

そこで、第3章では、子宮内膜組織中における P_4 および E_2 濃度が子宮内環境を制御する機構を明らかにするために、第1卵胞波主席卵胞と黄体との位置関係を考慮し、発情周期における子宮内膜中ステロイドホルモン動態 (P_4 および E_2) とその受容体 (PGR, PGRMC1, PGRMC2, ESR-1)、子宮乳関連因子 (ANPEP, LPL) およびオキシトシン受容体 (OXR) について、第1卵胞波主席卵胞が黄体と共存する場合（共存）と共存しない場合（非共存）に分け、比較した。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 供試動物

臨床的に健康で、正常な発情周期を有するホルスタイン種泌乳牛 18 頭を用いた。うち 12 頭(平均産次数; 3.0 ± 1.9 , 平均日乳量; 28.9 ± 4.1 kg, 平均分娩後日数; 252.3 ± 84.6 日)を対照群に用い, 6 頭(平均産次数; 3.0 ± 2.3 , 平均日乳量; 28.8 ± 6.8 kg, 平均分娩後日数; 352.2 ± 59.1 日)を hCG 投与群に用いた。ウシは帯広畜産大学畜産フィールド科学センター内のパドックにて, コーンサイレージ, 乾草および濃厚飼料が混和された TMR が給与され, 自由に飲水できる状況で飼養されていた。実験内容は帯広畜産大学の実験動物倫理委員会で承認されている。

3-2-2. 実験方法

第 3 章では, 第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内環境に与える局所的作用を明らかにするために, 対照群では, 第 1 卵胞波主席卵胞と黄体との関係に着目して解析を行い, hCG 投与群ではヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin, hCG) 投与により第 1 卵胞波主席卵胞を排卵させることで, 主席卵胞の存在しない状況で解析を行った。

3-2-3. 実験群の区分

本章では, 12 頭のウシを対照群とし第 1 卵胞波主席卵胞が黄体と共存する群 (共存群; $n=6$) と第 1 卵胞波主席卵胞が黄体と共存しない群 (非共存群; $n=6$) に分けた。また, hCG 投与を行うウシ 6 頭を hCG 投与群とし, hCG 共存群($n=3$)と hCG 非共存群($n=3$)に分けた。

また、対照群および hCG 投与群の両群において, 共存群 (Coexistence, C) と非共存群 (Non-coexistence, NC) に分け, それぞれの子宮角を黄体と同側角 (Ipsi-horn) あるいは反対側角 (Contra-horn) の 4 群に区分した。4 つの群の区分について表と図に記載した (Table 3-2, Fig.3-1)

3-2-4. 供試牛への処置

対照群は、12頭のウシを用い、全てのウシで自然発情終了後、Ovsynch法にて排卵同期化を行い(68)、排卵誘起処置を行った後、超音波画像診断装置(HS-100V, 本多電子, 愛知, 日本)を用いて、卵巣を観察した。排卵誘起の7日前(Day-7)に卵胞波の同期化を行うためにGnRH(100 μ g 酢酸フェリチレリン, 筋肉内投与; スポルネン, 共立製薬株式会社, 東京, 日本)を投与し, Day-2に黄体を退行させるためにPGF₂ α (ジノプロスト 25 mg, 筋肉内投与; プロナルゴン F, ゴエティスジャパン株式会社, 東京, 日本)を投与し, Day0に排卵誘起を目的としたGnRH投与を行った。超音波画像診断装置にて排卵を確認した日をDay1とした。Day5に超音波画像診断装置にて黄体と主席卵胞との位置関係を調べ, 第1卵胞波主席卵胞が黄体と共存する群(共存群; n=6)と第1卵胞波主席卵胞が黄体と共存しない群(非共存群; n=6)に分けた。

hCG投与群は6頭のウシを用い, 対照群と同様の排卵同期化処置を行った。Day5に超音波画像診断装置を用いて第1卵胞波主席卵胞と黄体の位置を確認し, 共存群(n=3)と非共存群(n=3)に区分した後, 1500単位のhCG(ゲストロン 1500, 共立製薬株式会社, 東京, 日本)を筋肉内へ投与した。Day7に第1卵胞波主席卵胞の排卵を確認した後, Day12に誘起黄体の形成を確認した。

3-2-5. 卵巣および黄体形態の観察

Day5, 7および12に主席卵胞の平均直径および黄体の平均直径を, 5.0MHzのリンアプローブを接続した超音波画像診断装置(HS-100V, 本多電子, 愛知, 日本)を用いて測定した。プローブを手指とともに直腸内に挿入し, 左右両側卵巣の断層像を観察した。主席卵胞の卵胞断層画像が最大になるよう静止画を記録した。パソコン上で静止画を用いて, 主席卵胞と黄体の長径と短径を測定し, 平均直径を算出した。

3-2-6. 採血

試験期間中の Day0 から Day12 まで連日に 21G 採血針とヘパリン加真空採血管（ベノジェクトⅡ真空採血管，TERUMO，東京）を用いて尾静脈より 10 ml の採血を行った。採取した血液は氷水中にて急冷後，4℃で 2000×g，20 分間遠心し，分離採取した血漿を，P₄および E₂濃度測定まで−30℃にて凍結保存した。

3-2-7. 子宮内膜バイオプシー

試験期間中の Day5，7 および 12 において同側角，反対側角から子宮内膜バイオプシーを行った。Chapwanya ら（12）および Sakumoto ら（71）の方法を修正して子宮内膜バイオプシーを行った。すなわち，バイオプシー前に超音波画像診断装置を用いて子宮内の状況を把握し，外陰部をきれいに洗浄した。子宮内膜組織採取器（子宮内膜採取器 澤向式，富士平工業株式会社，東京，日本）を膣および子宮頸管を経由して子宮内に挿入し，子宮角間膜を超えたことを確認した後，バイオプシーにより，黄体の存在する卵巣側の子宮角（同側角），黄体の存在しない卵巣側の子宮角（反対側角）の計 2 箇所からそれぞれ 20 mg 程度の子宮組織を採取した。これらは 1 周期に 3 回連続してバイオプシーを行うため，Day5 以降のサンプルには炎症反応等の影響を及ぼすことが考えられる。そこで，Day5 においては腹側，Day7 では右側もしくは左側，Day12 では背側面から子宮内膜組織を採取した。

3-2-8. 血中 P₄濃度および子宮内膜 P₄濃度の測定

血中および子宮内膜 P₄濃度の測定は 2 抗体法による EIA によって測定した。また，子宮内膜 P₄濃度測定の手順は第 2 章と同様の方法で行われた。血漿より P₄を抽出するために，血漿 200 μl にジエチルエーテル 1.0 ml を加え，攪拌機（DM-301，アズ

ワン, 大阪, 日本) を用いて 30 分間ボルテックスし, その後室温にて 40 分間静置した。その後, -30°C の冷凍庫に移動し, 24 時間かけて完全に凍結させた。凍結後, 液相部分を 5 ml 試験管にデカントし, ドラフト内のウォーターバスに浸し, 40°C まで上昇させながらジエチルエーテルを揮発させた後, 50°C まで上昇させ無臭になるまで完全に揮発させた。揮発後, 試験管にアッセイ・バッファー (7.12g ; Na_2HPO_4 , 8.5g; NaCl , 1.0g; BSA, pH7.2; 1N-HCl で調整) を 200 μl 加えて, 20 分間ボルテックスした。この測定法による P_4 の抽出効率 は 83% であった。EIA は抗ウサギ IgG 抗体 (12.5 $\mu\text{g/ml}$; 生化学工業株式会社, 東京, 日本) で覆われた 96 穴 ELISA プレート (Corning Glass Works, Corning, New York, USA) を用いて行った。濃度測定は, スタンダードおよびサンプル 15 μl と 100 μl の P_4 ポリクローナル抗体溶液 (1:300,000) と horseradish peroxidase (1:50,000) を混和し, 4°C にて 20 時間以上浸透させた。 P_4 の標準曲線は 0.05~50 ng/ml の範囲で, 測定内変動および測定間変動はそれぞれ 8.5% および 10.5% であった。

3-2-9. 血中 E_2 濃度および子宮内膜 E_2 濃度の測定

血中および子宮内膜 E_2 濃度の測定は, 市販されている kit を用いて測定した (Estradiol Serum EIA Kit, Arbor Assays, MI, USA)。血漿および子宮内膜組織中のステロイドホルモン抽出方法は第 2 章の手法と同様の手法で行った。子宮内膜組織 0.1g 当たり 1 ml となるようにアッセイ・バッファーを加えて, 15000rpm で 2 分間ホモジナイズを行い, ホモジナイズした混濁液 100 μl と血漿 1 ml からジエチルエーテルによって E_2 が抽出された。アッセイバッファーをそれぞれ 100 μl 加え, 20 分間ボルテックスした。濃度測定は, スタンダードおよびサンプルを 100 μl 抗ヒツジ抗体と Estradiol-peroxidase を 25 μl 加え, 2 時間室温で振盪しながらインキュベートした。その後, プレート中の溶液をデカントし, wash-buffer で洗浄し, 専用の TMB 溶液を

100 μ l 加え 30 分間室温に静置した。30 分後に Stop-Solution を 50 μ l 加え、プレートリーダーを用いて 450nm における吸光度を測定した。E₂ の標準曲線は 3.75~120 pg/ml の範囲で、測定内変動および測定間変動係数はそれぞれ 17.0% および 19.5% であった。

3-2-10. RNA 抽出と cDNA 合成およびリアルタイム PCR

RNA 抽出と cDNA 合成およびリアルタイム PCR は第 2 章と同様の方法で行った。測定する mRNA は、第 2 章の因子に加え、オキシトシン受容体 (OXR), エストロゲン受容体 (ESR1), 子宮乳関連因子 (ANPEP, LPL) である。GAPDH は内部標準遺伝子として用い、第 2 章と同様の手法によって相対定量解析を行った。プライマーは Primer-3 を用いて作成した。リアルタイム PCR の反応条件は 94°C で 10 分間処理した後、94°C で 30 秒、各々のアニーリング温度で 30 秒および 72°C で 30 秒のサイクルを 40 回行った。それぞれの mRNA のプライマーの塩基配列を示した表を Table 3-1 に示した。

3-2-11. 統計処理

結果は全て平均値±標準偏差で示した。血中および子宮内膜組織中 P₄, E₂ 濃度、遺伝子発現の差の検定を行うにあたって、2 元配置分散分析を行い、全体の変化の有意差を調べ、交互作用が有意であった場合、Bartlett 検定を行い分散の均一性を検定した後、Post-hoc 検定として Scheffe の多重比較検定を用いた。危険率 5%未満 ($P < 0.05$) で有意差ありとした。統計処理には統計処理ソフトである StatView (Abacus Concepts, Inc, Berkeley, CA, USA) を用いた。

3-3. 結果

【対照群の黄体直径の推移と血中および子宮内膜 P₄ 濃度】

対照群を共存群と非共存群に分け、血中 P₄ 濃度と黄体直径の推移を Fig. 3-2 および 3-3 に示した。さらに共存群と非共存群についてそれぞれ同側角と反対側角に分けた 4 群（共存・同側角; I-C, 共存・反対側角; C-C, 非共存・同側角; I-NC, および, 非共存・反対側角; C-NC）における子宮内膜 P₄ 濃度を Fig. 3-4 に示した。血中 P₄ 濃度は、共存群が非共存群と比較して高く推移した (Fig. 3-2)。黄体の直径は、共存群と非共存群で差は認められなかったが、時間の経過とともに増加した (Fig. 3-3)。一方、子宮内膜 P₄ 濃度は、分散分析の結果、共存群と比べて非共存群で高くなる傾向がみられた。さらに子宮角と黄体との位置関係による効果と経時的変化との間に弱い交互作用がみられ、Day5 では同側角で子宮内膜 P₄ 濃度が高くなった (Fig.3-4)。

【対照群の卵胞直径の推移と血中および子宮内膜 E₂ 濃度】

共存群と非共存群における第 1 卵胞波主席卵胞の直径の推移を Fig. 3-5 に、血中 E₂ 濃度を Table 3-3 に示した。黄体と卵胞の位置関係を考慮した 4 群における Day5 および 7 の子宮内膜 E₂ 濃度の結果を Fig. 3-6 に示した。卵胞の直径は、共存群と非共存群で差は認められなかったが、時間の経過とともに増加した (Fig. 3-5)。血中 E₂ 濃度は Day5 よりも Day7 で高くなる傾向がみられたが、卵胞と黄体との位置関係の影響はなかった (Table 3-3)。子宮内膜 E₂ 濃度は、卵胞と黄体との位置関係および黄体と子宮角との位置関係の影響を受けなかった (Fig. 3-6)。

【対照群の子宮内膜における遺伝子発現】

P₄ 受容体 (PGR, PGRMC1, PGRMC2) の mRNA 発現を Fig. 3-7, 3-8 および 3-9 に示し、子宮乳関連因子 (ANPEP, LPL) の mRNA 発現を Fig. 3-10 および 3-11 に示した。また、E₂ 受容体 (ESR1) の mRNA 発現を Fig. 3-12 に、オキシトシン受容体 (OXR) の mRNA 発現を Fig. 3-13 に示した。PGR および PGRMC1 の遺伝子発現は、同側角において Day5 で高く、その後、低値を示した (Fig. 3-7 および 3-8)。一方、反対側角

では、Day5 から Day12 まで低く推移した。PGRMC2 遺伝子発現は同側角と反対側角とで差異はなく、経時的な変化も認められなかった(Fig. 3-9)。子宮乳関連因子のうち ANPEP 遺伝子発現は、同側角が反対側角よりも高く、共存群と比較して非共存群で高値を示した (Fig. 3-10)。しかし、卵胞と黄体との位置関係、黄体と子宮角との位置関係に交互作用は認められなかった。LPL 遺伝子発現は同側角と反対側角とで差異はなく、経時的な変化も認められなかった (Fig. 3-11)。ESR1 遺伝子発現は Day5 で高く、Day7 および Day12 で低かった (Fig. 3-12)。オキシトシン受容体遺伝子発現は Day7 と比較して Day5 で高かった (Fig. 3-13)。

【対照群と hCG 投与群における血中および子宮内膜 P₄濃度の比較】

hCG 投与群と対照群における、共存群と非共存群の血中 P₄濃度の推移を Fig. 3-14 に示した。Day12 における hCG 投与群と対照群の血中 P₄濃度と黄体の直径を Table 3-4 に示した。hCG 投与群と対照群における黄体と卵胞の位置関係を考慮したそれぞれ 4 群の子宮内膜 P₄濃度を Fig. 3-15 に示した。hCG 投与群と対照群における黄体と卵胞の位置関係を考慮したそれぞれ 4 群の間で血中 P₄濃度に差異がなかった (Fig. 3-14) が、Day12 において hCG 投与群は対照群よりも血中 P₄濃度が高かった (Table 3-4)。子宮内膜 P₄濃度は hCG 投与群と対照群における同側角と反対側角に差が認められなかった (Fig. 3-15)。

【対照群と hCG 投与群における血中および子宮内膜 E₂濃度の比較】

hCG 投与群と対照群における血中 E₂濃度を Table 3-5 に、それぞれ 4 群の Day5 および 7 の子宮内膜 E₂濃度を Fig. 3-16 に示した。血中 E₂濃度は対照群で Day5 から Day7 にかけて上昇したが、hCG 投与群では上昇しなかった (Table 3-5)。子宮内膜 E₂濃度は hCG 投与群の同側角と反対側角で差は認められなかった (Fig. 3-16)。

【対照群と hCG 投与群の子宮内膜における遺伝子発現の比較】

hCG 投与群と対照群における同側角および反対側角の PGR 遺伝子発現を Table 3-6

に、PGRMC1 遺伝子発現を Table 3-7 に、PGRMC2 遺伝子発現を Table 3-8 に示した。また、hCG 投与群と対照群における E₂ 受容体 (ESR1) 遺伝子発現の結果を Table 3-9 に示した。PGR 遺伝子発現は Day7 において卵胞と子宮角との位置関係と hCG 投与の影響との間に交互作用があり、卵胞と同側角の PGR 遺伝子発現は対照群と比較して hCG 投与群で有意に高かった (Table 3-6)。PGRMC1 遺伝子発現は hCG 群と対照群の同側角と反対側角で有意差は認められなかった (Table 3-7)。PGRMC2 遺伝子発現は Day7 および Day12 において黄体と子宮角との位置関係、卵胞と子宮角との位置関係、hCG 投与の影響との間に交互作用が認められた。Day7 において hCG 非共存群の黄体と反対側角は対照群の非共存群の黄体と反対側角よりも高値であった。また、Day12 において hCG 非共存群の黄体と反側角は、対照群の非共存群の黄体と反対側角よりも高く、hCG 共存群の黄体と同側角および反対側角よりも高かった (Table 3-8)。ESR1 遺伝子発現は hCG 群と対照群の同側角と反対側角で有意差は認められなかった (Table 3-9)。

3-4. 考察

本章の結果から、共存群は非共存群と比較して血中 P₄ 濃度が高いことが示された。一方、子宮内膜 P₄ 濃度は非共存群が共存群と比較して高かった。Day5 において同側角は反対側角と比較して子宮内膜 P₄ 濃度が高く、Day7 と Day12 には両角の P₄ 濃度の差が無くなった。卵巢周期が明らかな乳牛に対し子宮内膜バイオプシーを行い、同側角および反対側角の子宮内環境を評価した報告は見当たらない。本研究によって、卵巢周期が明らかである乳牛の黄体期における血中 P₄ 濃度と子宮内膜 P₄ 濃度の推移の比較を行い、これらの推移が異なることをウシで初めて報告した。排卵後の黄体形成期において、血中 P₄ 濃度と子宮内膜 P₄ 濃度の推移には違いがあり、同側角と反対側角における子宮内膜 P₄ 濃度の違いが両角の受胎性の違いに関連していると考えられ

た。本研究の同側角における子宮内膜 P_4 濃度は、と畜場から採取した子宮を用いた第 2 章の研究結果と類似していた。本研究では、これらの推移の違いの原因について説明することはできない。第 2 章で考察したように、卵巣静脈からのステロイドホルモンが卵巣動脈や子宮動脈枝を介して子宮へ輸送されるカウンター輸送システムが、黄体期の血中 P_4 濃度と子宮内膜 P_4 濃度の違いに関与している可能性がある。

さらに、血中 P_4 濃度は非共存群と比較して共存群で高かったのに対し、子宮内膜 P_4 濃度は共存群と比較して非共存群で高いことが示された。このことから、黄体と卵胞の位置関係が血中 P_4 濃度と子宮内膜 P_4 濃度に及ぼす影響は、共存群と非共存群で異なる可能性が示された。血中 P_4 濃度が共存群で高いことから、共存群の黄体の機能が活発である可能性が考えられたが、子宮内膜 P_4 濃度は非共存群で高く、その理由は不明である。一方、共存群と非共存群で黄体の直径に差は認められなかったため、黄体の P_4 分泌機能は共存群と非共存群とで同程度であった可能性も考えられる。それにもかかわらず、血中 P_4 濃度が共存群で高く、子宮内膜 P_4 濃度が非共存群で高くなった要因として、黄体から分泌される P_4 の全身循環と子宮への配分が異なっていた可能性が考えられる。卵胞と黄体が同一卵巣内に共存する場合は、共存しない場合よりも黄体の血流量が増加する (30) ことから、卵胞が存在する卵巣では卵巣内の血流が増加していると推測される。つまり、本研究における共存群では卵巣静脈への血流量が増加することで、 P_4 の全身循環への配分が高まり、その結果、非共存群に比べ、共存群の血中 P_4 濃度が高かったかもしれない。

P_4 核内受容体ノックアウトマウスにおいて、交配を行っても妊娠が成立しない (51) ことから、 P_4 核内受容体は妊娠成立に重要な役割を担っていると考えられている。しかし、ウシ子宮内膜での PGR 発現の妊娠成立における役割は解明されていない。一般的に、ウシ子宮内膜における PGR の発現は発情期前後に高く、黄体期で低いことが知られている (9, 41, 69)。また、Bridges ら (6) は妊娠牛の同側角における子宮内膜の

PGR mRNA 発現は、15.5 日目の非妊娠牛と比較して低値であると報告している。一方、本研究から、PGR mRNA 発現が Day5 において反対側角と比較して同側角で有意に高いことが示された。これらの結果から、黄体期初期には PGR mRNA 発現が高く、黄体期中期から後期にかけて PGR mRNA 発現が低いことが受胎性に影響を与えると考えられ、黄体期のステージによって PGR 発現と受胎性との関連が異なっている可能性がある。人工授精後早期の P₄ 製剤処置によって胚の発育が促され (56)、いくつかの研究では受胎率が増加すると報告している (73, 77, 79)。また、Lonergan ら (47) は黄体期初期の P₄ 製剤処置による PGR 発現の下方制御が、胚発育に必要な組織栄養素の分泌機構に関連していると述べている。これらのことから、黄体期初期における P₄ 受容体の下方制御が胚発育のための子宮内環境を制御していると考えられている。そのため、同側角でのみ Day5 における PGR mRNA 発現が高く、その後低く推移することが、同側角における妊娠成立機構に重要な役割を担っているのかもしれない。

PGRMC1 遺伝子発現は多種の動物の生殖器で存在が確認されており、その機能は抗アポトーシスや薬物の代謝など様々である (70)。しかし、ウシ子宮内膜における PGRMC1 の生理学的な役割は不明である。PGRMC1 遺伝子発現は Day5 の同側角で高く、第 2 章での結果を支持するものであった。この結果から、PGRMC1 は同側角と反対側角の受胎性の違いに関連する因子である可能性が考えられるが、その作用機序については不明である。本研究の同側角における PGRMC1 遺伝子発現の推移は、過去の報告とは異なっていた (44)。この相違は、材料の採取時期の違いであると考えられる。Kowalik ら (44) は、発情周期を 4 つのステージに大きく分類したが、筆者らは発情周期を確認し、Day5, 7 および 12 に材料を採取した。サンプル採取時期の違いにより、両研究の間で異なる結果が生じたと推察できる。同側角の子宮内膜における PGRMC2 遺伝子発現の経時的な変化は認められなかった。この結果は過去の報

告と類似する結果となった。PGRMC1 や PGRMC2 は MAPR 群に分類されるが、P₄ 膜受容体にはその他に mPR 群 (α, β, γ) が存在することが知られている。MAPR 群や mPR 群は P₄ が結合し、様々な作用を有することが知られている。ヒト子宮内膜において mPR- α 遺伝子発現が月経周期中の増殖期と比較して分泌期に高く (22)、ヒツジ子宮内膜において黄体期初期に mPR- α 遺伝子発現が高いことが報告されている (2) ことから、ウシにおいても同様に排卵後の黄体形成の時期に mPR- α が子宮内膜に作用している可能性があると考えられる。P₄ が結合することによって作用する子宮内膜の MAPR 群や mPR 群の機能が受胎性に与える影響について、さらなる詳細な研究が必要であると考えられた。

ANPEP および LPL は、黄体期初期の子宮腺細胞に発現しており子宮乳に関連する因子として知られている (25)。本研究では、同側角は反対側角よりも ANPEP 遺伝子発現が有意に高値を示した。また、非共存群が共存群よりも有意に高値を示した。本研究では、子宮内膜 P₄ 濃度は反対側角よりも同側角で高いことが示されており、ANPEP も同様な結果を示したことから、ANPEP 発現は P₄ に刺激される可能性が示唆される。Forde ら (26) は ANPEP が P₄ によって制御されている可能性を示唆していることから、同側角における高い子宮内膜 P₄ 濃度は ANPEP 発現を刺激していると考えられる。子宮腺が欠如したヒツジへ胚移植を行った場合、胚の発育が妨げられることから、子宮腺からの子宮乳分泌は胚の発育に重要な役割を担っていることが確認されており (27)、ウシにおいても、P₄ に制御される子宮乳関連因子が、胚発育に必要な子宮環境調節の役割を担っていると考えられている (20, 47, 63)。また、同側角へ胚移植を行った場合、反対側角へ移植した場合よりも受胎率が高い (16) ことが知られている。本研究における同側角での ANPEP の高値は、同側角での子宮乳分泌に関与し、同側角と反対側角の受胎性の違いに影響を及ぼしていると考えられる。また、共存群よりも非共存群で ANPEP 遺伝子発現が高かった。人工授精後において非共存群

は共存群よりも受胎率が高いことが報告されていることから、共存群よりも非共存群の同側角において子宮乳の分泌機構が活性化している可能性が考えられた。

本研究では、子宮内膜 E_2 濃度は卵胞と同側角と反対側角で差が無いことを示した。ウシにおける子宮内膜 E_2 濃度は、これまでの研究にて報告されている (57)。しかしながら、本研究の結果は過去の報告よりも濃度が高く、これまでの報告とは異なる結果となった。この結果の違いは、子宮内膜組織の採取部位や E_2 濃度測定に用いた抗体が異なることに起因するかもしれない。第 1 卵胞波主席卵胞は排卵後の血中 P_4 濃度が低い期間中に発育するため、その活性は高く、黄体期中に閉鎖・退行するまでその機能を維持している。本研究では、排卵後の黄体が形成される期間において、第 1 卵胞波主席卵胞が機能を有し、黄体と同様に子宮内へ局所的な作用を及ぼすと仮説をたてた。しかしながら、子宮内膜 E_2 濃度は卵胞と同側角と反対側角で差が認められなかった。本研究で子宮内膜を調べた Day5 および Day7 は、黄体の形成期であり、血中 P_4 濃度が、経時的に上昇する期間である。黄体形成期の血中 P_4 濃度の上昇において個体差がみられることが知られており (55)、このことは、 P_4 による卵胞機能制御の状態も個体間で差異のあることを示している。つまり、この時期の主席卵胞の特性は様々であり、その結果、子宮内膜に移行する E_2 の量も卵胞と子宮の位置関係の影響より卵胞機能の影響を強く受けている可能性がある。人工授精を行い、共存群と非共存群における受胎牛と不受胎の子宮内膜 E_2 濃度を評価することで、卵胞の機能と子宮内膜への局所的作用が受胎性に与える影響について解明できるかもしれない。

Jinks ら (36) は胚移植において、レシピエントへの排卵同期化処置に E_2 を加えることで受胎率を改善すると報告した。また、卵胞刺激ホルモン(FSH)投与と比較して妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)投与で過剰排卵処置を行った場合に回収卵数や正常卵率が低下し、発情後における E_2 濃度の再上昇がその要因であることが示唆されている (1, 10, 46)。これらの報告から、発情期における E_2 濃度は受胎性に促進的な影

響を与える一方で、発情後の E_2 濃度は抑制的な影響を及ぼす可能性が考えられる。また、Wijayagunawardane ら (84) は卵管組織中の E_2 濃度は卵胞の存在する側で高く、 P_4 濃度は黄体の存在する側で高いことを報告し、卵管への黄体および卵胞の局所作用が卵管の胚輸送能を制御する可能性を示唆した。このような既報の結果に加え、共存群と比較して非共存群で受胎率が高いという報告 (60)、さらに、本研究で示した第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内膜へ局所的な影響を及ぼさなかったことを考慮すると、共存群と非共存群における受胎性の違いは、子宮ではなく卵管への第 1 卵胞波主席卵胞の局所作用に起因するのかもしれない。第 1 卵胞波主席卵胞が受胎性に与える影響について、卵管に着目した解析が必要であると考えられた。

E_2 受容体は共存群と非共存群の同側角および反対側角に関わらず Day5 に高く、その後低く推移した。同側角における推移の結果は過去の報告と一致した (69)。Bridges ら (6) は 15.5 日目の受胎牛と不受胎牛における子宮内膜の E_2 受容体(ESR1)遺伝子発現を比較し、不受胎牛で ESR1 の発現が高いことを報告した。このことから、ウシ子宮内膜の E_2 受容体の発現状況が受胎性に影響を及ぼすと推察した。しかしながら、本研究では同側角と反対側角の ESR1 遺伝子発現の差が認められず、ウシ子宮内膜における E_2 受容体発現は、同側角と反対側角における受胎性の違いに関与していない可能性が考えられた。

オキシトシン受容体は Day5 で高く、その後低く推移した。これらの結果は過去の報告と同様であった (69)。オキシトシン受容体は子宮内膜からの $PGF_{2\alpha}$ 産生に重要な役割を果たしていることが知られており (64, 78)、黄体退行前に子宮内膜で受容体が発現する (53) ことから、黄体期後期におけるオキシトシン受容体の発現は黄体退行を誘引する役割を担っていると考えられている。オキシトシン受容体発現は、胚からの Interferon- τ によって抑制されることが報告されている (54, 69)。また、Robinson ら (69) は妊娠牛と非妊娠牛へ子宮内膜バイオプシーを行い、妊娠牛においてオキシ

トシン受容体が抑制されていることを示した。このオキシトシン受容体発現は E_2 によって上方制御され则认为られており (69, 82), 黄体期後期における $PGF_{2\alpha}$ の役割や妊娠成立に関連があることが示唆されているが, 黄体期初期における発現の役割についてはわかっていない。また、オキシトシン受容体は P_4 により下方制御する可能性が示唆されている (34)。子宮内膜 P_4 濃度は反対側角と比較して同側角で高いため, 同側角ではオキシトシン受容体発現が低値になると予想されたが, 同側角と反対側角で差は認められなかった。同側角は排卵前卵胞から分泌される大量の E_2 に曝露されていると推察され, オキシトシン受容体発現は上方制御され, 排卵直後には同側角でオキシトシン受容体発現が高くなっている可能性が考えられる。その後、同側角での高い P_4 濃度により受容体発現が下方制御されたため, 同側角と反対側角での差異が見られなかった可能性が考えられる。本研究では共存群と非共存群の同側角および反対側角でオキシトシン受容体発現に有意差は認められなかったため, 同側角と反対側角における受胎性の違いにはオキシトシン受容体発現の関連性は低いと推測された。

hCG 群は対照群と比較して血中 P_4 濃度は Day12 において有意に高かった。しかしながら, hCG 共存群と hCG 非共存群には有意差は認められなかった。また, hCG 群の同側角と反対側角における子宮内膜 P_4 および E_2 濃度, P_4 および E_2 受容体の遺伝子発現は対照群と比較して有意差は認められなかった。hCG 投与による第 1 卵胞波主席卵胞の排卵, 誘起黄体の形成によって血中 P_4 濃度が上昇することが知られており (65), 本研究はこれらの過去の研究と同様の結果を示した。しかし, 子宮内膜 P_4 濃度は, hCG 群と対照群との間, 同側角と反対側角との間で有意差は認められなかった。hCG 投与による誘起黄体の形成により, 子宮内膜への局所的作用が生じると予想したが, 子宮内膜 P_4 濃度への影響は見られなかった。この理由を明らかにすることはできないが, 黄体退行後の排卵によって形成される黄体と黄体形成期に排卵誘起により生じた誘起黄体とでは, 子宮内膜へ与える局所的作用に何らかの差異があると推測される。hCG

群と対照群の血中 E_2 濃度、両群の同側角と反対側角における子宮内膜 E_2 濃度に有意差は認められなかった。hCG 群は第 1 卵胞波主席卵胞を排卵させるため、排卵後において血中 E_2 濃度および卵胞が存在した卵巣側の子宮角における子宮内膜 E_2 濃度は低下すると予測されたが、投与前後で差は認められなかった。血中 E_2 濃度が hCG 投与前後において低下しなかったことは、過去の報告と異なっていた (65)。本研究では排卵後 5 日目に hCG を投与したが、過去の報告では排卵後 6 日目に hCG 投与を行っており、本研究は 1 日早い hCG 投与であった。そのため、過去の報告と比較して、本研究では、第 1 卵胞波主席卵胞の選抜から hCG 投与時までの時間が短く、hCG 投与時に第 1 卵胞波の次席卵胞が完全に閉鎖していない可能性が考えられた。また、hCG はウシにおいて LH 作用を有し、その半減期は約 30 時間と長い (13) ことから、本研究では、第 1 卵胞波主席卵胞の排卵に加え、完全な閉鎖に至っていない次席卵胞を刺激し、その結果、血中 E_2 濃度を微増させたと考えられた。hCG 群と対照群を比較して、誘起黄体の形成が子宮内膜のステロイドホルモン濃度に影響を与えなかったことから、同側角および反対側角における P_4 受容体および E_2 受容体の発現に影響を及ぼさなかったと考えられた。排卵後 5 日目の hCG 投与は、誘起黄体形成により血中 P_4 濃度は上昇させるが、その局所的作用が少ない可能性が示されたことから、排卵後の子宮内膜における黄体の局所的作用を解明する実験モデルには必ずしも適さないことが考えられた。また、hCG 投与によって血中 E_2 濃度が低下せず、子宮内膜 E_2 濃度も減少しないことから、排卵後 5 日目以降の hCG 投与が第 1 卵胞波主席卵胞の機能を消失させる実験モデルに適しているのかもしれない。黄体や第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内膜に与える作用が明確である研究モデルの作成し、排卵後における黄体と第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内環境に与える影響を解明する必要があると考えられた。

3-5. 小括

本研究では、黄体期における同側角および反対側角の子宮内膜 P_4 、 E_2 濃度とその受容体の推移を示した。血中 P_4 濃度は共存群で高値を示したが、子宮内膜 P_4 濃度は非共存群で高値を示した。また、共存群、非共存群を比較することで第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内膜 P_4 濃度に影響を及ぼす可能性を示した。子宮内膜 P_4 濃度は同側角で高く、ANPEP も同様の結果を得たことから、同側角では子宮内膜 P_4 濃度が高く、その作用によって子宮乳の分泌機構が活発であることが示唆された。子宮内膜 E_2 濃度は黄体と卵胞との位置関係に影響されないことから、第 1 卵胞波主席卵胞による子宮内膜への局所的作用は少ないと考えられた。排卵後 5 日目における hCG 投与後の誘起黄体形成によって血中 P_4 濃度の上昇は排卵後 12 日目で確認されたが、子宮内膜 P_4 濃度におよぼす局所的作用は少なかった。また、排卵後 5 日目の hCG 投与によって血中 E_2 濃度は減少しなかった。

Table 3-1. Primers used in real-time PCR

Gene		Sequence of nucleotide (5'-3')	Size (bp)	Annealing temperature (°C)	Accession no.
PGR	F ^a	TAATCTGTGGGGATGAAGCA	181	58	NM 001205356
	R ^b	CAGCACTTTCTAAGGCGACA			
PGRMC1	F	AGGAGTGAGGTCGGAAAGGT	165	59	NM 001075133
	R	ATCAATGGCAAGGTGTTCG			
PGRMC2	F	CCAGAGGACTGGCAACATTT	167	56	NM 001099060
	R	ACGGTTCTTCCCCTGGTTT			
OXR	F	TGGTTCTTGGTGGCTGTGTA	136	58	NM 174134.2
	R	GCTTGGTTTGATGGTGGAGT			
ESR1	F	TCAGGCTACCATTACGGAGTTT	120	55.9	NM 001001443
	R	GTTTTTATCAATCGTGCACTGG			
ANPEP	F	ATCCGGATGCTCTCGAATTC	81	60	NM 001075144.1
	R	TCTGATAGGCAAAGGTCTGCAA			
LPL	F	CAGGTCGAAGTATCGGAATCCA	67	60	NM 001075120.1
	R	GAAAGTGCCTCCGTTAGGGTAAA			
GAPDH	F	CCACTTGATGTTGGCAGGAT	66	59	XM 001252511
	R	GAAGCTCGTCATCAATGAAAA			

^a Forward^b Reverse

Table 3-2. Structures on the ovaries for classifying four groups

Uterine horn ¹⁾	Structures on the Ovaries			Groups ³⁾
	Relationship ²⁾	CL	DF	
Ipsi-horn	Coexistence	+	+	Ipsi-coexistence (I-C)
Contra-horn		—	—	Contra-coexistence (C-C)
Ipsi-horn	Non-coexistence	+	—	Ipsi-non-coexistence (I-NC)
Contra-horn		—	+	Contra-non-coexistence (C-C)

¹⁾ Ipsi-horn = uterine horn ipsilateral to the ovary with CL.

Contra-horn = uterine horn contralateral to the ovary with CL.

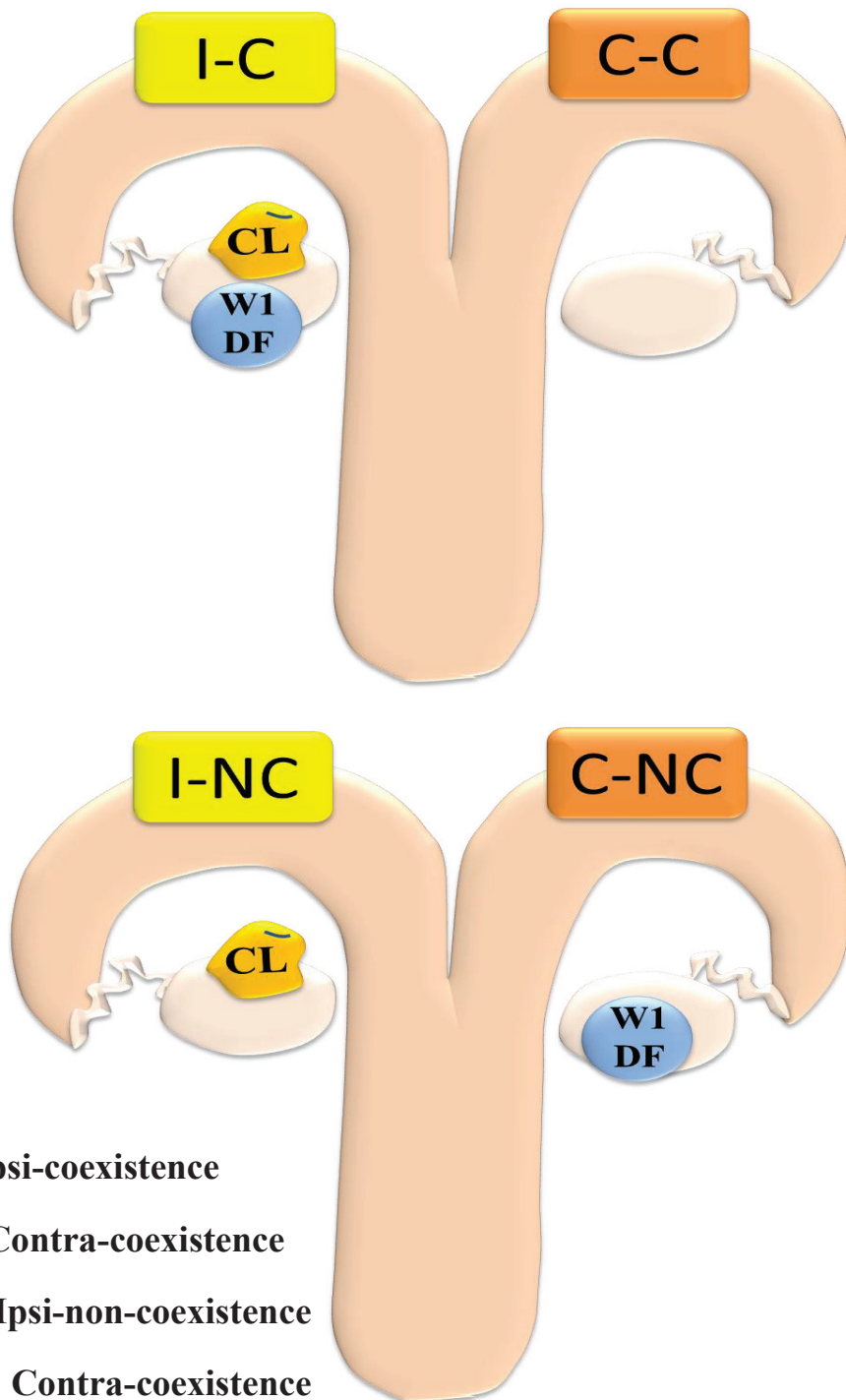
²⁾ Relationship CL and DF on the ovaries.

³⁾ Ipsi-coexistence = Ipsilateral horn to the CL and coexistence CL-DF group.

Contra-coexistence = Contralateral to the CL and coexistence CL-DF group.

Ipsi-non-coexistence = Ipsilateral horn to the CL and non-coexistence CL-DF group.

Contra-non-coexistence = Contralateral horn to the CL and non-co-existence CL-DF group.



I-C: Ipsi-coexistence

C-C: Contra-coexistence

I-NS: Ipsi-non-coexistence

C-NC: Contra-coexistence

Fig. 3-1.

Structures on the ovaries and locational relationship between CL and DF for classifying of uterus horns into four groups.

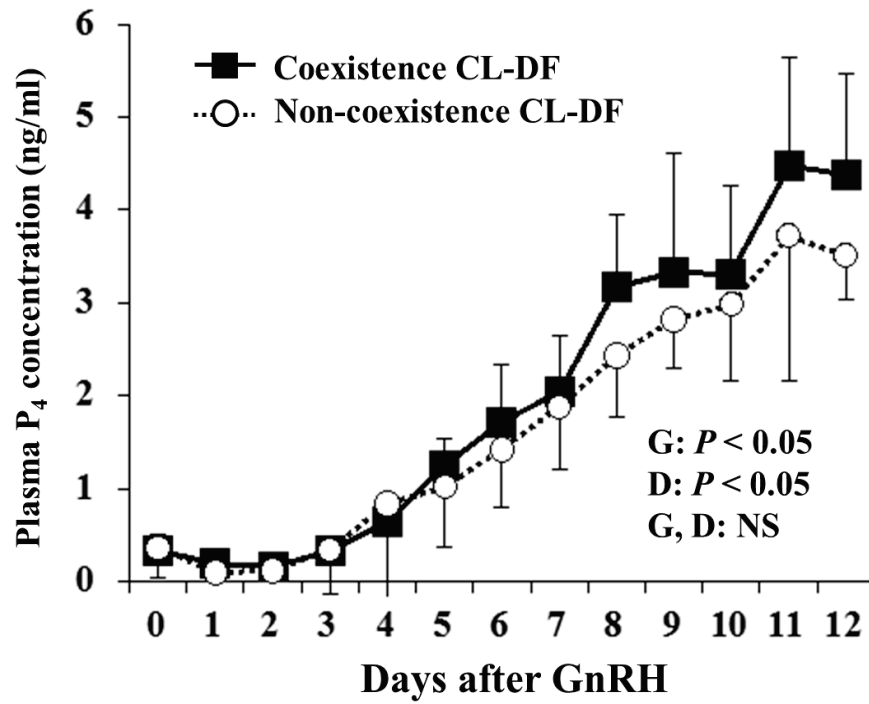


Fig. 3-2.

Comparative changes of plasma P₄ concentration in coexistence CL-DF group (n=12) and non-coexistence CL-DF group (n=12) from Day 0 to 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Both main effects of group (G) and day (D) were significant, and the group by day interaction was not significant. Values are mean \pm SD of each point.

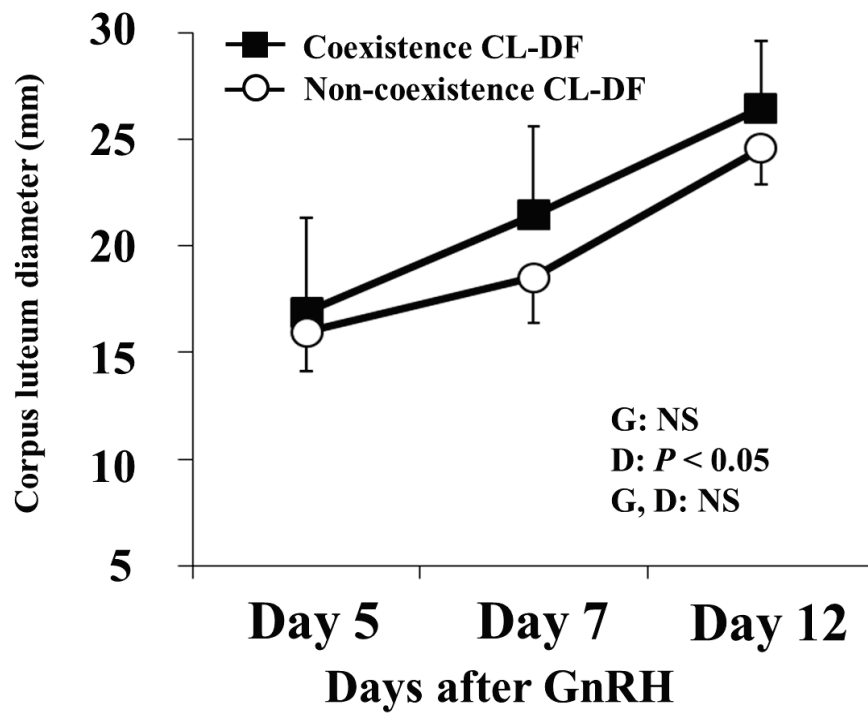


Fig. 3-3.

Comparative changes of the CL diameter in coexistence CL-DF group (n=12) and non-coexistence CL-DF group (n=12) from Day 5 to 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Main effect of day (D) was significant, and the group (G) by day interaction were not significant. Values are mean \pm SD of each point.

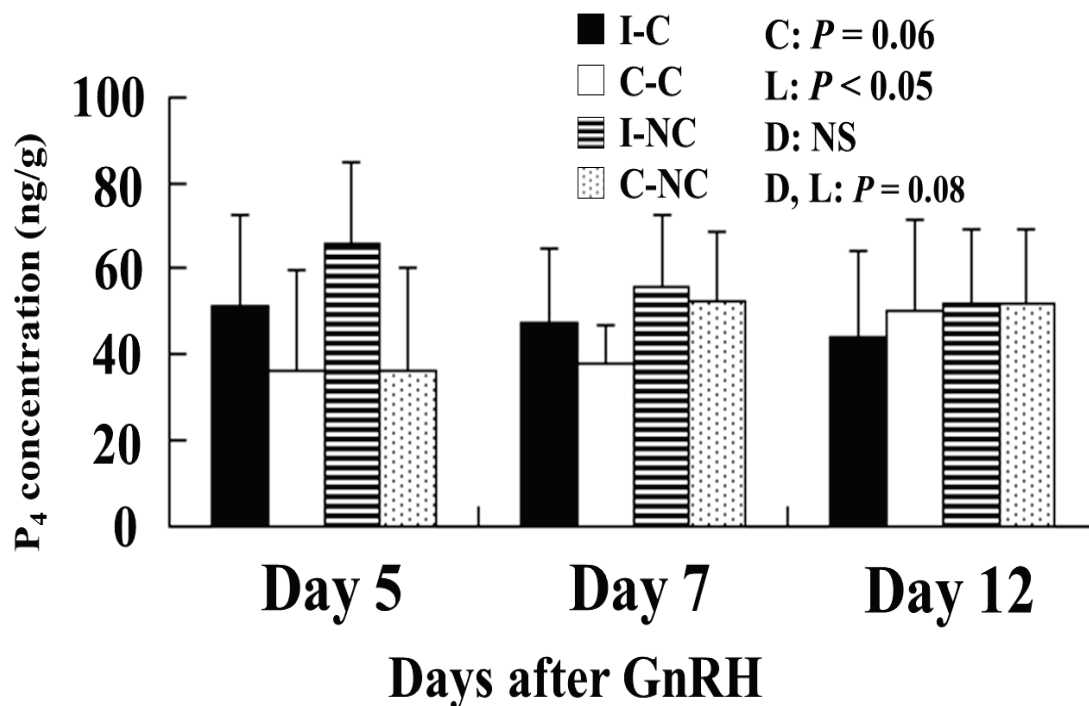


Fig. 3-4.

Comparative changes of endometrial tissue P_4 concentration in I-C, C-C, I-NC, C-NC from Day 5 to 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Main effects of coexistence of CL with DF (C) tended to be significant and locational relationship of uterine horn to the CL (L) was significant, and the day (D) by L interaction tended to be significant. I-C; Ipsilateral horn and coexistence CL-DF group; $n=6$, C-C; Contralateral horn and coexistence CL-DF group; $n=6$, I-NC; Ipsilateral horn and non-coexistence CL-DF group; $n=6$, C-NC; Contralateral horn and non-coexistence CL-DF group; $n=6$. Values are mean \pm SD.

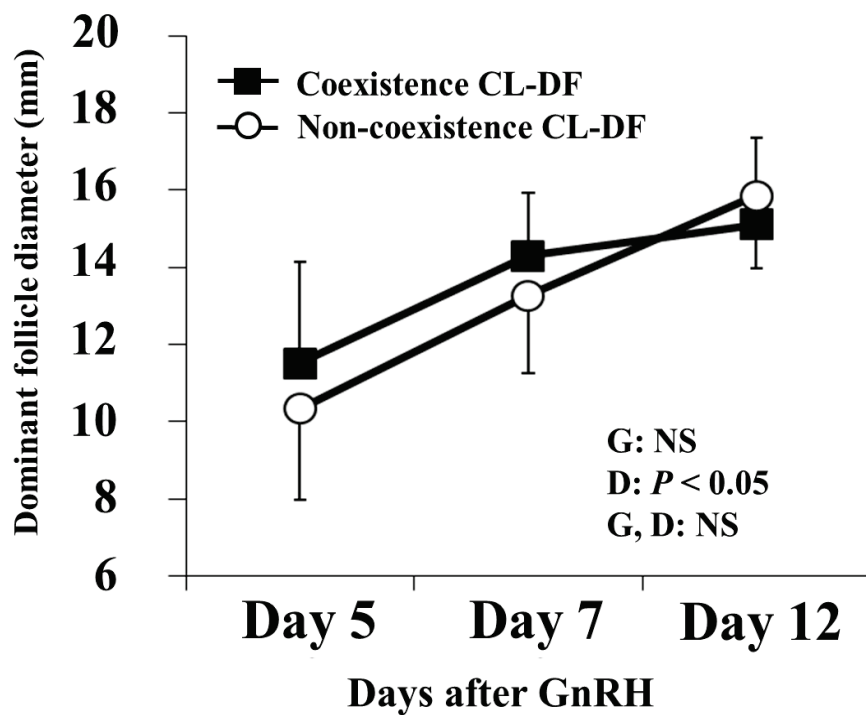


Fig. 3-5.

Comparative changes of the dominant follicle (DF) in coexistence CL-DF group (n=12) and non-coexistence CL-DF group (n=12) from Day 5 to 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Main effect of day (D) was significant, and the group (G) by day interaction were not significant. Values are mean \pm SD of each point.

**Table 3-3. Plasma E₂ concentration
on Day 5 and Day 7**

Group (n)	E₂ (pg/ml)	
	Day 5	Day 7
C (6)	2.3 ± 1.1	2.9 ± 0.8
NC (6)	2.9 ± 0.8	3.9 ± 1.5

C = Coexistence CL-DF group.

NC = Non-coexistence CL-DF group.

Day 0 = day of GnRH treatment.

Day 1 = day of ovulation.

Values are mean ± SD.

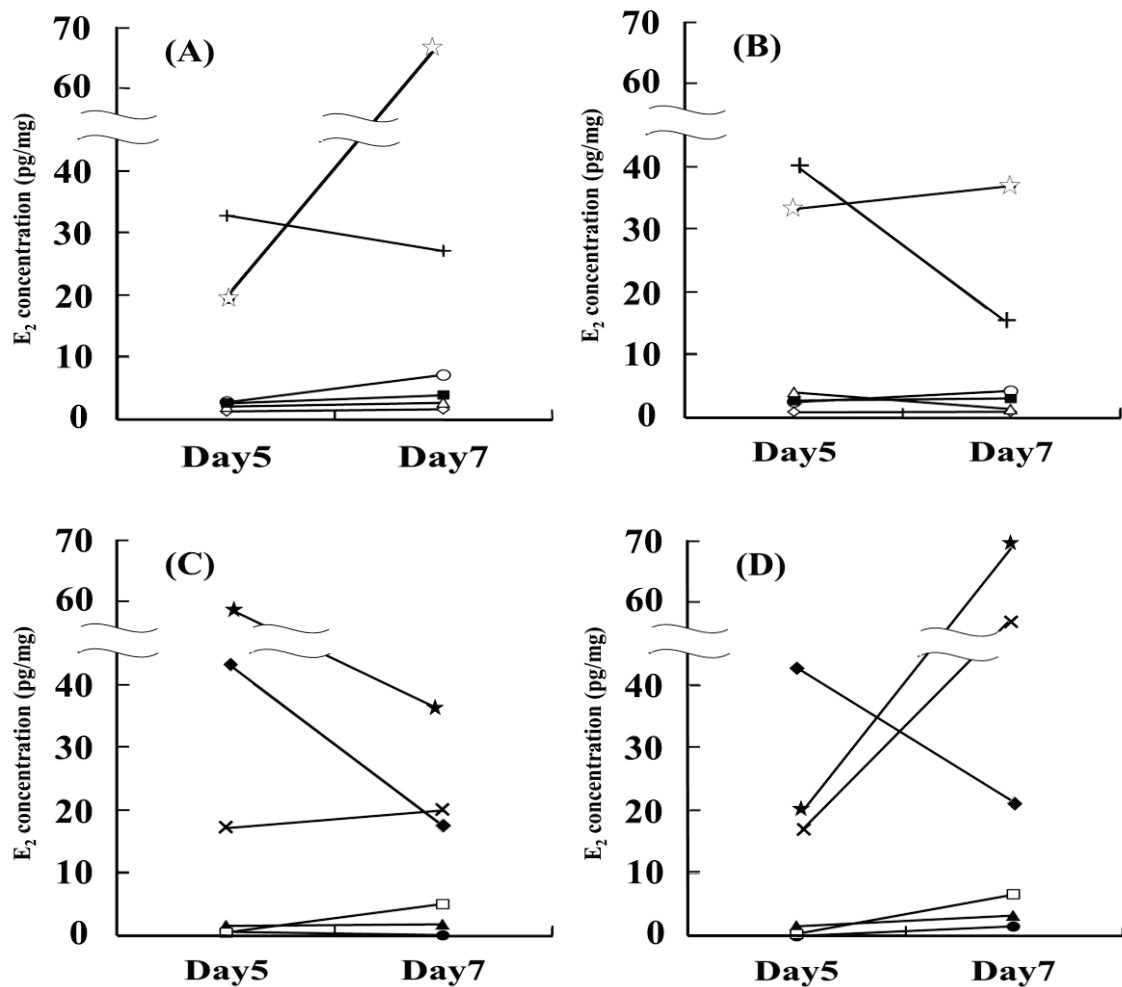


Fig. 3-11.

Comparative changes of endometrial tissue E₂ concentration of I-C (A), C-C (B), I-NC (C), C-NC (D) from Day 5 to 7. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. (A) and (B) showed the data of coexistence group (n=6); six plots (open star; ☆, horizontal cross; +, open circle; ○, closed square; ■, closed triangle; ▲, open diamond; ◇) showed each of the individual. (C) and (D) showed the data of non-coexistence group (n=6); six plots (closed star; ★, diagonal cross; ×, closed circle, ●, open square; □, open triangle △, closed diamond; ◆) showed each of the individual. Both main effects (coexistence, location and day) and the main effects of interactions were not significant. I-C; Ipsilateral horn to the CL and coexistence CL-DF group. C-C; Contralateral horn to the CL and coexistence CL-DF group. I-NC; Ipsilateral horn to the CL and non-coexistence CL-DF group. C-NC; Contralateral horn to the CL and non-coexistence CL-DF group.

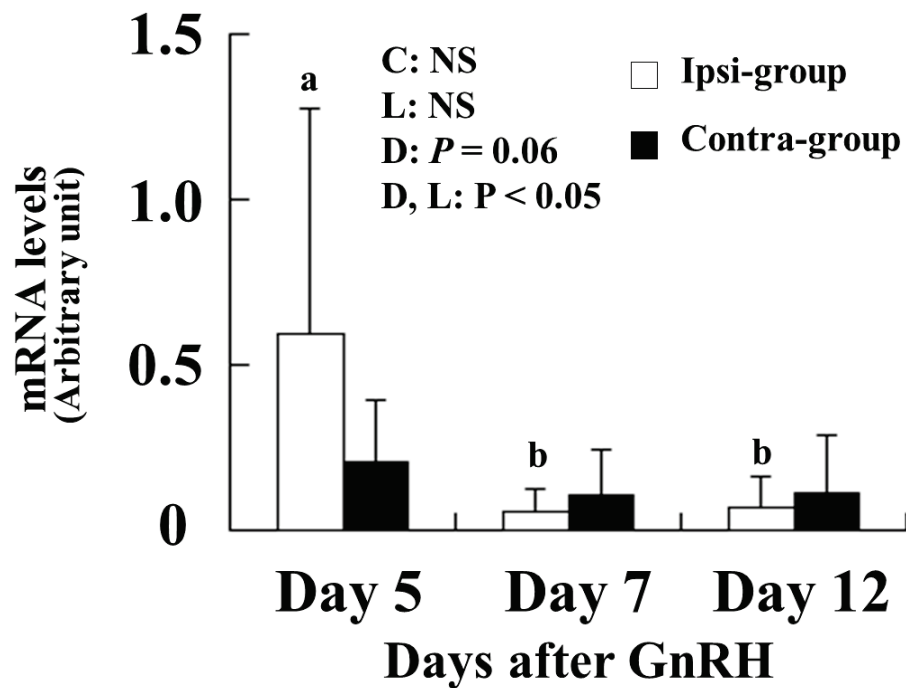


Fig. 3-7.

Comparative changes of the relative amounts of mRNA of PGR from Day 5 to Day 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Main effect of day (D) tended to be significant, and the D by locational relationship of uterine horn to the CL (L) interaction was significant. Significant differences at $P < 0.05$ are indicated by the symbol ab. C; Effect of coexistence CL with DF, Ipsi-group; ipsilateral horn to the CL, n=12. Contra-group; contralateral horn to the CL, n=12. Values are mean \pm SD.

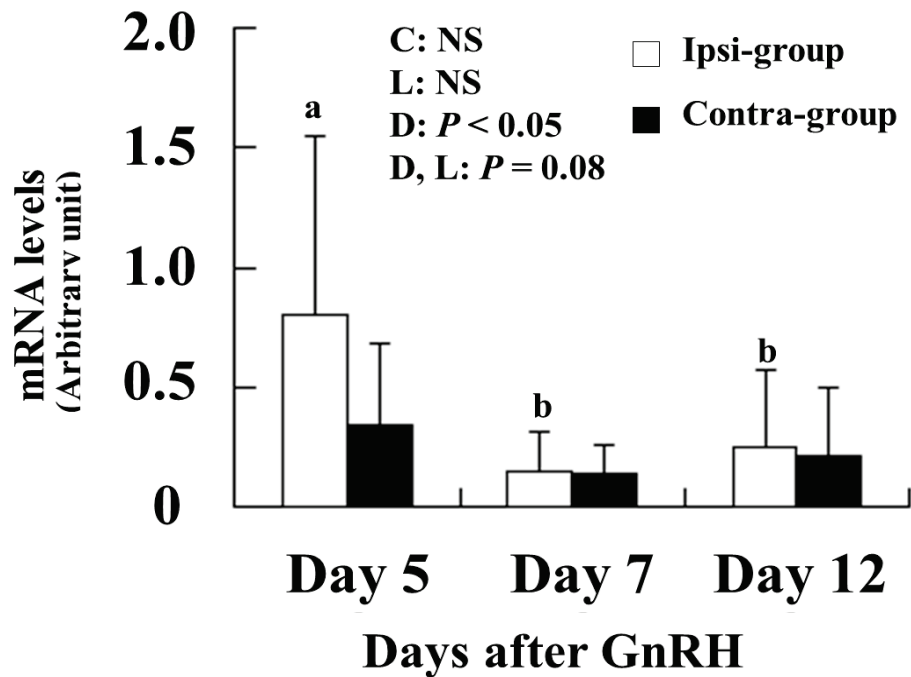


Fig. 3-8.

Comparative changes of the relative amounts of mRNA of PGRMC1 from Day 5 to Day 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Main effect of day (D) was significant, and the D by locational relationship of uterine horn to the CL (L) interaction was marginally significant ($P < 0.1$). Significant differences at $P < 0.05$ are indicated by the symbol ab. C; Effect of coexistence CL with DF. Ipsi-group; ipsilateral horn to the CL, n=12. Contra-group; contralateral horn to the CL, n=12. Values are mean \pm SD.

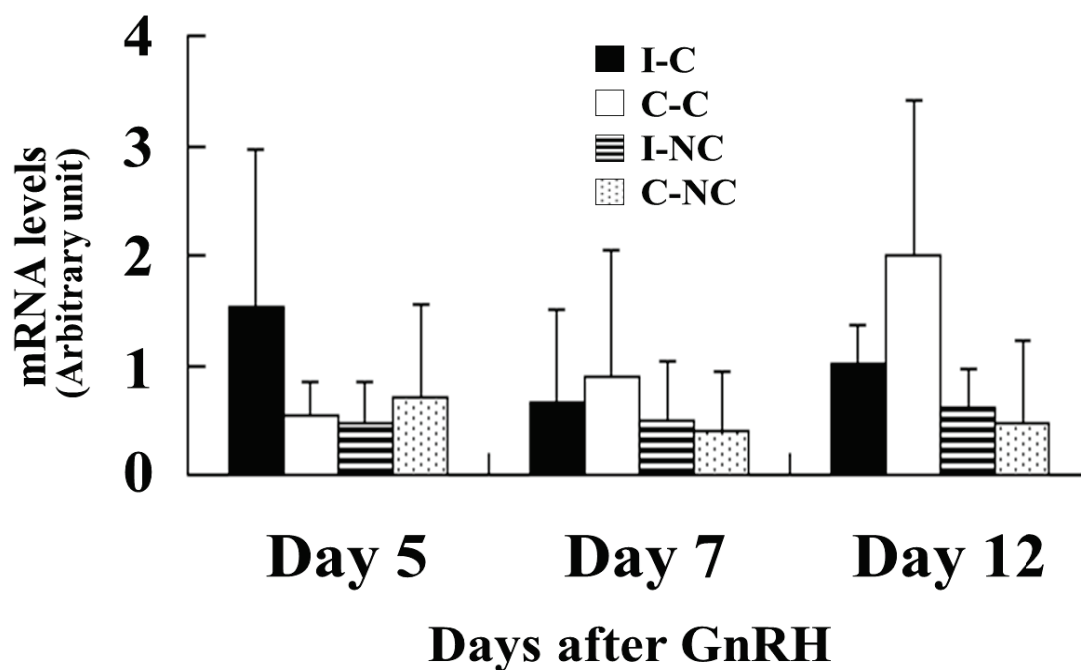


Fig. 3-9.

Comparative changes of the the relative amounts of mRNA of PGRMC2 from Day 5 to Day 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Both main effects (coexistence, location and day) and the main effects of interactions were not significant. Coexistence; coexistence of CL with DF. Location; locational relationship of uterine horn to the CL. I-C; Ipsilateral horn and coexistence CL-DF group; n=6, C-C; Contralateral horn and coexistence CL-DF group; n=6, I-NC; Ipsilateral horn and non-coexistence CL-DF group; n=6, C-NC; Contralateral horn and non-coexistence CL-DF group; n=6. Values are mean \pm SD.

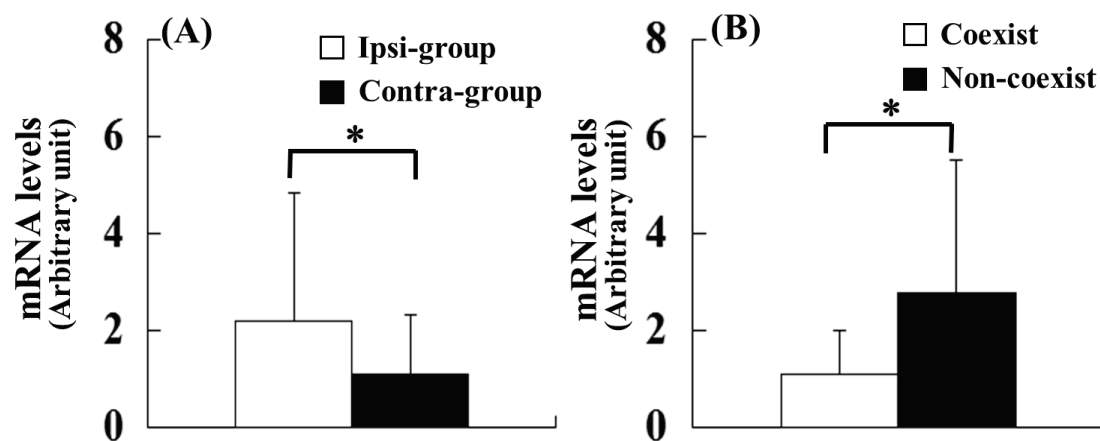


Fig. 3-10.

Comparative changes of the the relative amounts of mRNA of ANPEP in Ipsi-group and Contra-group (A), Coexist and Non-coexist groups (B) from day 5 to day 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Data were combined by locational relationship of uterine horn to the CL (A) by coexistence of CL with CL (B). Both main effects of coexistence of CL with DF (C) and locational relationship of uterine horn to the CL (L) were significant, and the main effects of interactions were not significant. The asterisk denotes differences, *: $P < 0.05$. Ipsi-group; Ipsilateral horn to the CL group; $n=36$, Contra-group; Contralateral horn to the CL group; $n=36$. Coexist; Both right and left horns from coexistent group; $n=36$, Non-coexist; Both right and left horns from non-coexistent group; $n=36$. Structures on the ovaries of coexistent and non-coexistent group are shown in Table 3-2. Values are mean \pm SD.

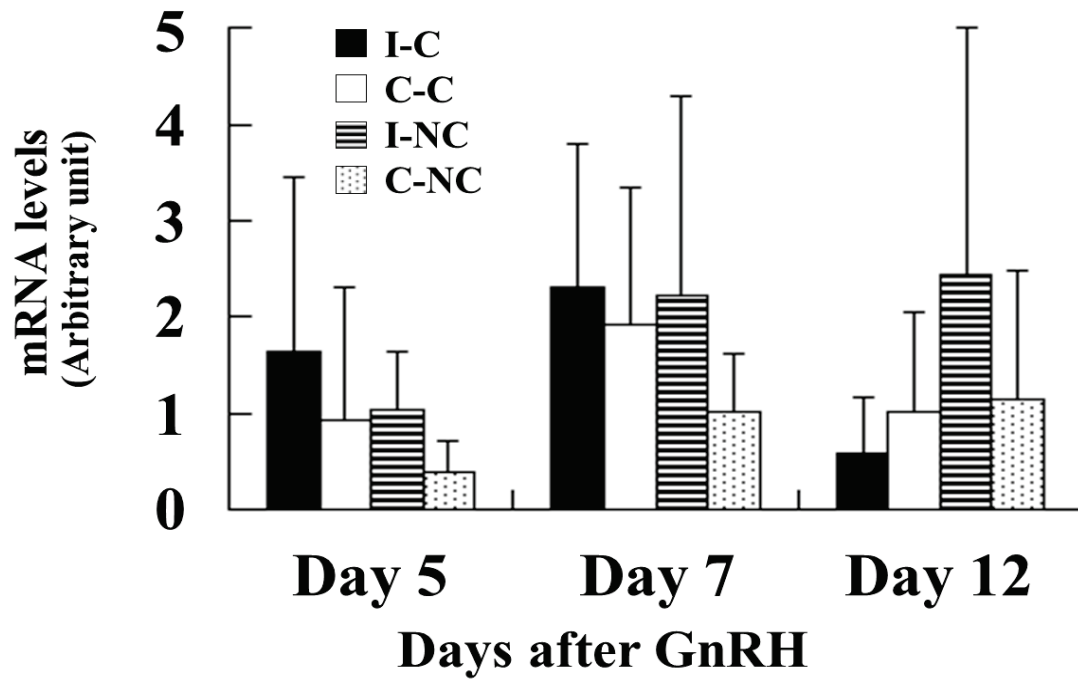


Fig. 3-11.

Comparative changes of the the relative amounts of mRNA of LPL in I-C, C-C, I-NC, C-NC from Day 5 to Day 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Both main effects (coexistence, location and day) and the main effects of interactions were not significant. C; Effect of coexistence of CL with DF, L; Effect of ipsilateral horn to the CL. IC; Ipsilateral horn and coexistence CL-DF group; n=6, CC; Contralateral horn and coexistence CL-DF group; n=6, INC; Ipsilateral horn and non-coexistence CL-DF group; n=6, CNC; Contralateral horn and non-coexistence CL-DF group; n=6. Values are mean \pm SD.

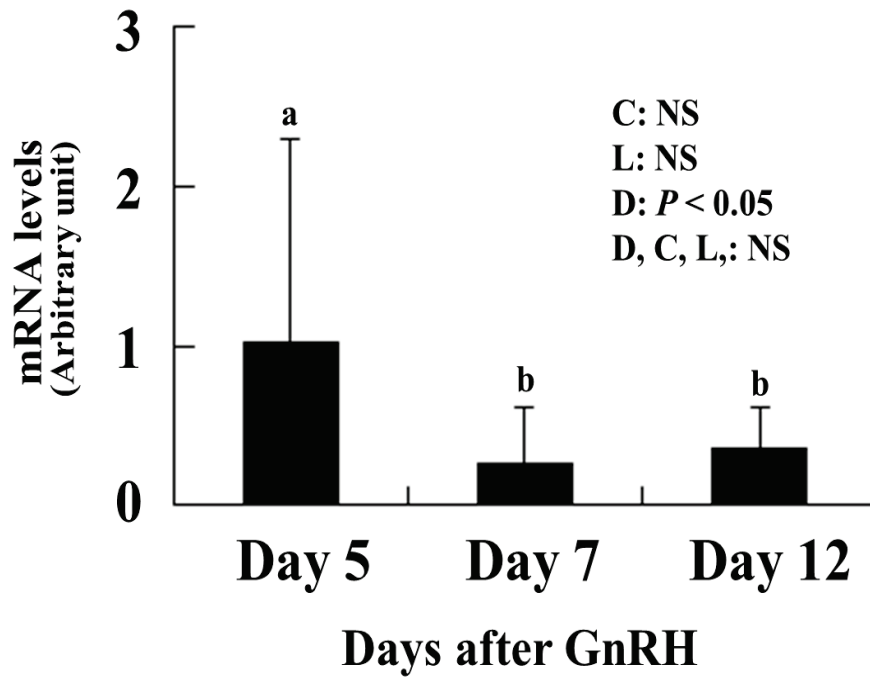


Fig. 3-12.

Comparative changes of the the relative amounts of mRNA of ESR1 from Day 5 to Day 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Since the effect of locational relationship of uterine horn to the CL (L), coexistence of CL with DF (C) were not observed, data of ipsilateral and contralateral horn to the CL were combined (n=12). Significant differences at $P < 0.05$ within the respective day are indicated by the symbol ab. Values are mean \pm SD.

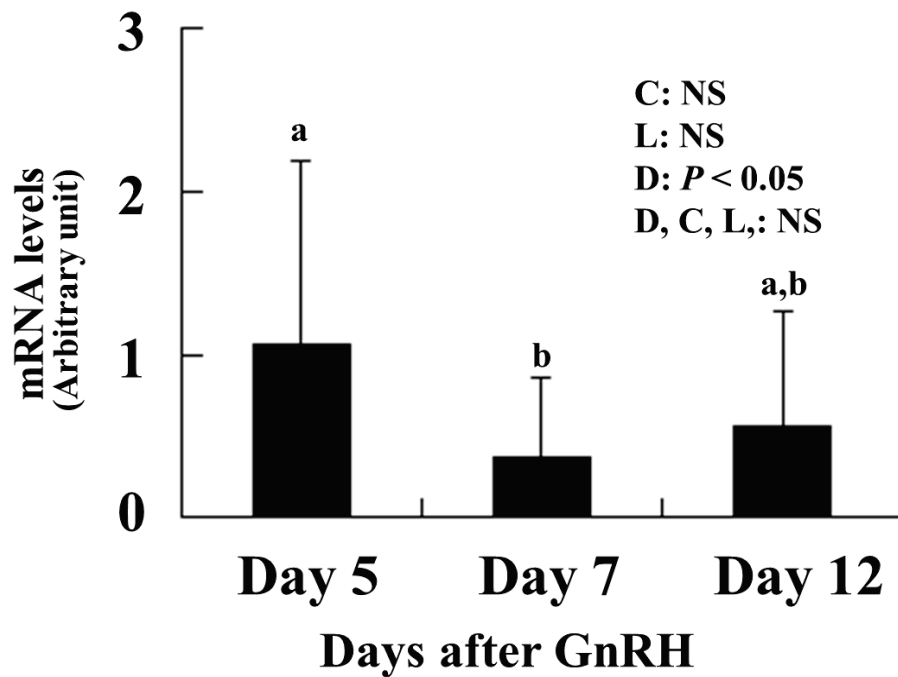


Fig. 3-13.

Comparative changes of the the relative amounts of mRNA of OXR from Day 5 to Day 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Since the effect of locational relationship of uterine horn to the CL (L), coexistence of CL with DF (C) were not observed, data of ipsilateral and contralateral horn to the CL were combined (n=12). Significant differences at $P < 0.05$ within the respective day are indicated by the symbol ab. Values are mean \pm SD.

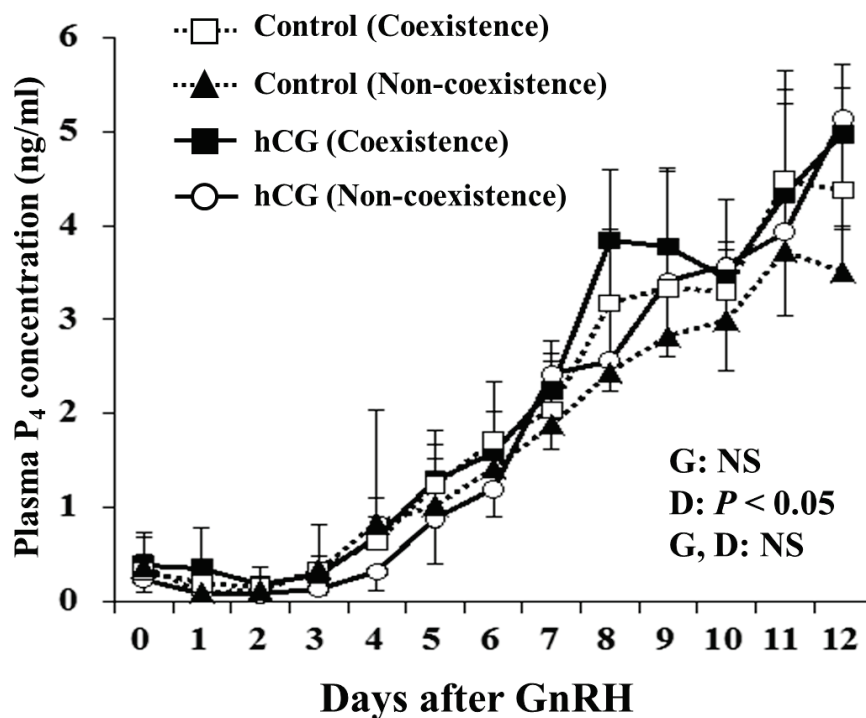


Fig. 3-14

Comparative changes of plasma P₄ concentration in hCG group and Control group from Day 0 to 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Main effect of day (D) was significant, and the group (G) by day interaction were not significant. hCG (Coexistence CL-DF); hCG treatment and coexistence CL-DF group: hCG treatment at Day 5 to induce DF and form accessory CL, n=3. hCG (Non-coexistence); hCG treatment and non-coexistence CL-DF group: hCG treatment at Day 5 to induce DF and form accessory CL, n=3. Control (Coexistence CL-DF); No treatment with hCG and coexistence CL-DF group, n=6. Control (Non-coexistence); No treatment with hCG and non-coexistence CL-DF group, n=6. Values are mean \pm SD of each point.

Table 3-4.

Diameter of corpus luteum, accessory corpus luteum and P₄ concentration on Day 12

Group	Diameter of corpus luteum (mm)			Plasma P ₄ conc. (ng/ml)
	CL	AcCL	CL+AcCL	
Control	25.6 ± 2.6	None	25.6 ± 2.6	4.0 ± 0.9
hCG	23.5 ± 2.6	16.6 ± 3.2	40.1 ± 1.7	5.1 ± 0.9
<i>P</i> -value	NS		<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05

Control = No treatment of hCG.

hCG = hCG treatment at Day 5 to induce DF and form accessory CL (AcCL)

Day 0 = day of GnRH treatment.

Day 1 = day of ovulation.

Values are mean ± SD.

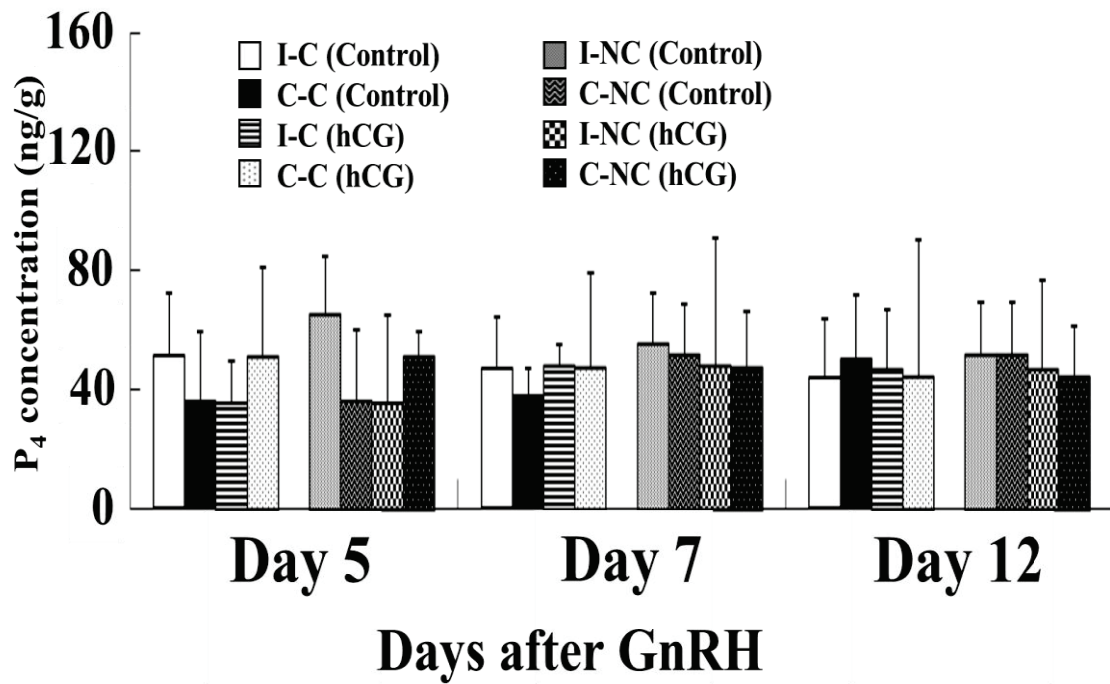


Fig. 3-15.

Comparative changes of endometrial tissue P₄ concentration in hCG group and Control group of IC, CC, INC, CNC from Day 5 to 12. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. Both main effects (hCG treatment, location, coexistence, and day) and interactions among four factors were not significant. hCG; hCG treatment group: hCG treatment at Day 5 to induce DF and form accessory CL. Control; Control group: No treatment of hCG. I-C; Ipsilateral horn and coexistence CL-DF group, C-C; Contralateral horn and coexistence CL-DF group, I-NC; Ipsilateral horn and non-coexistence CL-DF group, C-NC; Contralateral horn and non-coexistence CL-DF group. Values are mean \pm SD.

Table 3-5. Plasma E₂ concentration of hCG group on Day 5 and Day 7

Group	E₂ (pg/ml)		P-value
	Day 5	Day 7	
Control	2.6 ± 0.9	3.5 ± 1.2	P=0.08
hCG	3.3 ± 1.4	3.7 ± 1.7	NS

Values are presented as the mean ± SD.

Control = No treatment of hCG.

hCG = hCG treatment at Day 5 to induce DF
and form accessory CL

Day 0 = day of GnRH treatment.

Day 1 = day of ovulation.

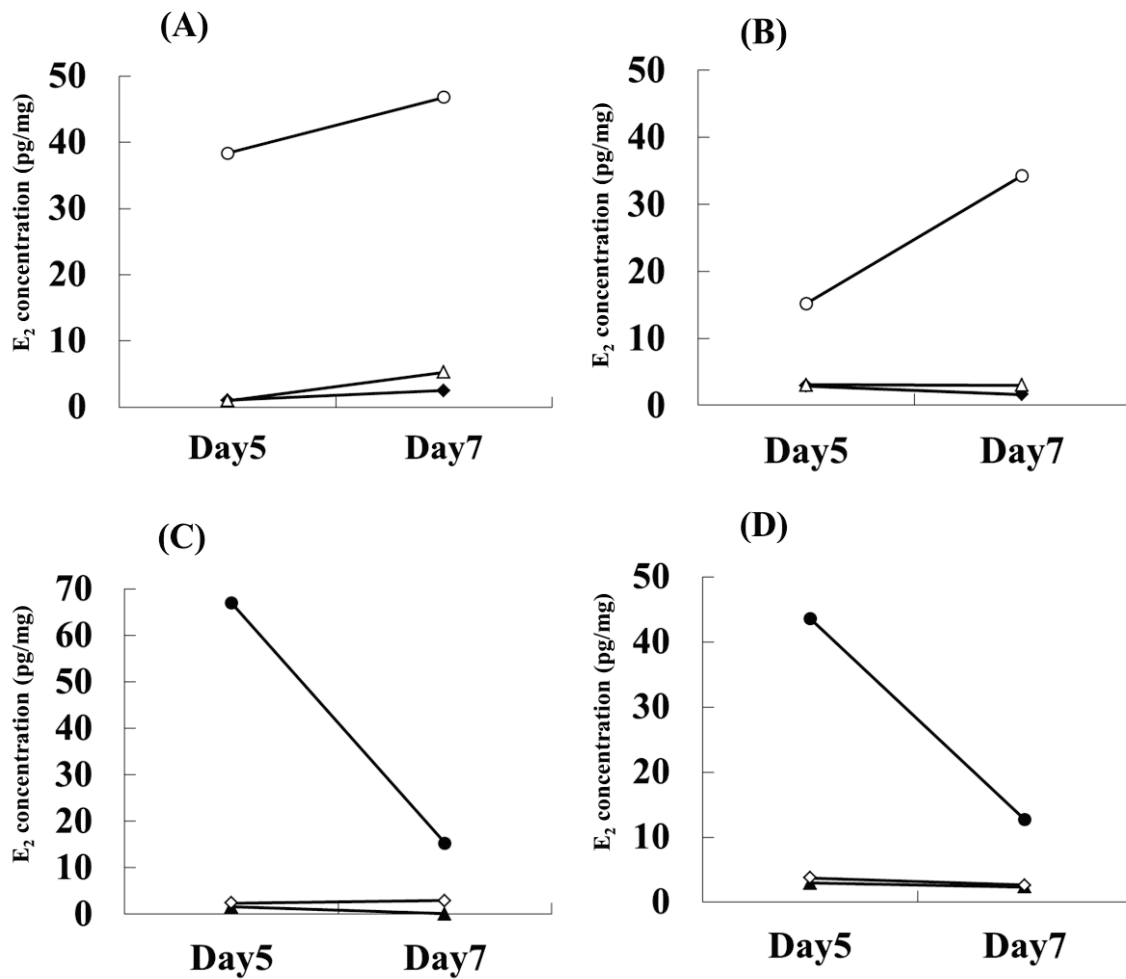


Fig. 3-16.

Comparative changes of endometrial tissue E₂ concentration of I-C (A), C-C (B), I-NC (C), C-NC (D) in hCG group from Day 5 to 7. Day 0 was the day of GnRH treatment. Day 1 was the day of ovulation confirmed. (A) and (B) showed the data of coexistence group (n=3); three plots (open circle; ○, open triangle; △, closed diamond; ◆) showed each of the individual. (C) and (D) showed the data of non-coexistence group (n=3); three plots (closed circle; ●, closed triangle; ▲, open diamond; ◇) showed each of the individual. Both main effects (coexistence, location and day) and the main effects of interactions were not significant. I-C; Ipsilateral horn to the CL and coexistence CL-DF group. C-C; Contralateral horn to the CL and coexistence CL-DF group. I-NC; Ipsilateral horn to the CL and non-coexistence CL-DF group. C-NC; Contralateral horn to the CL and non-coexistence CL-DF group.

Table 3-6. Changes of increase PGR mRNA expression

Groups	Change of increase (%)*			
	From Day 5 to Day 7		From Day 5 to Day 12	
	Control (n)	hCG (n)	Control (n)	hCG (n)
I-C	5.8 ± 3.9 (6)	115.9 ± 123.4 (3)	4.2 ± 1.7(6)	36.5 ± 40.9(3)
C-C	153.9 ± 205.7(6)	142.5 ± 222.3(3)	468.9 ± 828.0(6)	37.7 ± 28.5(3)
I-NC	65.6 ± 95.6 (6)	24.2 ± 21.9 (3)	107.1 ± 43.7(6)	38.7 ± 8.8(3)
C-NC	50.0 ± 63.0(6)	444.9 ± 322.5(3)	34.8 ± 40.6(6)	632.2 ± 990.2(3)

I-C = Ipsilateral horn to the CL and coexistence CL-DF group.

C-C = Contralateral to the CL and coexistence CL-DF group.

I-NC = Ipsilateral horn to the CL and non-coexistence CL-DF group.

C-NC = Contralateral horn to the CL and non-co-existence CL-DF group.

Day 0 = day of GnRH treatment.

Day 1 = day of ovulation.

Values are mean ± SD.

*: The ratio of values at Day 7 or Day 12 to value at Day 5.

Table 3-7. Changes of increase PGRMC1 mRNA expression

Groups	Change of increase (%)*			
	From Day 5 to Day 7		From Day 5 to Day 12	
	Control (n)	hCG (n)	Control (n)	hCG (n)
I-C	24.9 ± 34.0(6)	131.1 ± 86.7 (3)	78.1 ± 91.6(6)	143.3 ± 210.7(3)
C-C	295.8 ± 613.6(6)	260.1 ± 412.9(3)	329.9 ± 339.7(6)	831.8 ± 1278.3(3)
I-NC	78.7 ± 145.2(6)	42.6 ± 40.1 (3)	44.3 ± 41.6 (6)	141.3 ± 110.3(3)
C-NC	75.3 ± 44.1 (6)	329.1 ± 405.5(3)	33.2 ± 41.2 (6)	116.8 ± 69.3(3)

I-C = Ipsilateral horn to the CL and coexistence CL-DF group.

C-C = Contralateral to the CL and coexistence CL-DF group.

I-NC = Ipsilateral horn to the CL and non-coexistence CL-DF group.

C-NC = Contralateral horn to the CL and non-co-existence CL-DF group.

Day 0 = day of GnRH treatment.

Day 1 = day of ovulation.

Values are mean ± SD.

*: The ratio of values at Day 7 or Day 12 to value at Day 5.

Table 3-8. Changes of increase PGRMC2 mRNA expression

Groups	Change of increase (%) [*]			
	From Day 5 to Day 7		From Day 5 to Day 12	
	Control (n)	hCG (n)	Control (n)	hCG (n)
I-C	268.7 ± 344.8(6)	95.7 ± 145.1(3)	121.1 ± 121.8(6)	37.1 ± 33.0 (3)
C-C	295.8 ± 613.6(6)	260.1 ± 412.9(3)	380.6 ± 156.3(6)	219.4 ± 231.4(3)
I-NC	120.7 ± 91.6(6)	68.3 ± 15.3(3)	153.9 ± 60.3(6)	607.5 ± 827.6 (3)
C-NC	75.9 ± 109.0(6)	1015.7 ± 994.8(3)	115.9 ± 47.3(6)	2103.5 ± 1789.8(3)

I-C = Ipsilateral horn to the CL and coexistence CL-DF group.

C-C = Contralateral to the CL and coexistence CL-DF group.

I-NC = Ipsilateral horn to the CL and non-coexistence CL-DF group.

C-NC = Contralateral horn to the CL and non-co-existence CL-DF group.

Day 0 = day of GnRH treatment.

Day 1 = day of ovulation.

Values are mean ± SD.

*: The ratio of values at Day 7 or Day 12 to value at Day 5.

Table 3-9. Changes of increase ESR1 mRNA expression

Groups	Change of increase (%) [*]			
	From Day 5 to Day 7		From Day 5 to Day 12	
	Control (n)	hCG (n)	Control (n)	hCG (n)
I-C	19.4 ± 9.3 (6)	17.5 ± 2.1(3)	30.1 ± 26.2(6)	21.5 ± 10.1(3)
C-C	167.0 ± 226.0(6)	83.5 ± 112.8(3)	165.3 ± 197.4(6)	132.3 ± 144.5(3)
I-NC	39.0 ± 53.0 (6)	47.2 ± 26.8(3)	70.5 ± 67.3 (6)	99.1 ± 49.7(3)
C-NC	29.6 ± 37.2 (6)	104.3 ± 80.1 (3)	49.6 ± 28.4(6)	75.1 ± 88.5(3)

Values are presented as the mean ± SD.

I-C = Ipsilateral horn to the corpus luteum (CL) and coexistence CL-DF group.

C-C = Contralateral to the CL and coexistence CL-DF group.

I-NC = Ipsilateral horn to the CL and non-coexistence CL-DF group.

C-NC = Contralateral horn to the CL and non-co-existence CL-DF group.

Day 0 = day of GnRH treatment.

Day 1 = day of ovulation.

* : The ratio of values at Day 7 or Day 12 to value at Day 5.

第 4 章

総合考察

受胎率の低下が問題となって久しいウシの畜産現場において、繁殖効率の改善のためには、ウシの繁殖生理のさらなる解明が必要である。そこで、ウシの繁殖生理を明らかにするために、本研究では妊娠成立の場である黄体期の子宮内環境に着目した。黄体期における胚発育および妊娠成立を促すための子宮内環境を明らかにする目的で、ステロイドホルモンやその受容体についてこれまで多くの研究が行われてきたが、黄体および第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内環境に与える影響については、いまだ解明に至っていない。本研究では、黄体や第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内環境に与える影響を明らかにするために、子宮角の部位や黄体と第 1 卵胞波主席卵胞との位置を考慮し、子宮への黄体や卵胞の局所的作用について調べた。

第 2 章では、黄体が子宮内環境へ与える局所的作用について明らかにするために、と畜場由来の子宮を用いて黄体と同側角および反対側角の先端部と中腹部について比較を行った。子宮の先端部において、子宮内膜 P_4 濃度は黄体期中を通じて同側角で高くなった。PGR 遺伝子発現は同側角と反対側角で差はなく先端部において黄体期初期に高かった。PGRMC1 遺伝子発現は黄体期初期に高く、中期および後期に低く推移した。また、反対側角において子宮内膜 P_4 濃度は黄体期を通じて変化せず、 P_4 受容体も低く推移した。一方、同側角および反対側角の中腹部における子宮内膜 P_4 濃度と P_4 受容体は低く推移した。黄体期初期において、反対側角と比較して同側角の先端部で、子宮内膜 P_4 濃度と P_4 受容体の発現が高くなっている状態が同側角の受胎性の高い子宮内環境を作り出していると考えられた。受精が成立した場合、胚は卵管から子宮角へ下降することが知られている。この過程において胚が子宮角先端部を通過することを考慮すると、胚が卵管から子宮に下降する時期において子宮角先端部の環境が胚の発育に重要な役割を担っていることが推測される。実際に、胚移植を行う場合、黄体が存在する側の子宮角は存在しない側の子宮角と比較して受胎率が高く、子宮角中腹部と比較して子宮角先端部に移植すると受胎率が高いことが知られている。本研究結果

から、黄体期初期における同側角先端部の子宮内環境に黄体から分泌される P_4 の局所作用が影響を及ぼしていることが考えられた。

第 3 章では、泌乳牛を用いて黄体と第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内膜に与える局所的な作用について調査した。対照群では 12 頭の泌乳牛を用いた。まず、排卵後 5 日目から 12 日目までの血中と子宮内膜の P_4 および E_2 濃度の推移を調べた。次に卵巣内の黄体と第 1 卵胞波主席卵胞が子宮内膜に及ぼす局所的な影響を明らかにするために、主席卵胞と黄体が同一卵巣内で発育する共存群と反対側の卵巣で発育する非共存群の 2 つに分け、それぞれの群で血中と子宮内膜の P_4 および E_2 濃度を比較した。その結果、血中 P_4 濃度は Day5 から Day12 にかけて上昇するが、子宮内膜 P_4 濃度は Day5 の時点で同側角において高いことが示された。このことから、黄体期における血中 P_4 濃度の推移は子宮内膜 P_4 濃度の推移と異なることが明らかとなった。黄体期初期において、同側角の子宮内膜の P_4 受容体発現が高いこと、卵巣静脈血中の高濃度の P_4 が卵巣動脈、および子宮動脈枝へ流入すること、また発情期前後にこの経路の血流が増加することが同側角の高い子宮内膜 P_4 濃度をもたらしたと推測された。また、血中 P_4 濃度は非共存群と比較して共存群で高く、子宮内膜 P_4 濃度は共存群と比較して非共存群で高かったことから、黄体と卵胞の位置関係が血中 P_4 濃度と子宮内膜 P_4 濃度に及ぼす影響は、共存群と非共存群で異なる可能性が示された。血中 P_4 濃度が共存群で高く、子宮内膜 P_4 濃度が非共存群で高くなった要因として、共存群と非共存群との卵巣への血流量の違いが考えられた。本研究における共存群では黄体と主席卵胞を有する卵巣への血流が高く、それに伴い卵巣静脈の血流量も増加することで、黄体から分泌される P_4 の全身循環への配分が高まり、その結果、非共存群に比べ、共存群の血中 P_4 濃度が高かった可能性が考えられた。

同側角において P_4 受容体発現が高く、子宮乳関連因子の発現も同様に高かった。このことから、反対側角と比較して受胎性の高い同側角では、黄体からの P_4 の局所的作

用によって胚発育のための子宮乳の分泌促進，あるいは，子宮乳の成分が変化し，胚発育に適した子宮内環境がつくられていると考えられた。共存群は，非共存群より，人工授精後の受胎率が低いことが報告されている。共存群において ANPEP 遺伝子発現が低値であることから，共存群の同側角では子宮乳の分泌能が低下している可能性が考えられる。

血中 E_2 濃度は Day5 から Day7 にかけて上昇したが，共存群と非共存群では有意差は認められなかった。一方，子宮内膜 E_2 濃度は経時的な影響を受けず，黄体と卵胞の位置関係や卵胞と子宮角の位置関係にも影響を受けなかった。これらのことから，子宮内膜 E_2 濃度は第 1 卵胞波主席卵胞の局所作用の影響を受けず、卵胞から子宮内膜への局所作用は子宮内環境に影響を与えないと考えられた。このことから，共存群と非共存群において受胎性が異なる要因は卵胞の局所的な作用以外に存在すると考えられた。卵胞の卵管への局所的な作用により，卵管の胚輸送能や分泌能に影響を及ぼす可能性もあり，子宮内での胚の生存能に関わる因子や卵管の機能についてさらなる調査が必要であると考えた。

E_2 受容体およびオキシトシン受容体は P_4 により下方制御され， E_2 により上方制御されると考えられている。子宮内膜 P_4 濃度が反対側角よりも同側角で高いことから，同側角で E_2 受容体とオキシトシン受容体遺伝子発現は低くなると予想したが，同側角と反対側角で差は認められなかった。同側角では，黄体の形成前に排卵する卵胞が存在する。この排卵卵胞からの E_2 が同側角へ局所作用を与え，排卵後に E_2 受容体とオキシトシン受容体を上方制御し，黄体の局所作用によって下方制御することで，同側角と反対側角に差が無くなった可能性が考えられる。このことから， E_2 受容体とオキシトシン受容体に対する第 1 卵胞波主席卵胞の局所作用は排卵卵胞よりも少ないと推測した。

第 1 卵胞波主席卵胞と黄体との位置関係による受胎性への影響を明らかにするため

に, hCG 投与により第 1 卵胞波主席卵胞を排卵させ, 子宮内膜への影響を調べた。hCG はウシにおいて LH 作用を有し, 半減期が長いことが知られており, 黄体の P₄ 分泌能の強化や主席卵胞の排卵を誘起する薬剤として用いられている。過去の報告から, hCG 投与後に血中 P₄ 濃度が上昇することが示されており, 誘起黄体形成が血中 P₄ に相加的な作用を有すると考えられている。これらのことから, 誘起黄体にも子宮への局所的作用があると推測される。hCG 投与群では, 泌乳牛 6 頭を用いて, 排卵確認日を Day1 とし, Day5 に第 1 卵胞波主席卵胞を確認した後, hCG 投与を行い, Day5, Day7 および Day12 に黄体の直径の推移, 血中 P₄ 濃度と子宮内膜 P₄ 濃度の測定を行い, 共存群と非共存群間で比較した。hCG 投与群は対照群と比較して血中 P₄ 濃度が day12 に高値であったが, 共存群と非共存群分けて比較した場合に有意差は認められず, 同側角と反対側角の子宮内膜 P₄ 濃度にも差異がなかった。本研究結果から, hCG による誘起黄体形成は血中 P₄ の上昇に寄与したが, 子宮内環境に対しては局所作用をおよぼさないことが示された。また, hCG 投与による第 1 卵胞波主席卵胞の排卵後に血中および子宮内膜 E₂ 濃度は減少しなかった。これは, hCG の LH 作用により, 排卵する第 1 卵胞波主席卵胞以外の次席卵胞が刺激され, E₂ 分泌能が亢進したことによるものと考えられ, 排卵後 5 日目の hCG 投与によって血中と子宮内膜 E₂ 濃度は減少しないことが明らかになった。

第 2 章および第 3 章の研究から, 黄体と同側角と反対側角における子宮内膜組織中のステロイドホルモンとその受容体の発現を比較した結果, 黄体期初期において同側角では高い P₄ 濃度と P₄ 受容体の発現が存在し, その作用が子宮乳の分泌に関与することで胚の発育に適した子宮内環境を制御していると推察された。一方, 子宮内膜 E₂ 濃度やその受容体について同側角と反対側角とを比較した結果, 第 1 卵胞波主席卵胞は子宮内環境に影響を及ぼさない可能性が示唆された。さらに, オキシトシン受容体は E₂ 受容体と同様に, 黄体期初期における子宮内環境に影響を与えない可能性が示唆

された。

本研究から、排卵後に発育する黄体と卵胞が子宮内環境に与える役割について、同側角と反対側角との子宮内環境の違いをもたらす要因として、第 1 卵胞波主席卵胞の影響は小さく、黄体からの局所的作用が強く影響していると考えられた。また、その黄体の局所的作用は、子宮角先端部に強く働いており、妊娠初期の胚発育に関与していることが考えられた。

以上より、排卵後の子宮内環境を制御する要因としての、黄体と卵胞の役割に関する新たな知見が得られた。

謝辞

本研究を行うにあたり，終始ご指導ご鞭撻を頂きました帯広畜産大学畜産学科 臨床獣医学研究部門 松井基純教授，羽田真悟助教に心から深謝いたします。また、本稿を御校閲頂きました帯広畜産大学 宮原和郎教授，南保泰雄教授，岩手大学 高橋透教授，東京農工大学 田中知己准教授，岐阜大学 村瀬哲磨教授に深謝いたします。また、本研究遂行に当たり，ご協力，ご助言頂きました，帯広畜産大学 茅野光範講師に深謝致します。

また，実験にご協力していただいた獣医臨床繁殖学研究室の大学院生，学部学生の皆様に感謝致します。

そして，私を大学院に進学するチャンスを与えて頂いた，両親に感謝致します。

最後に，常に励まして，研究生活を支えていただいた妻に対し，心より感謝致します。

参考文献

1. 青柳敬人, 岩住安晃, 和地秀一, 権五鏡, 高橋芳幸, 金川弘司, 宮本明夫, 梅津元昭, 正木淳二. (1987). ウシの過剰排卵処置における PMSG と FSH の比較, とくに血しょうステロイドホルモンの動態とはい回収成績について: とくに血漿ステロイドホルモンの動態と胚回収成績について. 家畜繁殖学雑誌 33, 167-172.
2. Ashley, R. L., Arreguin-Arevalo, J. A. and Nett, T. M. (2009). Binding characteristics of the ovine membrane progesterone receptor alpha and expression of the receptor during the estrous cycle. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 42.
3. Badinga, L., Driancourt, M. A., Savio, J. D., Wolfenson, D., Drost, M., De La Sota, R. L. and Thatcher, W. W. (1992). Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 47, 871-883.
4. Beal, W. E., Hinshaw, R. H. and Whitman, S. S. (1998). Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer. *Theriogenology* 49, 241. (Abstr.)
5. Berg, D. K., van. Leeuwen, J., Beaumont, S., Berg, M. and Pfeffer, P. L. (2010). Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology* 73, 250-260.
6. Bridges G. A., Mussard, M. L., Pate, J. L., Ott, T. L., Hansen, T. R. and Day, M. L. (2012). Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Anim. Reprod. Sci.* 133, 16-26.
7. Bridges, G. A., Day, M. L., Geary, T. W. and Cruppe, L. H. (2013). Triennial

- Reproduction Symposium: deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J. Anim. Sci.* 91, 3002-3013.
8. Boonyaratanakornkit, V. and Edwards, D. P. (2004). Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem.* 40, 105-120.
 9. Boos, A. Meyer, W., Schwarz, R. and Grunert, E. (1996). Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Animal Reproduction Science.* 44, 11-21.
 10. Booth, W. D., Newcomb, R., Spincemille, j., Coryn, M. and Vandeplasche, M. (1978). The control of super-ovulation in the bovine with a PMSG-antiserum. *Theriogenology* 9, 529-534.
 11. Cerbito, W. A., Quero jr, F. V., Balagapo Jr, C. R., Miyazawa, K. and Sato, K. (1994). Spatial distribution of progesterone in bovine uterus in relation to corpus luteum location and function. *Theriogenology* 41, 1663–1671.
 12. Chapwanya, A., Meade, K. G., Narciandi, F., Stanley, P., Mee, J. F., Doherty, M. L., Callanan, J. J. and O'Farrelly, C. (2010). Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology* 73, 988-994.
 13. Chenault, J. R., Kratzer, D. D., Rzepkowski, R. A. and Goodwin, M. C. (1990). LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology* 34, 81-98.
 14. Chew, B. P., Erb, R. E., Fessler, J. F., Callahan, C. J. and Malven, P. V. (1979). Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens, and calving traits. *J. Dairy Sci.* 62, 557-566.

15. Clemente, M., de La. Fuente, J., Fair, T., Al. Naib, A., Gutierrez-Adan, A., Roche, J. F., Rizos, D. and Lonergan, P. (2009). Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138, 507-517.
16. Del. Campo, M. R., Del Campo, C. H. and Ginther, O. J. (1996). Vascular provisions for a local utero-ovarian cross-over pathway in new world camelids. *Theriogenology* 46, 983-991.
17. Dhindsa, D. S., Dziuk, P. J. and Norton, H. W. (1967). Time of transuterine migration and distribution of embryos in the pig. *The Anatomical Record*. 159, 325-330.
18. Diskin, M. G. and Morris, D. G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 43, Suppl 2, 260-267.
19. Divari, S., Mulasso, C., Uslenghi, F., Cannizzo, F. T., Spada, F., De. Maria, R., Brina, N. and Biolatti, B. (2011). Progesterone receptor up-regulation: a diagnostic tool for the illicit use of oestrogens in adult beef cattle. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 28, 1677-1686.
20. Dorniak, P., Bazer, F. W. and Spencer, T. E. (2013). Physiology and Endocrinology Symposium: biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *J. Anim. Sci.* 91, 1627-1638.
21. Endo, N., Nagai, K., Tanaka, T. and Kamomae, H. (2012). Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.* 134, 112-118.
22. Fernandes, M. S., Pierron, V., Michalovich, D., Astle, S., Thornton, S., Peltoketo,

- H., Lam, E. W., Gellersen, B., Huhtaniemi, I., Allen, J. and Brosens, J. J. (2005). Regulated expression of putative membrane progesterin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *J. Endocrinol.* 187, 89-101.
23. Fernandes, M. S., Brosens, J. J. and Gellersen, B. (2008). Honey, we need to talk about the membrane progesterin receptors. *Steroids* 73, 942-952.
 24. Ford, S. P. and Chenault, J. R. (1981). Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 62, 555-562.
 25. Forde, N., Spencer, T. E., Bazer, F. W., Song, G., Roche, J. F. and Lonergan, P. (2010). Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. *Physiol. Genomics.* 41, 53-62.
 26. Forde, N., Beltman, M. E., Duffy, G. B., Duffy, P., Mehta, J. P., O'Gaora, P., Roche, J. P., Lonergan, P. and Crowe, M. A. (2011). Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: Effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol. Reprod.* 84, 266–278.
 27. Gray, C. A., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Bazer, F. W. and Spencer, T. E. (2002). Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 124, 289-300.
 28. Ginther, O. J. (1983). Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* 19, 603-611
 29. Ginther, O. J. and Del. Campo, C. H. (1974). Vascular anatomy of the uterus and

- ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: cattle. *Am. J. Vet. Res.* 35, 193-203.
30. Ginther, O. J., Siddiqui, M. A., Baldrighi, J. M. and Hoffman, M. M. (2014). Effect of intraovarian proximity between dominant follicle and corpus luteum on dimensions and blood flow of each structure in heifers. *Theriogenology* 82, 875-883.
 31. Hafez E. S. E. (2000). Transport and Survival of Gametes. Hafez E. S. E. and Hafez B. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. pp. 83-95.
 32. Humblot, P. (2001). Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56, 1417-1433.
 33. Inchaisri, C., Jorritsma, R., Vos, P. L., van der Weijden, G. C. and Hogeveen, H. (2011). Analysis of the economically optimal voluntary waiting period for first insemination. *J. Dairy Sci.* 94, 3811-3823.
 34. Ivell, R., Fuchs, A. R., Bathgate, R., Tillmann, G. and T, Kimura. (2000). Regulation of the Oxytocin Receptor in Bovine Reproductive Tissues and the Role of Steroids. *Reprod. Dom. Anim.* 35, 134-141.
 35. Jeltsch, J. M., Krozowski, Z., Quirin-Stricker, C., Gronemeyer, H., Simpson, R. J., Garnier, J. M., Krust, A., Jacob, F. and Chambon, P. (1986). Cloning of the chicken progesterone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83, 5424-5428.
 36. Jinks, E. M., Smith, M. F., Atkins, J. A., Pohler, K. G., Perry, G. A., Macneil, M. D., Roberts, A. J., Waterman, R. C., Alexander, L. J. and Geary, T. W. (2013). Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 91, 1176-1185.

37. Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J. P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R. N., Lessey, B. A. and Giudice, L. C. (2002). Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 143, 2119-2138.
38. Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R. and Ginther, O. J. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33, 1269–1278.
39. 片桐成二(2012). 胚死滅. 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二 編 獣医繁殖学 第4版 pp. 342-343. 文永堂出版, 東京.
40. Keator, C. S., Mah, K. and Slayden, O. D. (2012). Alterations in progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) in the endometrium of macaques afflicted with advanced endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 18, 308-319.
41. Kimmins, S. and MacLaren, L. A. (2001). Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22, 742-748.
42. Kimura, I., Nakayama, Y., Konishi, M., Terasawa, K., Ohta, M., Itoh, N. and Fujimoto, M. (2012). Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as heme/steroid-binding proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 687-696.
43. Krebs, C. J., Jarvis, E. D., Chan, J., Lydon, J. P., Ogawa, S. and Pfaff, D. W. (2000). A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 12816-12821.
44. Kowalik, M. K., Slonina, D., Rekawiecki, R. and Kotwica, J. (2013). Expression

- of progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1 (SERBP1) and nuclear progesterone receptor (PGR) in the bovine endometrium during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. *Reprod. Biol.* 13, 15-23.
45. Krzymowski, T., Stefanczyk, S., Kotwica, J., Czarnocki, J., Glazer, T., Janowski, T. and Chmiel, J. (1982). 3H - oestradiol - 17 β counter current transfer from the ovarian vein into the ovarian artery in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 4, 199-206.
 46. Kummer, V., Zralý, Z., Holcák, V., Vezník, Z., Schlegelová, J. and Hruska, K. (1980). Superovulation in cattle: Effect of goat anti-PMSG serum. *Theriogenology* 14, 383-390.
 47. Lonergan, P. and Forde, N. (2014) Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal.* 8, Suppl 1, 64-69.
 48. Loosfelt, H., Atger, M., Misrahi, M., Guiochon-Mantel, A., Meriel, C., Logeat, F., Benarous, R. and Milgrom, E. (1986). Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83, 9045-9049.
 49. Luciano, A. M., Lodde, V., Franciosi, F., Ceciliani, F. and Peluso, J. J. (2010). Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Reproduction* 140, 663-672.
 50. Luciano, A. M., Corbani, D., Lodde, V., Tessaro, I., Franciosi, F., Peluso, J. J. and Modina, S. (2011). Expression of progesterone receptor membrane component-1 in bovine reproductive system during estrous cycle. *Eur. J. Histochem.* 55, e27
 51. Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery,

- C. A. Jr, Shyamala, G., Conneely, O. M. and O'Malley, B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266-2278.
52. Maestroni, G. J. and Losa, G. A. (1984). Effect of autologous serum and steroid hormone receptors on direct cloning of human breast cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108, 783-785.
 53. Mann, G. E. and Lamming, G. E. (1994). Use of repeated biopsies to monitor endometrial oxytocin receptors in the cow. *Vet. Rec.* 135, 403-405.
 54. Mann, G. E., Lamming, G. E., Robinson, R. S. and Wathes, D. C. (1999). The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 317-328.
 55. Mann, G. E. and Lamming, G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175-180.
 56. Mann, G. E., Fray, M. D. and Lamming, G. E. (2006). Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet. J.* 171, 500-503.
 57. Mann, G. E., Scholey, D. V. and Robinson, R. S. (2007). Identification of elevated concentrations of estradiol in bovine uterine endometrium. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 437-441.
 58. Misrahi, M., Atger, M., d'Auriol, L., Loosfelt, H., Meriel, C., Fridlansky, F., Guiochon-Mantel, A., Galibert, F. and Milgrom, E. (1987). Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 740-748.

59. Miura, R., Haneda, S., Lee, H. H., Miyamoto, A., Shimizu, T., Miyahara, K., Miyake, Y. and Matsui, M. (2014). Evidence that the dominant follicle of the first wave is more active than that of the second wave in terms of its growth rate, blood flow supply and steroidogenic capacity in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 145, 114-122.
60. Miura, R., Haneda, S., Kayano, M. and Matsui, M. (2015). Development of the first follicular wave dominant follicle on the ovary ipsilateral to the corpus luteum is associated with decreased conception rate in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 98, 318-321.
61. Miyamoto, A., Okuda, K., Schweigert, F. J. and Schams, D. (1992). Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *J. Endocrinol.* 135, 103-114.
62. Miyamoto, Y., Skarzynski, D. J. and Okuda, K. (2000). Is Tumor Necrosis Factor α a Trigger for the Initiation of Endometrial Prostaglandin F₂ α Release at Luteolysis in Cattle? *Biol. Reprod.* 62, 1109-1115.
63. Mullen, M. P., Bazer, F. W., Wu, G., Parr, M. H., Evans, A. C., Crowe, M. A. and Diskin, M. G. (2014). Effects of systemic progesterone during the early luteal phase on the availabilities of amino acids and glucose in the bovine uterine lumen. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 282-292.
64. Newcomb, R., Booth, W. D. and Rowson, L. E. (1977). The effect of oxytocin treatment on the levels of prostaglandin F in the blood of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 49, 17-24.
65. Nishigai, M., Takamura, A., Kamomae, H., Tanaka, T. and Kaneda Y. (2001). The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on the Development and Function of

Bovine Corpus Luteum. *J. Reprod. Dev.* 47, 283-294.

66. Okumu, L. A., Forde, N., Fahey, A. G., Fitzpatrick, E., Roche, J. F., Crowe, M. A. and Lonergan, P. (2010). The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction* 140, 143-153.
67. Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic. Acids. Res.* 29, e45.
68. Pursley, J. R., Mee, M. O. and Wiltbank, M. C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology* 44, 915-923.
69. Robinson, R. S., Mann, G. E., Lamming, G. E. and Wathes, D. C. (2001). Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 122, 965-979.
70. Rohe, H. J., Ahmed, I. S., Twist, K. E. and Craven, R. J. (2009). PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol. Ther.* 121, 14-19.
71. Sakumoto, R., Hayashi, K. G., Saito, S., Kanahara, H., Kizaki, K. and Iga, K. (2015). Comparison of the global gene expression profiles in the bovine endometrium between summer and autumn. *J. Reprod. Dev.* 61, 297-303.
72. Saint-Dizier, M., Sandra, O., Ployart, S., Chebrout, M. and Constant, F. (2012). Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cyclic and pregnant cows during the

- post-ovulation period. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10, 76.
73. Santos, J. E., Thatcher, W. W., Pool, L. and Overton, M. W. (2001). Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79, 2881-2894.
74. Santos, J. E., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L. and Galvão, K. N. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 513-535.
75. Scanlon, P. F. (1972). Frequency of transuterine migration of embryos in ewes and cows. *J. Anim. Sci.* 34, 791-794.
76. Senger, P. L. (2012). Reproductive Cyclicity – The Luteal Phase. In: *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 3rd ed. (Senger PL. ed.), Current Conceptions, Inc., Oregon.
77. Shabankareh, H. K., Zandi, M. and Ganjali, M. (2010). First service pregnancy rates following post-AI use of HCG in Ovsynch and Heatsynch programmes in lactating dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 711-716.
78. Silvia, W. J. and Taylor, M. L. (1989). Relationship between uterine secretion of prostaglandin F2 alpha induced by oxytocin and endogenous concentrations of estradiol and progesterone at three stages of the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 67, 2347-2353.
79. Stevenson, J. S., Portaluppi, M. A., Tenhouse, D. E., Lloyd, A., Eborn, D. R., Kacuba, S. and De. Jarnette, J. M. (2007). Interventions After Artificial Insemination: Conception Rates, Pregnancy Survival, and Ovarian Responses to Gonadotropin-Releasing Hormone, Human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. *J. Dairy Sci.* 90, 331–340

80. Tahir, M. Z., Reynaud, K., Grimard, B., Thoumire, S., Chastant-Maillard, S. and Saint-Dizier, M. (2013). Expression of nuclear and membrane progesterone receptors in the canine oviduct during the periovulatory period. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 1065-1076
81. Ulbrich, S. E., Wolf, E. and Bauersachs, S. (2012). Hosting the preimplantation embryo: potentials and limitations of different approaches for analysing embryo-endometrium interactions in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 62-70.
82. Vallet, J. L., Lamming, G. E. and Batten, M. (1990). Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 90, 625–634.
83. Walsh, S. W., Yutrzenka, G. J. and Davis, J. S. (1979). Local steroid concentrating mechanism in the reproductive vasculature of the ewe. *Biol. Reprod.* 20, 1167-1171.
84. Wijayagunawardane, M. P., Miyamoto, A., Cerbito, W. A., Acosta, T. J., Takagi, M. and Sato, K. (1998). Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology* 49, 607-618.
85. Zhang, L., Kanda, Y., Roberts, D. J., Ecker, J. L., Losel, R., Wehling, M., Peluso, J. J. and Pru, J. K. (2008). Expression of progesterone receptor membrane component 1 and its partner serpin 1 mRNA binding protein in uterine and placental tissues of the mouse and human. *Mol. Cell Endocrinol.* 287, 81-9.
86. Zhu, Y., Bond, J. and Thomas, P. (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 2237-2242.