

馬黄体組織のhCG、PGF₂ および血管作動性ペプチド 還流操作によるProgesteroneとPGF₂ 分泌動態

塚田 努¹⁾ 小島アンナゆみこ^{2, 4)} 森好政晴³⁾
古家後雅典³⁾ 佐藤邦忠⁴⁾ 澤向 豊³⁾

¹⁾塚田家畜診療所

²⁾Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

³⁾酪農学園大学獣医学部

⁴⁾帯広畜産大学畜産学部

Effects of perfusion of hCG, PGF₂ and vasoactive peptides into the corpus luteum of mares on progesterone and PGF₂ secretion

T. Tsukada¹⁾, A. Y. Kojima^{2, 4)}, M. Moriyoshi³⁾,
M. Koyago³⁾, K. Sato⁴⁾ and Y. Sawamukai³⁾

¹⁾Tsukada Livestock Clinic, Mitsuishi

²⁾Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

³⁾Rakuno Gakuen University

⁴⁾Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

要 約 馬黄体のPGF₂ あるいはhCG製剤投与後の反応を解明するため、形成期および開花期黄体組織にMicrodialysis System (MDS) 法を応用し、hCG、PGF₂ および血管作動性ペプチド感作後のプロジェステロン (P₄)、PGF₂ 分泌能を検討した。その結果、形成期および開花期黄体組織にhCG 10 IU、あるいは100 IUを環流してもP₄分泌は刺激されなかった。しかし、形成期黄体組織のPGF₂ 産生は対照群と比較し、有意な上昇を認めた (p < 0.05)。また、開花期黄体組織では100 IU感作群が10 IU感作群および対照群と比べ、PGF₂ 産生が有意に高かった (p < 0.05)。PGF₂ を感作すると、P₄分泌が形成期、開花期黄体組織のいずれにおいても対照群と比べ、有意な上昇を示した (p < 0.05)。血管作動性ペプチドであるAngiotensin-₁, Endothelin-₁ およびAtrial Natriuretic Peptideの還流では形成期ならびに開花期黄体組織のP₄分泌に有意差が認められなかったが、PGF₂ 分泌はいずれの組織とも対照群と比べ、有意な上昇を示した (p < 0.05)。

以上の結果から、馬の形成期、あるいは開花期黄体組織にhCG、あるいは血管作動性ペプチドを還流してもP₄分泌を刺激することはなかったが、PGF₂ 分泌には強く影響することが示唆された。

——キーワード：黄体、馬、MDS法、PGF₂、プロジェステロン

.....家畜臨床誌 31(1):6-11, 2008

Received 26 October 2007/ Accepted 14 March 2008

* Correspondence to : M. Moriyoshi, Department of Large Animal Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan. (〒069-8501 北海道江別市文京台緑町582 酪農学園大学獣医学部)
E-mail : moriyosi@rakuno.ac.jp

ABSTRACT The effect of perfusion of hCG, PGF₂, vasoactive peptides, and Ringer's solution (control) on the ovaries of mares (Percheron, Breton and crossbred) during early and functional luteal phases of the ovarian cycle was studied using an *in vitro* microdialysis system. There was no increase in P₄ secretion as a result of the perfusion of 10 IU or 100 IU of hCG during the early or functional luteal phase. But both the levels of hCG significantly increased PGF₂ release, compared to the control, during early luteal phase (p<0.05). During functional luteal phase, 100 IU hCG caused significantly higher secretion of PGF₂ than 10 IU hCG or the control (p<0.05). P₄ release was significantly higher than in the control (p<0.05) with PGF₂ perfusion in both the early and the functional luteal phases. Vasoactive peptides (angiotensin-, endothelin- and atrial natriuretic peptide) did not cause a significant difference in P₄ release during the early or the functional luteal phase. However, PGF₂ release was significantly increased compared to the control (p<0.05) in both phases. These results suggest that hCG and vasoactive peptides had a profound effect on PGF₂ release but did not stimulate P₄ secretion during the early or the functional luteal phase in equines.

—Key Words : corpus luteum, mare, microdialysis system, PGF₂, progesterone

.....Jpn. J. Vet. Clinics 31(1):6-11, 2008

緒言

馬の生産率は、牛と比べて低く [12]、繁殖季節の開始期と終了期に異常発情を示すことが一つの要因とされている [6, 17]。しかし、繁殖季節が人為的に制限されている馬では、飼い主が前年不受胎および未経産に早めの交配を希望するため、様々なホルモン剤処置法が要求されている。RossdaleとRickettsは、繁殖季節当初の性腺刺激ホルモンや性腺刺激ホルモン放出ホルモン剤に対する低反応を解明する実験の必要性を強調しており、また発育卵胞の直径を十分に考慮し、hCG投与を行っても排卵しない症例が多いことを報告している [18]。このことは、適期交配が難しく、また排卵障害治療が困難な要因にもなり、発情、LH動態と排卵との関係の詳細な研究が求められている。また、Allenは馬の妊娠初期にhCGを投与し、黄体機能活性化による早期胚の死の予防を試みた。しかし、過剰な投与量は黄体機能を低下させ、逆に早期胚の死や着床不全をもたらすことを報告している [2]。

近年、牛や羊の卵巣調節因子と卵胞や黄体の局所作用との関係について、Microdialysis System (MDS) 法を用いた数多くの研究報告がある [1, 3, 9-11, 13-15, 21, 22]。その中で、牛の黄体機能は血管作動性ペプチドと密接な関係があり、またこのペプチド作用は性ステロイドホルモンおよび卵巣血管系の変化に強く影響する [1, 3]。馬においても、卵胞あるいは黄体機能とPGF₂、血管作動性ペプチドとの強い関係が証明され、新たな卵巣調節因子の解明が進展しつつある [5, 6, 8, 11, 16]。

そこで今回、日常馬の卵巣機能異常の治療に用いられるPGF₂あるいはLH製剤の黄体組織反応を解明するため、生体に近い状況の試験方法として開発されたMDS

法を応用し、hCG、PGF₂および血管作動性ペプチドの感作とプロジェステロン (P₄)、PGF₂反応との関係を検討した。

材料と方法

1. 供試卵巣

熊本県内の食肉センターで解体処理されたブルトン種、ペルシュロン種および中半血種馬から卵巣を採取した。卵巣は、ただちにKojimaらの処理方法 [11] に従い、Penicillin 100,000 IUとStreptomycin 100 mgを加えた日本薬局方生理食塩水 (生理食塩水) 1ℓでリンスしたのち、同液パックに入れ、氷水に保存し、実験室まで搬送した。卵巣は三宅と佐藤 [12]、RossdaleとRicketts [18] の記述を参考に異常所見が認められないものを抽出した。

2. 黄体組織採取

排卵窩に排卵を示す小穴があり、超音波検査で出血体として映像化された部位の表面組織に血管拡張が認められる黄体を排卵後1～5日の形成期黄体、また排卵窩に細い糸状の凝血が見られ、ソーセージのような弾力感を示す肉柱状構造の黄体を排卵後6～10日の開花期黄体と判断した。形成期ならびに開花期黄体と判定された各5頭の卵巣から取り出した黄体は、それぞれ9個の15×5×5 mmサイズの組織片に細断し、Acosta [1]らとWijayagunawardaneら [22] が行ったMDS法に供試した (図1)。

3. hCG、PGF₂および血管作動性ペプチド還流量

形成期および開花期黄体組織に還流するhCGは10 IU/ml (hCG 10 IU群)、100 IU/ml (hCG 100 IU群)、PGF₂は10⁻⁶ M/ml (PGF₂群)とした。また、血管作

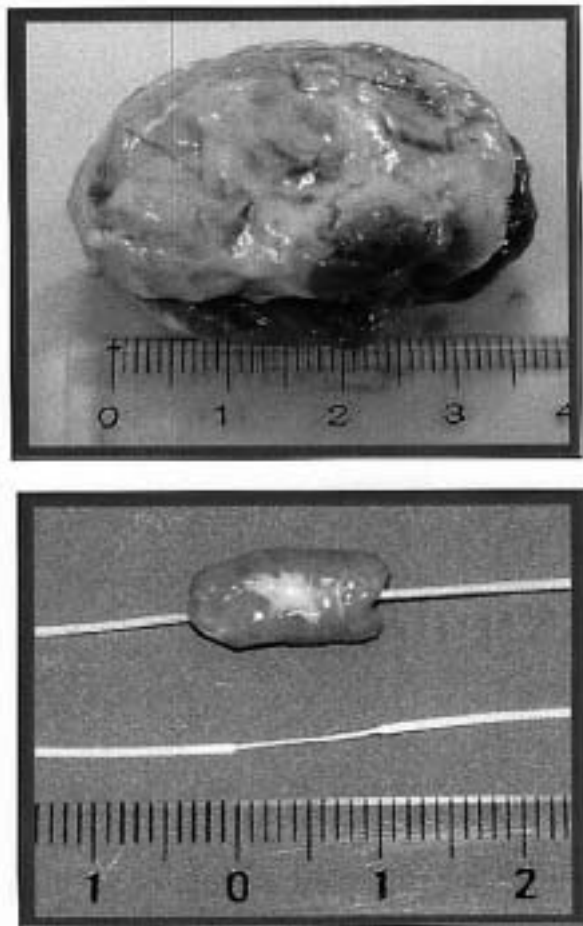


図1. Microdialysis System法に供するため、馬の卵巣から摘出した開花期黄体（上）と細断した黄体組織片（下）

動性ペプチドAngiotensin-、Endothelin- およびAtrial Natriuretic Peptideはそれぞれ 10^{-6} M/ml (Angiotensin-群)、 10^{-7} M/ml (Endothelin- 群)、 10^{-7} M/ml (Atrial Natriuretic Peptide群) とした。

4) 黄体組織環流方法

最初にリンゲル液を3 ml/hのペースで2時間注入し、組織からの遊出物質を安定させた（還流前処置）。次に、すべての組織のチューブにリンゲル液を同じ速度で4時間注入し、回収液はRIA法によるホルモン濃度の測定に供した。その後、感作ホルモン溶液および対照液注入処置を4時間3 ml/hのペースで行なった。還流液の回収は感作開始後8時間まで行ない、 P_4 および PGF_2 分泌濃度測定に供した。

5) ホルモン濃度測定

P_4 および PGF_2 の抽出、測定はAcostaら [1] と Wijayagunawardaneら [22] の方法に準拠して行なった。両ホルモン標準曲線の範囲と変動係数は以下のとおりである。 P_4 : 標準曲線は0.05 ~ 25 ng/ml、AssayのED50は2.5 ng/ml、変動係数はintra-assayが6.8%とinter-

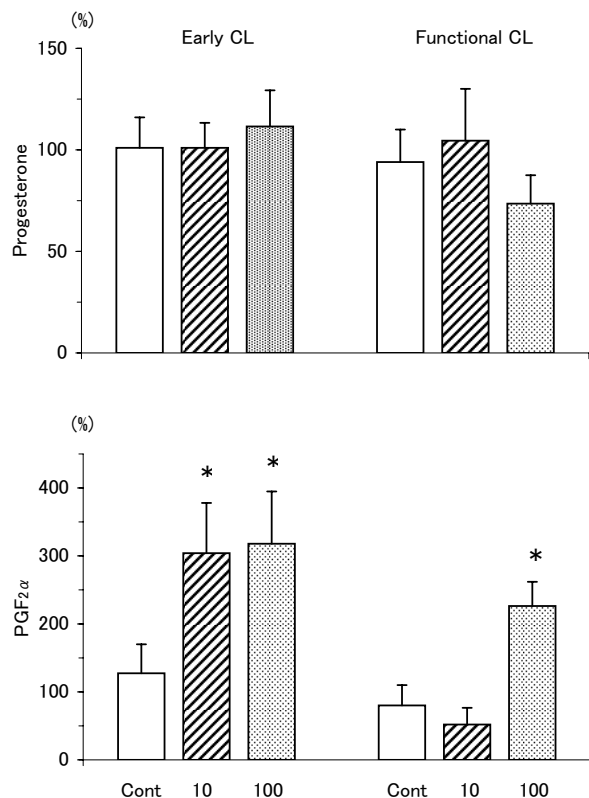


図2 形成期黄体と開花期黄体組織のhCG還流によるProgesteroneおよび PGF_2 分泌

* $p < 0.05$ vs Control

Early CL : 形成期黄体、Functional CL : 開花期黄体

Cont : 対照群、10 : hCG 10 IU還流群

100 : hCG 100 IU還流群

平均 ± 標準偏差

assayが9.5%、 PGF_2 : 標準曲線は20 ~ 20,000 pg/ml、AssayのED50は640 pg/ml、変動係数はintra-assayが9.3%とinter-assayが14.2%である。

感作濃度は、還流前処置後の4時間にわたる還流リンゲル液から回収した P_4 および PGF_2 濃度を基準とし、この数値と還流供試ホルモンおよび対照リンゲル液に感作した P_4 および PGF_2 濃度との比で示した。

6) 統計処理

hCG、 PGF_2 および血管作動性ペプチド還流操作後の回収液中の P_4 、 PGF_2 濃度はStudent's t-testにより対照群と比較した。有意差の検定は、危険率5%以下で行った。

結果

馬の形成期および開花期黄体組織にhCG、 PGF_2 および血管作動性ペプチド環流後の P_4 と PGF_2 反応は表1に示した。hCG 10 IUおよび100 IUを環流しても、 P_4 分泌に対照群と両感作群、また両感作群間で有意差が認

表1 形成期および開花期黄体組織にhCG、PGF₂ および血管作動性ペプチド還流後のP₄とPGF₂ 反応

黄体組織	検査項目	還流物					
		hCG		血管作動性ペプチド			
		10IU	100IU	PGF ₂	Ang	ET	ANP
形成期	P ₄	→	→	↗	→	→	→
	PGF ₂	↑	↑		↑	↑	↑
開花期	P ₄	→	↘	↑	→	→	→
	PGF ₂	→	↑		↑	↑	↑

↑ : 対照群と比べ、有意な増量を示す (P < 0.05)

→ : 対照群とほぼ同一水準であることを示す

↗ : 対照群と比べ、やや増量を示す

↘ : 対照群と比べ、やや少量を示す

Ang : Angiotensin-

ET : Endothelin-

ANP : Atrial Natriuretic Peptide

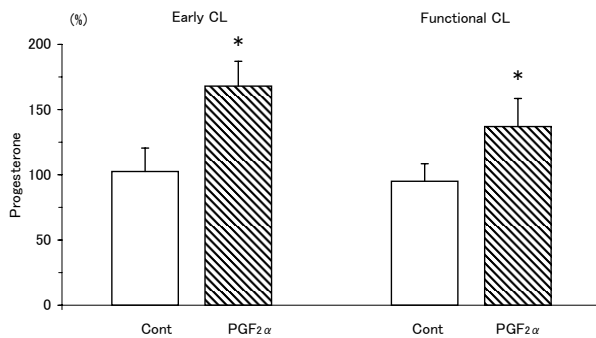


図3 形成期黄体と開花期黄体組織のPGF₂ 還流によるProgesterone分泌

*p < 0.05 vs Control

Early CL : 形成期黄体、Functional CL : 開花期黄体

Cont : 対照群

平均 ± 標準偏差

められなかった (図2)。形成期黄体組織のPGF₂ 濃度はhCG 10 IU、100 IU環流群のいずれにおいても対照群と比べ、有意な上昇を示した (p < 0.05、図2)。開花期組織では、100 IU群が10 IU群および対照群と比べ、PGF₂ 産生に有意差が認められた (p < 0.05、図2)。PGF₂ を環流すると、P₄分泌が形成期、開花期黄体組織のいずれにおいても対照群と比べ、有意な上昇を示した (p < 0.05、図3)。

いずれの血管作動性ペプチドを形成期ならびに開花期黄体組織に環流してもP₄分泌に両群間の有意差が認められなかった (図4)。PGF₂ 分泌は形成期および開花期黄体組織とも対照群と比べ、いずれの血管作動性ペプチド群も有意な上昇を示した (p < 0.05、図4)。なお、

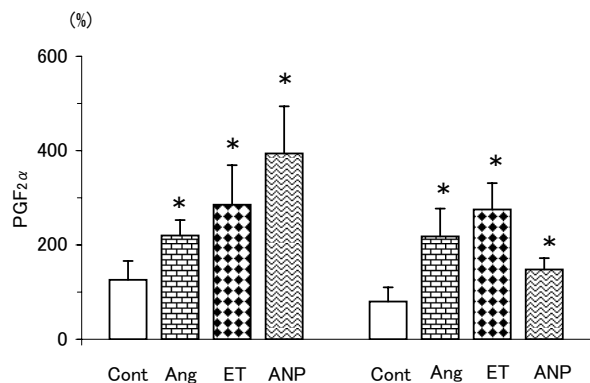
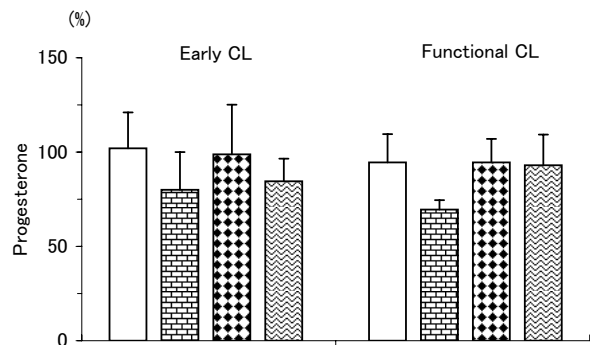


図4 形成期黄体と開花期黄体組織の血管作動性ペプチド還流によるProgesteroneおよびPGF₂ 分泌

*p < 0.05 vs Control

Early CL : 形成期黄体、Functional CL : 開花期黄体

Cont : 対照群、Ang : Angiotensin-

ET : Endothelin-、ANP : Atrial Natriuretic Peptide

平均 ± 標準偏差

形成期黄体組織ではAngiotensin-、Endothelin-、Atrial Natriuretic Peptideの順にPGF₂ 分泌量の増加を認め、開花期組織ではAtrial Natriuretic Peptide、

Angiotensin- およびEndothelin- 群の順に増加した。

考 察

臨床分野では、馬の卵巢機能異常の治療にhCGやPGF₂ 製剤が使用されていながら、その効果は疑問視されている。

今回、多量のhCGやPGF₂ による卵巢の感作現象を知る目的で、牛や羊の卵巢でのMDS法 [1, 3, 9-11, 13-15, 21, 22] に準拠し、hCG、PGF₂ および血管作動性ペプチドを馬の黄体組織に環流したところ、感作細胞から分泌したP₄とPGF₂ が回収された。Gintherは、馬の血中P₄濃度は排卵後3～5日から急上昇すると述べている [6]。組織学的には、排卵後24時間以内に内卵胞膜細胞は変性し、顆粒膜細胞がステロイドホルモン分泌を開始する [19]。WatsonとSertich [20] は培養した機能性黄体細胞にLHを作用させてもP₄は増加しないこと、またKellyら [8] はhCG投与群の血中P₄濃度は無処置群と比べ、発情徴候消失後3日から高値で推移すると報告している。今回の成績では、P₄分泌には濃度依存性がなく、形成期黄体組織にhCG 100 IUを還流してもP₄産生は低下傾向を示した。一方、形成期黄体組織のhCG 10 IU群、100 IU群のいずれにおいてもPGF₂ 分泌が有意に増加した。開花期組織でもhCG 100 IU群はhCG 10 IU群および無処置群との間に有意差が認められたことから、Allenが報告している胚の消失の誘因となる可能性が示唆された [2]。したがって、今後黄体形成不全や流産の予防・治療に必要なhCG投与量については詳細な検討が必要と考える。また、Jochleらは馬にPGF₂ を静脈内投与した結果、数分で血中LH、卵胞刺激ホルモンおよびP₄濃度が急激に上昇したことを報告している [7]。

さらに、血管作動性ペプチドをMDS法で馬の形成期黄体組織と開花期黄体組織に感作したところ、いずれのペプチドもP₄分泌を刺激しなかったが、PGF₂ 生合成とは強く関連することが明らかにされた。近年、牛の卵胞発育や排卵と血管作動性ペプチドとの関係が明らかにされ [1]、Kobayashiらは形成期黄体組織にAngiotensin- やPGF₂ を感作するとP₄分泌が刺激され、Angiotensin- はPGF₂ 分泌も刺激することを報告している [10]。さらに、牛の形成期黄体組織や退行期黄体組織の衰退と再構築に血管作動性ペプチドの関与が大きく [9, 14]、人の成熟卵胞や黄体細胞のホルモン分泌には成長因子が強く関わり、ステロイドホルモン生合成に重要なステロイド合成性急性調節タンパクの作用を調整している [4]。

Ferreira-Diasらはラットにおいて排卵直後の毛細血管形成に強い血管作動性ペプチドの関与を認め [5]、Kobayashiらも牛の黄体形成と機能維持に類似した反応があることを報告している [9]。馬の黄体は牛と異なり、P₄分泌に血管作動性ペプチドの直接関与がないと思われ、今後黄体細胞から顆粒層細胞や内卵胞膜細胞の分化はどのような遺伝子プログラムの切り替えで行われるかが明らかにされ、臨床現場に還元されることを期待する。

今回の研究から、MDS法がhCG、PGF₂ および血管作動性ペプチド製剤投与による馬黄体組織からのホルモン分泌反応の解明に応用可能であることが示唆された。

謝 辞

本実験は、特殊法人日本中央競馬会からの研究費補助により行った。材料採取に協力いただいた熊本市食肉センター各位、供試製剤の提供をいただいたSigmaとPeptide Institute Inc.社に感謝の意を表します。また、実験に当たり多事ご指導いただいた国立大学法人帯広畜産大学宮本明夫教授には深甚な感謝の意を表します。

文 献

1. Acosta TJ, Berisha B, Ozawa T, Sato K, Schams D, Miyamoto A (1999) Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles *in vitro*: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol Reprod*, 61 : 1419-1425
2. Allen WE (1974) Administration of human chorionic gonadotrophins (hCG) to pregnant pony mares. *Vet Rec*, 94 : 505
3. Berisha B, Schams D (2005) Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol*, 29 : 305-317
4. Devoto L, Christenson LK, McAllister JM, Makriginnakis A, Strauss JF 3rd (1999) Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosa-lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression. *Mol Hum Reprod*, 5 : 1003-1010
5. Ferreira-Dias G, Bravo PP, Mateus L, Redmer DA, Medeiros JA (2006) Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol*, 30 : 247-259

- 6 . Ginther OJ (1992) Reproductive hormones, sexual behavior, characteristics of the ovulatory season and endocrinology of the ovulatory season. In : Reproductive biology of the mare. 2nd ed, 41-290, Equiservices, Wisconsin
- 7 . Jochle W, Irvine CH, Alexander SL, Newby, TJ (1987) Release of LH, FSH and GnRH into pituitary venous blood in mares treated with a PGF analogue, luprostiol, during the transition period. J Reprod Fertil Suppl, 35 : 261-267
- 8 . Kelly CM, Hoyer PB, Wise ME (1988) *In-vitro* and *in-vivo* responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. J Reprod Fertil, 84 : 593-600
- 9 . Kobayashi S, Berisha B, Amselgruber WM, Schams D, Miyamoto A (2001) Production and localisation of angiotensin in the bovine early corpus luteum, a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F₂ . J Endocrinol, 170 : 369-380
- 10 . Kobayashi S, Acosta TJ, Ozawa T, Hayashi K, Berisha B, Ohtani M, Schams D, Miyamoto A (2002) Intraluteal release of angiotensin and progesterone *in vivo* during corpora lutea development in the cow : effect of vasoactive peptides. Biol Reprod, 66 : 174-179
- 11 . Kojima AY, Kobayashi S, Acosta TJ, Kudo M, Miyamoto A, Takagi M, Miyazawa K, Sato K (2002) Effects of LH and PGF₂ in equine dominant follicles observed by MDS. J Vet Med Sci, 64 : 119-122
- 12 . 三宅 勝, 佐藤邦忠 (1992) 雌馬の繁殖季節. 農用馬増産の手引き. 2-4, 北海道獣医師会, 札幌
- 13 . Miyamoto A, Schams D (1991) Oxytocin stimulates progesterone release from microdialyzed bovine corpus luteum *in vitro*. Biol Reprod, 44 : 1163-1170
- 14 . Miyamoto A, Okuda K, Schweigert FJ, Schams D (1992) Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum *in vitro*. J Endocrinol, 135 : 103-114
- 15 . Miyamoto A, Nakatsuka T, Ohtani M, Fukui Y (1998) Intraluteal release of progesterone and prostaglandins during PGF₂ -induced luteolysis in ewes : Local effects of tumor necrosis factor- . J Reprod Develop, 44 : 385-391
- 16 . Neely DP, Stabenfeldt GH, Sauter CL (1979) The effect of exogenous oxytocin on luteal function in mares, J Reprod Fertil, 55 : 303-308
- 17 . 西川義正 (1959) 性腺刺激ホルモンに対する馬の卵巢の感受性, 特に他種動物との比較. 馬の繁殖に関する研究. 126-137, 日本中央競馬会, 東京
- 18 . Rossdale PD, Ricketts SW (1974) The practice of equine stud medicine. 1-97, Willims and Wilkins, Baltimore
- 19 . Van Niekerk CH, Morgenthal JC, Gerneke WH (1975) Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. J Reprod Fertil Suppl, 23 : 171-175
- 20 . Watson ED, Sertich PL (1990) Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. J Reprod Fert, 88 : 223-229
- 21 . Wijayagunawardane MP, Miyamoto A, Cerbito WA, Acosta TJ, Takagi M, Sato K (1998) Local distributions of oviductal estradiol, progesterone ; prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. Theriogenology, 49 : 607-618
- 22 . Wijayagunawardane MP, Kodithuwakku SP, Yamamoto D, Miyamoto A (2005) Vascular endothelial growth factor system in the cow oviduct; a possible involvement in the regulation of oviductal motility and embryo transport. Mol Reprod Develop, 72 : 511-520