

乳牛の子宮内膜厚の周期的変化ならびに
性ステロイドホルモンによる調節機序に関する研究

酪農学園大学大学院
獣医学研究科
獣医学専攻博士課程

杉浦智親

生産動物医療学分野
動物生殖学
指導教員 教授 田島誉士

2017 年度

目次

凡例	1
緒言	3
第 I 章 乳牛の子宮内膜厚測定法の確立ならびに子宮内膜厚、 プロジェステロンおよびエストラジオール濃度の変化	
1. 序文	8
2. 材料および方法	9
1) 供試動物	9
2) 発情誘起と発情発見	11
3) 超音波検査	11
(1) 機器の設定	11
(2) 子宮内膜厚の評価	11
(3) 卵巣の評価	12
4) 採血	15
5) 血中性ステロイドホルモンの測定	15
(1) プロジェステロン測定のための試料調整と操作手順	16
(2) エストラジオール測定のための試料調整と操作手順	17
6) 試験プロトコール	17
7) 統計処理	21
3. 結果	25
1) 発情周期中の子宮内膜厚変化と標準化	25
2) 自然発情群における排卵前後の子宮内膜厚変化率および 血中性ステロイドホルモン濃度の変化	27
3) 誘起発情群における排卵前後の子宮内膜厚変化率および 血中性ステロイドホルモン濃度の変化	27

4) 誘起発情群におけるプロスタグランジン F _{2α} 処置前後の 子宮内膜厚変化率および血中性ステロイドホルモン濃度の変化	28
5) 自然発情群および誘起発情群における排卵前後の子宮内膜厚 変化率と血中性ステロイドホルモン濃度の比較	29
4. 考察	38
5. 小括	44
第Ⅱ章 乳牛の子宮内膜厚に対するプロジェステロンおよび エストラジオールの作用機序の解明	45
1. 序文	45
2. 材料および方法	47
1) 供試動物	47
2) 発情誘起と発情発見	48
3) 卵巣摘出術	49
4) 超音波検査による子宮内膜厚および卵巣構造物の評価	49
5) 採血および血中性ステロイドホルモンの測定	50
6) 子宮内膜組織の採取（子宮内膜バイオプシー）	50
7) リアルタイム PCR	52
8) 試験プロトコール	54
(1) 高プロジェステロン環境下（黄体期）における エストラジオール処置	54
(2) 卵巣摘出牛に対する無処置での観察	55
(3) 卵巣摘出牛へのプロジェステロン単独処置	55
(4) 卵巣摘出牛へのプロジェステロンおよびエストラジオール 併用処置	56
(5) 卵巣摘出牛へのエストラジオール単独処置	56

9) 統計処理	60
3. 結果	62
1) 高プロジェステロン環境下（黄体期）におけるエストラジオール処置	62
(1) 血中プロジェステロン濃度の変化	62
(2) 血中エストラジオール濃度の変化	62
(3) 子宮内膜厚の変化	63
(4) 子宮内膜組織中の受容体および液性因子の発現量	63
2) 卵巣摘出牛に対する無処置時の血中プロジェステロン濃度、 エストラジオール濃度および子宮内膜厚の変化	66
3) 卵巣摘出牛へのプロジェステロン単独処置時の血中プロジェス テロン濃度、エストラジオール濃度および子宮内膜厚の変化	66
4) 卵巣摘出牛へのプロジェステロンおよびエストラジオール併用 処置時の血中プロジェステロン濃度、エストラジオール濃度 および子宮内膜厚の変化	67
5) 卵巣摘出牛へのエストラジオール単独処置時の血中プロジェス テロン濃度、エストラジオール濃度および子宮内膜厚の変化	68
6) プロジェステロン単独処置、プロジェステロンおよびエストラジ オール併用処置、エストラジオール単独処置時の血中性ステロイド ホルモン濃度および子宮内膜厚の変化の比較	68
7) 卵巣摘出牛の子宮内膜組織中の受容体および液性因子発現量	79
4. 考察	81
5. 小括	91
総括	92
謝辞	95
引用文献	96

凡例

- BW 体重
- cDNA 相補的 DNA (デオキシリボ核酸)
- CIDR 腔内留置型プロジェステロン徐放剤
- CMO カルボキシメチルオキシム
- DMSO ジメチルスルホキシド
- E 受容体 エストロジェン受容体
- E₂ エストラジオール
- EB 安息香酸エストラジオール
- EDTA エチレンジアミン四酢酸
- EGF 上皮成長因子
- EIA 酵素免疫測定法
- ET 胚移植
- FGF 線維芽細胞増殖因子
- HRP ホースラディッシュペルオキシダーゼ
- ICSI 顕微授精
- IgG 免疫グロブリン G
- IVF 体外受精
- LIF 白血病阻止因子
- M-CSF マクロファージコロニー刺激因子
- MMP マトリックスメタロプロテアーゼ
- mRNA メッセンジャーRNA (リボ核酸)
- P₄ プロジェステロン
- P 受容体 プロジェステロン受容体

PCR ポリメラーゼ連鎖反応
PDGF 血小板由来増殖因子
PlGF 胎盤増殖因子
PGF_{2α} プロスタグランジン F_{2α}
RNA リボ核酸
TMB テトラメチルベンジジン
UHP 尿素・過酸化水素
VEGF 血管内皮細胞成長因子

緒言

乳牛の遺伝的能力の改良および飼養管理方法の大規模化と改善により、1頭当たりの乳量増加およびコスト低減等の成果を挙げ、酪農の生産性は飛躍的に向上してきた。しかしながら、右肩上がりに増加する乳牛1頭あたりの年間生産乳量とは対照的に、乳牛の繁殖成績は、1990年代はじめから世界的に低下の一途をたどり、酪農業における収益性低下の要因となるため問題となっている[58]。高産乳牛では、肝臓への血流量が増加するためプロジェステロン (P_4) およびエストラジオール (E_2) の代謝が亢進し、慢性的な血中ステロイドホルモン濃度の低下状態にさらされる[64]。乳量増加に対し、発情時の E_2 濃度、発情持続時間および発情強度が反比例することも報告され[46]、血中ステロイドホルモン濃度の低下が生殖能に与える負の影響は、最終的に乳牛の不受胎につながる。性ステロイドホルモン濃度の低下は子宮環境にも及び、着床および受胎の場であり妊娠の成立と維持に非常に重要な役割を果たす子宮内膜にも影響することが推測される。乳牛の子宮内膜の状態の客観的評価が可能となり、性ステロイドホルモンの子宮内膜に対する作用が明らかになることは、生産現場における子宮内膜評価の一助となり、さらに牛の子宮内膜と受胎性の関係解明につながり、乳牛の低迷する受胎性の改善に貢献できるものと考えられる。

人の子宮内膜はその生理的機能を維持するために月経周期中で剥離と増生を繰り返す。月経周期毎に形成される子宮内膜の厚さ（子宮内膜厚）は異なるため、婦人科領域では体外受精/顕微授精卵移植（IVF/ICSI-ET）のレシピエント[38]や人工授精の患者[83]の妊娠予測の一つの指標として子宮内膜厚の測定が普及している。IVF/ICSI-ETにおける子宮内膜厚と受胎性に関する報告は非常に多く、子宮内膜厚測定による妊娠予測は有用性が高いことが

示されている。子宮内膜が薄い[1, 15, 16, 19, 24, 33, 59, 61]あるいは厚すぎる場合[19, 59, 80]には受胎性が低下するのに対し、子宮内膜が適度な厚さを維持している場合には受胎に有利である[3, 7, 15, 25, 33, 52]という診断指針が一般的になっている。動物における子宮内膜厚の研究は、馬[27]や牛[6, 45, 56, 75]について報告がある。牛の子宮内膜厚を測定した研究報告は、分娩後の子宮回復の把握[6, 45]、子宮内膜炎の評価[6]、発情周期中の子宮あるいは子宮内膜の形態的変化の生理学的調査[56, 75]などを目的としているが、その中で子宮内膜厚と受胎性の関係について言及している研究は極めて少ない。生産動物臨床分野において、超音波検査が普及する昨今、牛では子宮内膜厚の測定方法をはじめ、評価基準も設定されていないのが現状である。人は単子宮であり、経膣プローブを用いた超音波検査が通常であるため、子宮および子宮内膜は常に同じ方向から描出される。一方で、牛の子宮は両分子宮であり、経直腸プローブを用いた超音波検査がほとんどであるため、左右子宮角の測定部位、プローブを当てる方向（縦断面、横断面）、測定範囲の設定など統一すべき条件が多く、牛の子宮内膜厚を客観的に評価するためには課題が多い。

月経周期中で剥離および増生を繰り返し、脱落膜を形成する人の子宮内膜と異なり、脱落膜を形成しない牛の子宮内膜は、卵胞期に厚くなり、黄体期に元の厚さに戻るという変化を繰り返す[56]。この卵胞期の変化は病理組織学的に子宮内膜が充血し、浮腫を起こすことによるものであると報告されている[47]。未経産牛の自然発情周期中の子宮壁の厚さの形態学的変化を超音波検査で観察した研究において、黄体退行期に子宮壁の厚さが増加し始め、排卵後に徐々にその厚さが減少することが確認された[56]。また、経産牛の定時人工授精プログラムによる誘起発情において、黄体退行処置のためのプロスタグランジン（PG）F_{2α}処置後24時間以内に子宮内

膜の厚さが急速に増加したとの報告もある[75]。一般的に、牛の受胎率は自然発情および誘起発情において差はないとされるが[11, 13, 76]、PGF_{2α}を用いた誘起発情よりも自然発情における受胎率の方が高いという報告もある[78, 86]。排卵同期化プログラム等による種々のホルモン剤を用いた誘起発情においては、主席卵胞の老化や十分な大きさに成長する前の主席卵胞の排卵がその後の受精や胚の成長に影響し、受胎性の低下につながると考えられている[12, 49, 55, 79]。さらに、PGF_{2α}による誘起発情において子宮内膜厚が急速に増加したことは[75]、自然発情時の本来の子宮内膜浮腫の発生のタイミングと異なり、子宮内環境が早くに変化することで、その後の受胎性に影響を与える要因となる可能性が予測される。したがって、自然発情および誘起発情における牛子宮内膜厚の変化を直接比較し、形態学的変化の詳細を解明する必要があると考えられる。

子宮機能調節の中心的役割を果たす性ステロイドホルモンは、発情周期に伴って厚さが増減する牛の子宮内膜の形態学的変化にも深く関与すると考えられる[10, 18, 31, 56, 57]。しかしながら、子宮内膜厚と性ステロイドホルモンとの関係については不明な点が多い。一般的に、脱落膜を形成する霊長類や齧歯類では、卵胞発育につれて増加する E₂ によって子宮内膜に浮腫が生じ、子宮内膜細胞が増殖して子宮内膜厚が増加する[5, 39, 83]。E₂ の作用がどのようにして細胞増殖につながるかは明らかにされていないが、血管内皮細胞成長因子 (VEGF)、上皮成長因子 (EGF)、繊維芽細胞増殖因子 (FGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF) などの種々の液性因子を介することが示唆されている[36]。また、子宮内膜の細胞が分化し脱落膜を形成していく過程では P₄ も大きく関与する[72]。非妊娠時の子宮内膜の脱落膜化は軽度であるものの、子宮内膜細胞の形態変化に P₄ は必須である[36]。P₄ の作用がどのようにして細胞変化を誘導するかは明らかではないが、マクロファ

ージコロニー刺激因子 (M-CSF) [30, 37]や白血病阻止因子 (LIF) [2, 40]などのサイトカインを介することが知られている。さらに、 P_4 は E_2 と同様に、VEGF を介して血管透過性や血管新生に関与することが報告されているが [17, 26, 70]、この作用は E_2 ほど急速かつ強力な作用ではなく、緩徐に時間をかけて作用する [17, 32]。一方、牛 [21, 28, 56, 75]および羊 [35, 60]の子宮内膜厚や子宮血流量の変化と E_2 濃度との間には相関性があることが報告されている。卵巣を摘出した羊において、 E_2 処置した場合は細胞肥大によって子宮重量が増加し [35]、子宮内膜毛細血管の発達と血流量増加が認められた [60]。牛の子宮内膜に対する E_2 の作用は直接的に解明されているわけではないが、卵胞期に E_2 濃度が上昇し [21, 28]、子宮内膜が浮腫状態となることから、霊長類や齧歯類と同様に、 E_2 が子宮内膜厚増加に作用することが推測されている [56, 75]。また、 P_4 が子宮内膜の変化に関与することを示唆した報告もある [34, 75]。しかし、脱落膜を形成しない牛においては、 P_4 が子宮内膜細胞の分化や増殖に関わるとは考えにくく、 P_4 の牛子宮内膜に対する作用の詳細は明らかにされていない。

このように、現時点では牛の子宮内膜厚の測定方法や評価基準は確定されておらず、将来的に牛子宮内膜厚と受胎性との関係を解明するためにも牛子宮内膜厚の測定方法を確立することは意義深い。また、発情周期に応じてその厚さが変化する牛子宮内膜厚は、血中ステロイドホルモンバランスの影響を受け、子宮内膜の反応性やその後の受胎性にも影響する可能性がある。したがって、発情周期中の牛子宮内膜厚および性ステロイドホルモン濃度の変化の詳細を評価し、性ステロイドホルモンが子宮内膜にもたらす作用およびその生理的作用機序を解明することは、乳牛の受胎率改善につながると考えられる。

以上のことから、本研究では第 I 章において牛子宮内膜厚の測定方法を確

立するため、超音波検査によって発情周期中の子宮内膜の形態学的変化を観察し、さらに、自然発情および $\text{PGF}_{2\alpha}$ を用いた誘起発情における子宮内膜厚と性ステロイドホルモン濃度との関係を比較検討した。次に、第 II 章において卵巣摘出牛を作出し、外因性性ステロイドホルモン処置 (P_4 または E_2 単独、あるいは併用) により、牛子宮内膜厚の変化に対する P_4 および E_2 の作用を検討した。また、子宮内膜浮腫の誘因に最も密接に関与していることが予測される VEGF に着目し、子宮内膜の各種性ステロイドホルモン受容体、VEGF 受容体、および VEGF の mRNA 発現を定量し、 P_4 および E_2 が子宮内膜に対して形態的变化を引き起こす生理学的作用機序について検討した。

第 I 章 乳牛の子宮内膜厚測定法の確立ならびに子宮内膜厚、プロジェステロンおよびエストラジオール濃度の変化

1. 序文

超音波検査による乳牛の子宮内膜厚の形態学的変化を評価したこれまでの報告において、子宮内膜厚の測定方法は各々の研究で異なっている。発情周期を通して未経産牛子宮体の子宮漿膜面から子宮内腔までの距離を測定した報告[56]、定時人工授精前後の経産牛子宮角の子宮内膜と子宮筋層の境界から子宮内腔までの距離を測定した報告[75]、黄体期の未経産牛右子宮角の子宮内膜の直径を測定した報告[34]など、子宮内膜厚の測定方法が様々であり、共通の評価基準が設定されていない。超音波検査によって描出される正常な子宮内膜の形態は、発情周期によって異なるが、正円形から楕円形を呈し、子宮内腔領域を認める場合とそうでない場合とがある。子宮内腔領域は発情周期による子宮内貯留物や子宮小丘の存在に影響を受けるため、いびつな不整形となり、常に子宮内膜領域の中央に描出されるわけではない。すなわち、子宮内膜の辺縁から子宮内腔までの距離をもって子宮内膜厚とした場合には、測定起始点の設定および子宮内膜の形状や内腔の位置関係次第で子宮内膜厚が大きく変動することになる。したがって、牛の子宮内膜厚を正確に測定するためには、発情周期および超音波検査において描出される子宮内腔領域の有無や位置に影響されずに測定する方法を考慮する必要がある。

乳牛の子宮内膜厚は個体差があることに加え、産次数を重ねるほど子宮内膜が厚くなる傾向があるため[75]、産次数の異なる個体間で子宮内膜厚を直接比較することは困難である。また、牛の子宮内膜は卵胞期にその厚さが増加することから、子宮内膜厚の基準を設定して子宮内膜厚を標準化し、発情

周期内で子宮内膜厚の変化の割合（子宮内膜厚変化率）を評価する手法が有用であると予測される。

そこで、本章では発情周期を通して経産牛の子宮内膜の超音波検査を行い、子宮内膜の形態や子宮内腔領域を考慮した測定方法を実践し、個体毎に厚さの異なる子宮内膜厚を客観的に評価する測定法を検討した。それらの手法を利用して自然発情および誘起発情における子宮内膜厚の形態学的変化を観察し、さらに、子宮内膜厚の周期的変化、プロジェステロン（ P_4 ）濃度およびエストラジオール（ E_2 ）濃度の変化を解析した。

2. 材料および方法

1) 供試動物

本章の研究は酪農学園大学動物実験指針に基づいて適正に実施された（承認番号：VH25C3）。酪農学園大学フィールド教育センター酪農生産ステーションの分娩後38～86日のホルスタイン種搾乳牛15頭（初産牛8頭、2産以上の牛7頭、表1）を供試した。供試牛はフリーストールで飼養され、National Research Council（NRC、2001年）に準拠した栄養要求量を満たす完全混合試料（total mixed ration）給餌であり、1日2回搾乳された。いずれの供試牛も分娩後から試験開始までにホルモン剤による治療や発情および排卵同期化などのホルモン剤を使用した繁殖プログラム処置を受けていなかった。試験開始にあたり、供試牛に対し直腸検査、膣検査[82]、生殖器[66]および卵巢構造物[67]の超音波検査、子宮内膜細胞診[65]などの検査を実施し、臨床的に正常で、生殖器に異常を認めない牛を選抜した。なお、本章の試験中に何らかの繁殖障害を呈した牛あるいは内科疾

患に罹患した牛は供試から除外した。

表 1
第 I 章の研究の供試牛一覧

供試牛 No.	産次数	分娩後日数*
1	5	73
2	1	61
3	1	68
4	1	40
5	1	39
6	1	36
7	6	80
8	2	40
9	2	35
10	2	35
11	2	36
12	3	86
13	1	52
14	1	43
15	1	37

*分娩～1 回目の膣内留置型プロジェステロン徐放剤 (CIDR) 処置
開始までの日数

2) 発情誘起と発情発見

すべての供試牛に膣内留置型プロジェステロン徐放剤（CIDR1900、ゾエティス・ジャパン）を 5～7 日間膣内に留置し、CIDR 抜去と同時にプロスタグランジン（PG）F_{2α}（ジノプロストトロメタミン、プロナルゴン F、ゾエティス・ジャパン）を 1 頭あたり 25 mg 投与することで、発情を誘起した。検査実施時には毎回 2 名以上で 30 分間にわたって供試牛の発情行動を観察した。他牛の陰部の臭い嗅ぎあるいは顎乗せ行動、乗駕行動、乗駕許容などの発情行動の確認により発情と判断した。

3) 超音波検査

(1) 機器の設定

超音波検査には動物用経直腸リニア型プローブ（5～10 MHz、HLV-475M、本多電子、愛知）を接続した超音波診断装置（HS-2100V、本多電子）を用いた。衛生面を考慮し、I 字型の経直腸プローブにはビニールカバーを施し、個体毎に取り換えながら経直腸での卵巣および子宮角横断面像を観察した。超音波診断装置は常に周波数 7.5 MHz、深度 3 cm、超音波出力 60%、ゲイン 86 dB に設定した。

(2) 子宮内膜厚の評価

子宮の超音波検査は、直腸内でプローブを子宮の長軸に対して垂直に保持し、子宮体背側面から左右それぞれの子宮角に向けて子宮横断面像を描出した。その際、強引な直腸壁の操作や子宮への過度な刺激は子宮収縮による子宮形態の変化を誘引してしまうため、極力ゆっくり丁寧に検査するよう細心の注意を払った。超音波検査部位は左右子宮角の角間間膜附着部（図 1）とし[68]、横断面静止画像を取り込み保存した。検査中は超音波動画もデジタルレコーダー（VR570、東芝テリー、東京）を用いて同時に録画し、取り込

み保存した超音波静止画像が十分ではないと判断された場合に利用した。描出された子宮角横断面のうち、子宮筋層の内側の低エコー領域として描出される血管層の内側領域を子宮内膜とした[18] (図 2a)。子宮内膜の厚さは Image J (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institute of Health, Bethesda, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016) を用いて測定した。子宮内膜の形態は円形から楕円形を呈することが多いため、子宮内膜領域の長径および短径の平均値を直径として算出した (図 2b)。子宮内腔領域があった場合、子宮内腔領域の長径および短径の平均値を同様に算出し、子宮内膜領域の直径から減じた (図 2c)。この測定方法によって左右それぞれ子宮内膜厚を測定し、左右子宮内膜厚の平均値をその個体の子宮内膜厚とした。子宮内膜厚直径の算出法は下式の通りである。

子宮内膜厚直径

$$= \{(右子宮内膜長径 + 短径)/2 + (左子宮内膜長径 + 短径)/2\}/2$$

(3) 卵巣の評価

卵巣構造物である黄体および最も大きな卵胞についても超音波検査を実施し、その直径を測定した。これらの卵巣構造物の直径は子宮内膜と同様、その長径と短径の平均値を算出することによって求めた。排卵のタイミングは、超音波検査で初めて排卵が確認された検査時とした。また、すべての供試牛において最後の発情行動が観察されてから 48 時間以内に排卵したことが確認された。

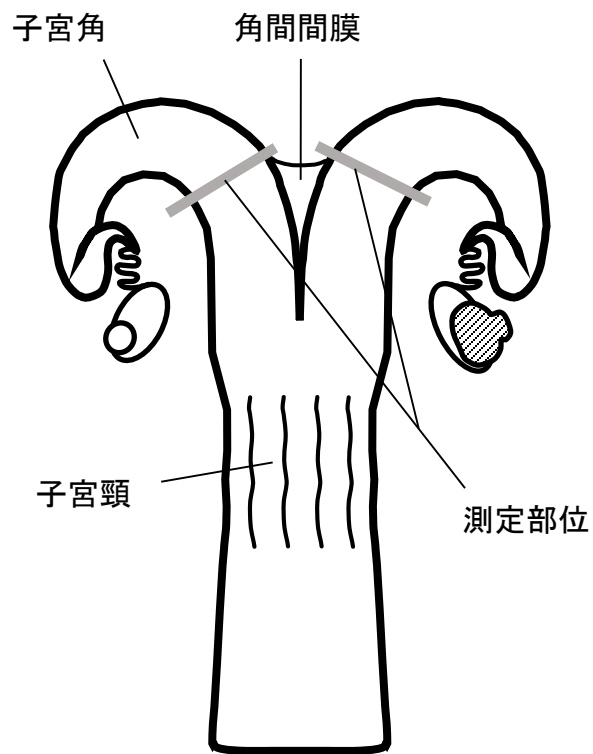


図 1. 超音波検査部位模式図

左右子宮角の角間間膜附着部で子宮角横断面像を描出。

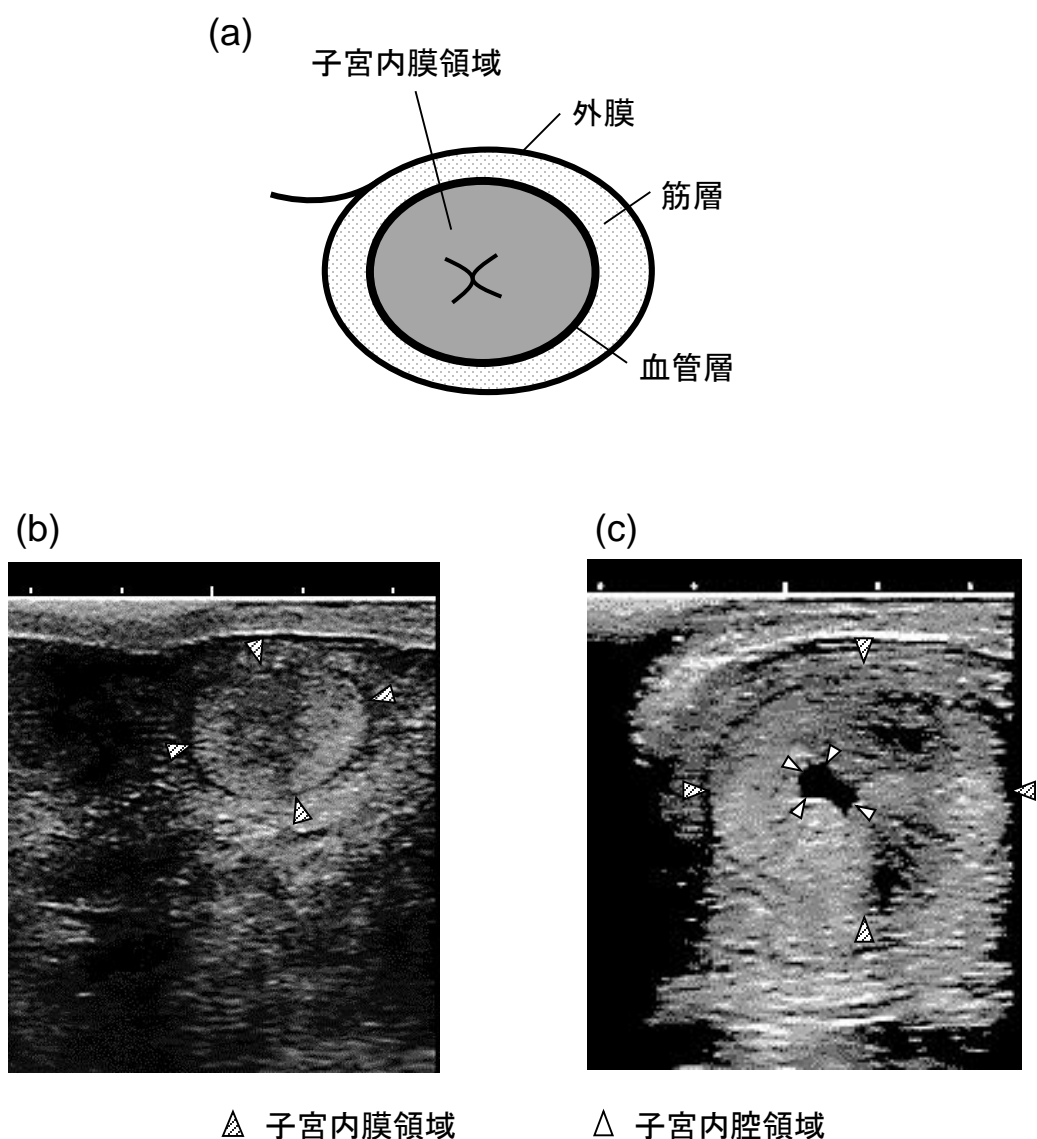


図 2. 子宮角横断面模式図 (a)、楕円形 (b) および 内腔を有する (c) 子宮内膜超音波画像

子宮内膜領域は血管層の内側とした (a)。子宮内膜超音波画像 (b) および (c) は供試牛 No. 11 (表 1) の左子宮角で、(b) は黄体期 (排卵後 9 日目) の子宮内膜の典型例、(c) は卵胞期 (排卵 2 日前) の子宮内膜典型例を示した。子宮内膜厚の算出式を以下に示す。

$$(b) \text{ 子宮内膜厚直径} = (\text{子宮内膜長径} + \text{短径}) / 2$$

$$(c) \text{ 子宮内膜厚直径} = (\text{子宮内膜長径} + \text{短径}) / 2 - (\text{内腔長径} + \text{短径}) / 2$$

4) 採血

超音波検査と同時に、約 20 ml の採血を実施した。頸静脈より採血する場合には 18 G 針を装着した 20 ml シリンジを使用し、正中尾静脈より採血する場合には採血針を装着した採血ホルダーを用いた。血液は処理するまで EDTA 加真空採血管 (Venoject II EDTA、テルモ、東京) で冷蔵保存し、3000 rpm で 15 分間遠心分離後、その血漿をステロイドホルモン測定まで -30℃ で凍結保存した。

5) 血中性ステロイドホルモンの測定

血漿中の P₄ および E₂ 濃度の測定は Yanagawa ら [88] の競合型 2 抗体酵素免疫測定法 (EIA) を応用した。P₄ 測定の一次抗体にウサギ抗プロジェステロン-3-(O-carboxy-methyl) oxime (CMO) 血清 (KZ-HS-P13、Cosmo Bio、東京)、E₂ 測定の一次抗体にウサギ抗エストラジオール-17β-6-CMO 血清 (FKA-204、Cosmo Bio) を用いた。測定用緩衝液は 145 mM NaCl (塩化ナトリウム、関東化学、大阪)、40 mM Na₂HPO₄ (リン酸二水素ナトリウム、関東化学) を pH 7.2 に調整した溶液とし (Ca および Mg 不含)、使用直前に 0.1% 牛血清アルブミン (A7030、SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA) を添加し、測定に用いた。洗浄液は 0.05% ツィーン 80 (Tween80、関東化学) を使用した。基質溶液は C₁₆H₂₀N₂ (TMB; 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、東京化成工業、東京) を主成分とする溶液、すなわち 5 mM C₆H₈O₇·H₂O (クエン酸水和物、ナカライテスク、京都)、50 mM Na₂HPO₄、500 mM CH₄N₂O·H₂O₂ (UHP; 過酸化水素尿素、SIGMA-ALDRICH)、1 mM TMB、2% C₂H₆OS (DMSO; ジメチルスルホキシド、関東化学) を調整して用いた。P₄ および E₂ の測定には 96 ウェルマイクロプレート (Costar 3590、CORNING、Corning、NY、USA) にヤギ抗 IgG 血清 (111-005-003、Jackson

Immuno Research Laboratories、West Grove、PA、USA) を 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整して各ウェルにコーティングし、測定用緩衝液でブロッキングしたものをを用いた。いずれのサンプルも 3 ウェルずつ使用して評価した。

(1) P₄ 濃度測定のための試料調整と操作手順

P₄ はジエチルエーテルを用いて 2 回抽出した。200 μl の血漿を 16 × 100 mm のガラス試験管に分注し、ジエチルエーテル 2 ml を加えて 15 分間振盪したのち 5 分間静置した。これをビーズ状ドライアイス (-79°C) で冷却したアセトンに浸して血漿層を凍結させ、液状エーテル層を別の新しいガラス試験管に移した。このガラス試験管を 43°C のウォーターバスで加温して乾固した。凍結血漿層が残ったガラス試験管を室温に戻して融解し、再度ジエチルエーテル 2 ml を加えて同様の操作を行った。2 回目の抽出操作のジエチルエーテル加血漿ガラス試験管の液状エーテル層は 1 回目の抽出で乾固し終えたガラス試験管に移したのちに同様に乾固した。ガラス試験管内壁に付着した抽出物を試験管底に落とすため、1 ml のジエチルエーテルを試験管内壁全面に沿わせるように加え、再度 43°C ウォーターバスで加温して乾固した。このガラス試験管に 200 μl の測定用緩衝液を加えて抽出物を溶解し、EIA に供した。ヤギ抗ウサギ IgG コーティングプレートを洗浄液で 2 回洗浄した後、血漿サンプル抽出液および P₄ 標準品 (P-0130、SIGMA-ALDRICH) を測定用緩衝液で 2 倍階段希釈した希釈液を 20 μl ずつウェル内に添加した。一次抗体としてウサギ抗 P₄ 血清を測定用緩衝液で 160,000 倍希釈し、各ウェルに 100 μl ずつ加えた。さらに、測定用緩衝液で 80,000 倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識-P₄ を競合抗体として 100 μl ずつ加え、遮光 4°C で 16~18 時間反応させた。その後、ウェル内の反応液を捨て、洗浄液で 4 回洗浄した後各ウェルに基質溶液 150 μl ずつを添加し、37°C 40 分間インキュベートした。これに反応停止液 (2M-

H₂SO₄; 硫酸、関東化学) を 50 μl ずつ加えて 5 分間静置した。各ウェルの反応溶液の吸光度はマイクロプレートリーダー (Model 550、BIO-RAD Laboratories、東京) を用いて波長 450 nm で測定した。測定内および測定間変動はそれぞれ 5.4%、8.1%であった。

(2) E₂ 濃度測定のための試料調整と操作手順

E₂ は、2 ml の血漿にジエチルエーテル 6 ml を加えて、P₄ と同様の操作で抽出した後、永田ら [50] の方法に準じ、アセトニトリル-ヘキサン分配法を応用した脱脂操作を行った。抽出乾固済ガラス試験管にアセトニトリル 0.5 ml およびヘキサン 1 ml を添加し、3 分間振盪した後さらにヘキサン 1 ml を加え、ヘキサン層を吸引除去した。ヘキサン 1 ml を加えて振盪、吸引除去する操作をさらに 2 回反復し、最後にもう一度ヘキサン 1 ml を加え、振盪せずに吸引除去した。ガラス試験管内に残されたアセトニトリル層は遠心エバポレーターを用いて乾固した。このガラス試験管に分注血漿の 20 倍濃縮となるよう 100 μl の測定用緩衝液を加えて抽出物を溶解し、EIA に供した。これ以降の操作は P₄ 濃度測定操作と同様に行った。ただし、試薬は E₂ 標準品 (E-1132、SIGMA-ALDRICH)、320,000 倍希釈した一次抗体のウサギ抗 E₂ 血清、80,000 倍希釈した HRP 標識-E₂ を使用した。測定内および測定間変動はそれぞれ 5.0%、14.6%であった。

6) 試験プロトコール

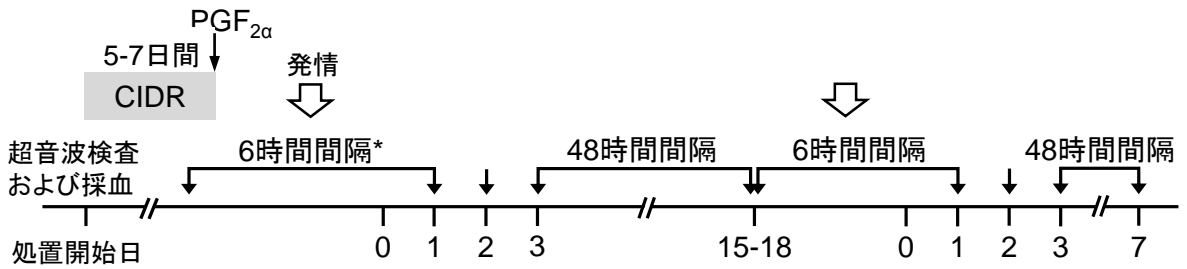
供試牛 (n = 15) へのホルモン処置、超音波検査、採血スケジュールを図 3 に示した。15 頭すべての供試牛の卵巢構造物として、機能性黄体 (20 mm 以上) および主席卵胞に成長することが予測された 10 mm 以上の大きな卵胞の存在を超音波検査によって確認したのち、本章の材料と方法 2) で示した発情誘起方法に従って CIDR および PGF_{2α} を組み合わせた処置を行い、1

回目の発情を誘起した。その後、No. 1~9 (n = 9、図 3 上段、表 2) の供試牛は 2 回目の発情を自然発情で供した。この No. 1~9 の供試牛より得られた自然発情 9 周期分を自然発情群 (n = 9) とした。No. 10~15 (n = 6、図 3 下段、表 2) の供試牛については 1 回目の発情と同様の発情誘起方法で 2 回目の発情を再度誘起した。1 回目 (No. 1~15、n = 15) および 2 回目 (No. 10~15、n = 6) の誘起発情を合わせると計 21 周期分の誘起発情データであったが、そのうち 1 回目 (No. 7~11、n = 5) および 2 回目 (No. 10~15、n = 6) の計 11 周期分の誘起発情データを誘起発情群として使用した (表 2、白抜き)。のべ 21 周期分の誘起発情のうち、残りの 10 周期分のデータ (No. 1~6、No. 12~15、表 2、網掛け) は PGF_{2α} 投与前段階の超音波検査を十分に行えていなかったため、誘起発情群から除外した。

自然発情群 (図 3 上段 : No. 1~9 の発情 2 回目) の 9 頭の超音波検査は、1 回目の排卵後 3 日目から黄体退行開始 (15~18 日目) まで 48 時間間隔で実施したのち、6 時間間隔の検査に切り替え、次の排卵後 24 時間 (1 日) 目まで継続した。その後、2、3、5、7 日目に検査を 1 日 1 回実施した。

誘起発情 (図 3 上段 : No. 1~9 の発情 1 回目、下段 : No. 10~15 の発情 1 および 2 回目) においては、PGF_{2α} を投与する 48~24 時間前に 6 時間間隔の超音波検査を開始し、排卵 (0 日) 後 24 時間 (1 日) 目まで継続した。その後、2、3、5、7 日目に検査を 1 日 1 回実施した。2 回目の発情誘起は 7 日目に CIDR を留置し、本章の材料と方法 2) に示した発情誘起方法で実施した。その後、14 日目に PGF_{2α} 投与する 48~24 時間前に 6 時間間隔の超音波検査を開始し、1 回目の誘起発情と同様に検査を実施した。

供試牛No. 1～9: (1回目)誘起発情、(2回目)自然発情



供試牛No. 10～15: (1回目)誘起発情、(2回目)誘起発情

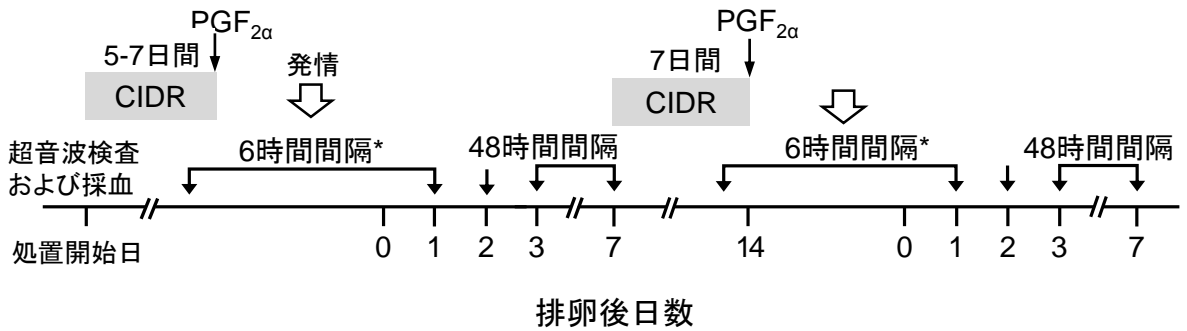


図 3. ホルモン処置および検査スケジュール

15頭の供試牛(表 1)に腔内留置型プロゲステロン徐放剤(CIDR)とプロスタグランジン(PG)F_{2α}を組み合わせた処置によって1回目の発情を誘起した。いずれの牛も、CIDR処置時には機能性黄体と主席卵胞と予測される大卵胞の存在を超音波検査で確認した。図は排卵日を0日とした。供試牛の概要は表 1を参照。

9頭(No.1～9、上段)は引き続き黄体期も検査を継続し、自然発情で2回目の発情時も検査した。

6頭(No. 10～15、下段)は排卵後7日目よりCIDRとPGF_{2α}による同様の発情誘起方法で2回目の発情を誘起して検査を行った。

*6時間間隔の超音波検査はPGF_{2α}処置の48～24時間前より開始した。

表 2
15 頭の供試牛における合計 30 周期分の発情データの内訳

供試牛 No.	1 回目の発情周期	2 回目の発情周期
1	誘起発情	自然発情
2	誘起発情	自然発情
3	誘起発情	自然発情
4	誘起発情	自然発情
5	誘起発情	自然発情
6	誘起発情	自然発情
7	誘起発情	自然発情
8	誘起発情	自然発情
9	誘起発情	自然発情
10	誘起発情	誘起発情
11	誘起発情	誘起発情
12	誘起発情	誘起発情
13	誘起発情	誘起発情
14	誘起発情	誘起発情
15	誘起発情	誘起発情

■: 網掛けの誘起発情データは誘起発情群から除外

15 頭の供試牛に膈内留置型プロジェステロン徐放剤 (CIDR) とプロスタグランジン (PG) $F_{2\alpha}$ を組み合わせた処置によって発情を誘起した (図 3)。

15 頭中 9 頭 (No. 1~9) の供試牛は自然発情で 2 回目の発情時も検査し、9 周期分の自然発情データを自然発情群とした。

残りの 6 頭 (No. 10~15) は再度 2 回目の発情を誘起した。1 回目の誘起発情のうち 5 周期分 (No. 7~11) と 2 回目の誘起発情の 6 周期分 (No. 10~15) を合わせて 11 周期分の誘起発情を誘起発情群とした。10 周期分の誘起発情データ (No. 1~6、No. 12~15、網掛け) は PG $F_{2\alpha}$ 投与前段階の超音波検査を十分に行えていなかったため、誘起発情群から除外した。

7) 統計処理

それぞれの測定値は平均値 ± 標準誤差で示した。子宮内膜厚の標準化に適した基準日を設定するため、No. 1~9 (表 3) の 9 頭の供試牛の卵胞期から黄体期間の子宮内膜厚のデータを用い、一元配置分散分析を行った後 Tukey-Kramer 多重比較検定により比較した。子宮内膜厚標準化基準日は子宮内膜厚が薄く、誤差範囲の小さい黄体期の 1 日とし、排卵後 5~17 日目をそれぞれ基準日とした場合で解析を行った。本章では 13 日目を標準化基準日に設定し、すべての子宮内膜厚測定値を基準日の測定値に対する変化率によって標準化した。また、すべての供試牛の左右子宮角より得られた 13 日目の子宮内膜厚直径実測値について、Student's *t*-test を用いて左右間の比較を行った。自然発情および誘起発情における子宮内膜厚変化率、P₄ 濃度、E₂ 濃度および性ステロイドホルモン濃度比 (E/P 比) は二元配置分散分析重複測定を行った後、必要に応じて post hoc test として Student's *t*-test を用いて同一検査日の 2 群間の比較検定を行った。同一群内における異なる検査日の 2 群間比較には Tukey-Kramer 多重比較検定を用い、子宮内膜厚変化率およびホルモン濃度の変化を解析した。その解析結果模式図を図 4 に示した。子宮内膜厚変化率または E₂ 濃度の変化は符号 a を基底とし、異符号 ab に変化するポイントを増加 (上昇) 開始とした (図 4a)。また、符号 a および異符号 ab を付された値は同等であり、ab を基底レベルとした。子宮内膜厚変化率または E₂ 濃度が最高値に達したポイント (符号 e、図 4a) をピークとし、ピークと同等であった値 (異符号 de、図 4a) をピークレベルとした。ピークからピークレベルに変化したポイントを減少 (低下) 開始とし、再び異符号 ab を付された値を基底レベルとした。P₄ 濃度の変化においては、試験開始後より符号 e (図 4b) から異符号 de に変化したポイントを低下開始 (図 4b) とした。いずれの検定結果も $P < 0.05$ をもって有意差ありと判

定した。これらの解析には、統計解析ソフト（Statcel 第3版、OMS出版、埼玉）を使用した。

表 3

子宮内膜厚標準化基準日の検討に使用した供試牛一覧

供試牛 No.	標準化基準日の設定
	1回目の発情周期
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-

+:解析に使用した発情周期

-:解析に使用しなかった発情周期

9頭の供試牛（No. 1～9）の1回目の発情周期（卵胞期～黄体期）を子宮内膜厚測定値の標準化基準日の設定に用いた（図5）。

No. 10～15の供試牛は黄体期（排卵後9～17日目）には検査しておらず（図3）、子宮内膜厚データがないため解析から除外した。

(a)

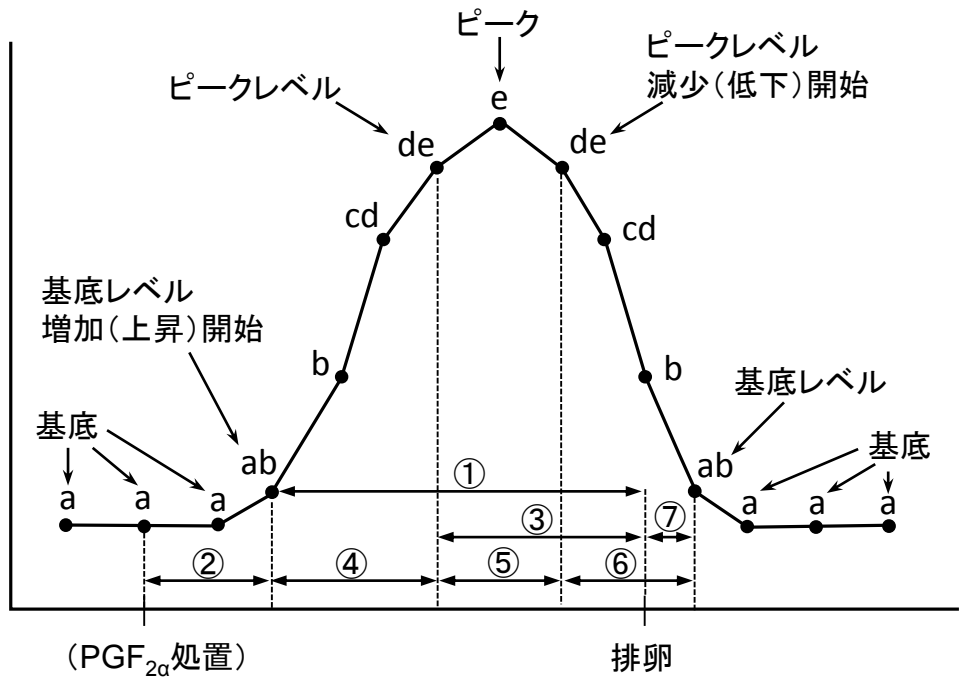


図 4a. 多重比較検定による子宮内膜厚変化率およびエストラジオール (E_2) 濃度変化の解析結果模式図

図中の①～⑦は以下の評価項目の所要時間を表す。

- ① 増加(上昇)開始から排卵まで
- ② プロスタグランジン(PG) $F_{2\alpha}$ 投与から増加(上昇)開始まで
- ③ ピークレベル到達から排卵まで
- ④ 増加(上昇)開始からピークレベル到達まで
- ⑤ ピークレベル到達から減少(低下)開始まで(ピークレベル持続時間)
- ⑥ 減少(低下)開始から基底レベル到達まで
- ⑦ 排卵から基底レベル到達まで

(b)

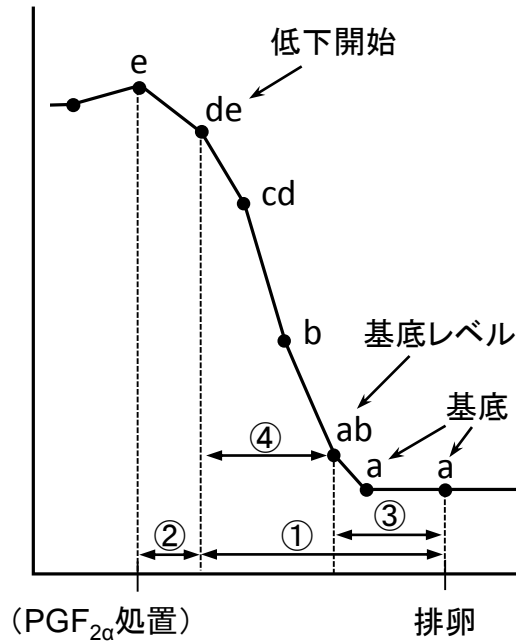


図 4b. 多重比較検定によるプロゲステロン(P_4)濃度変化の解析結果模式図

図中の①～④は以下の評価項目の所要時間を表す。

- ① 低下開始から排卵まで
- ② $PGF_{2\alpha}$ 投与から低下開始まで
- ③ 基底レベル到達から排卵まで
- ④ 低下開始から基底レベル到達まで

3. 結果

1) 発情周期中の子宮内膜厚変化と標準化

1 回目の誘起発情後の周期を観察した供試牛 (No. 1~9、n = 9、表 3) の子宮内膜厚の変化を図 5 に示した。排卵前 60~6 時間の子宮内膜厚直径実測値は 23.4 ± 0.3 mm (範囲 16.9~29.6 mm、図 5a) であり、排卵後 5~17 日は 17.2 ± 0.2 mm (範囲 13.4~22.8 mm、図 5a) であった。排卵前 60~6 時間の子宮内膜厚直径実測値は排卵後 5~17 日の子宮内膜厚直径実測値との間のすべての組み合わせにおいて、有意に厚かった ($P < 0.05$)。黄体期 (排卵後 5、7、9、11、13、15 および 17) の 1 日の子宮内膜厚直径実測値を子宮内膜厚標準化の基準に設定したところ、黄体期のいずれの日の実測値を基準としても子宮内膜厚変化率で示した発情周期中の子宮内膜厚の変化は同様であった。したがって、本章では、自然発情群および誘起発情群の両群において観察データが揃っている黄体期の 1 日 (排卵後 5、7 および 13 日目) で、子宮内膜厚が最も薄かった排卵後 13 日目 (16.8 ± 0.5 mm、範囲 13.4~18.7 mm、n = 9、図 5a) の子宮内膜厚直径実測値を基準値 (1.0) に設定し、すべての子宮内膜厚直径実測値を基準値に対する変化率に換算することで標準化した (図 5b)。なお、本章の研究に供した牛の左右子宮角から得られた子宮内膜厚直径実測値を左右間で比較したが、有意な差は認められなかった ($P = 0.92$)。

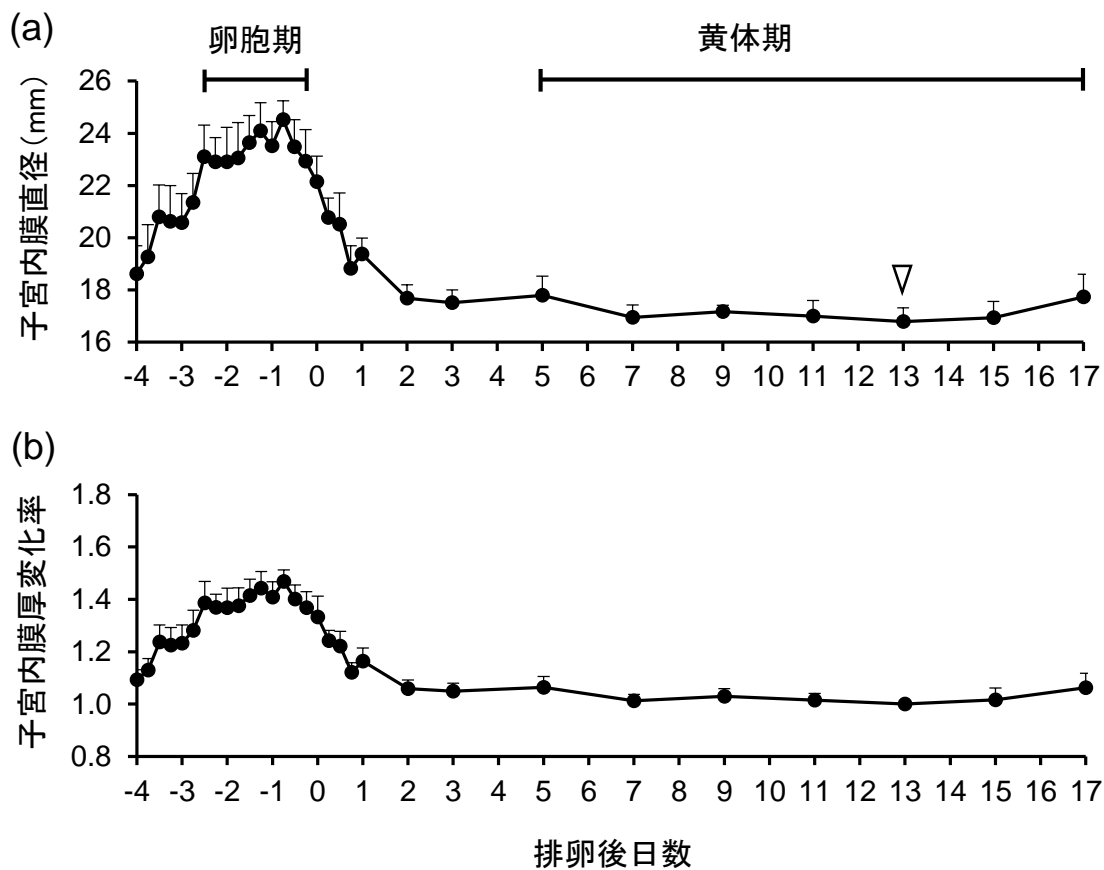


図 5. 実測値で示した子宮内膜厚変化(a)および標準化した子宮内膜厚変化(b)
 9頭の供試牛 (No. 1~9、表 1) の1回目の誘起発情から黄体期の子宮内膜厚直径測定値(a)を排卵後13日目の測定値(▽)を基準(1.0)としてすべての測定値を変化率(b)で示した(平均 ± 標準誤差)。排卵前60~6時間の子宮内膜厚は排卵後5~17日の子宮内膜厚との間のすべての組み合わせにおいて有意に厚かった ($P < 0.05$)。図は排卵日を0日とした。

2) 自然発情群における排卵前後の子宮内膜厚変化率および血中性ステロイドホルモン濃度の変化

自然発情群における排卵前後の子宮内膜厚変化率およびホルモン濃度の変化を図 6 に、それぞれの所要時間を表 4 に示した。

自然発情群では、排卵前 114 時間から子宮内膜厚が増加し始め、排卵前 96 時間でピークレベルに到達した。子宮内膜厚は 102 時間ピークレベルを持続した後、排卵前 6 時間より減少し始めた。6 時間間隔の超音波検査を行った排卵後 24 時間までに自然発情群の子宮内膜厚は基底レベルに戻らなかった。子宮内膜厚の増加開始以前に、 P_4 濃度の低下開始（排卵前 138 時間）および E_2 濃度の上昇開始（排卵前 132 時間）が認められた。 P_4 濃度は排卵前 66 時間に基底レベルに到達した。 E_2 濃度は排卵前 54 時間でピークレベルに到達し、24 時間ピークレベルを持続した後、排卵前 30 時間より低下し始め、排卵後 6 時間までに基底レベルに到達した。自然発情群における変化は、 P_4 濃度の低下開始（排卵前 138 時間）、次いで子宮内膜厚が増加開始（排卵前 114 時間）、という順序で起きた。また、 P_4 濃度の低下開始（排卵前 138 時間）から、子宮内膜厚のピークレベル到達（排卵前 96 時間）までの所要時間は 42 時間であった。

3) 誘起発情群における排卵前後の子宮内膜厚変化率および血中性ステロイドホルモン濃度の変化

誘起発情群における排卵前後の子宮内膜厚変化率およびホルモン濃度の変化を図 7 に、それぞれの所要時間を表 5 に示した。排卵前後で示した誘起発情群の場合、子宮内膜厚および P_4 濃度は排卵前 144 時間にそれぞれ増加および低下し始め、 E_2 濃度は排卵前 102 時間に増加し始めた。子宮内膜厚は排卵前 66 時間でピークレベルに到達し、ピークレベルを 54 時間持続し

た後、排卵前 12 時間より減少し始め、排卵後 48 時間までに基底レベルに戻った。 P_4 濃度は排卵前 78 時間に基底レベルに到達した。 E_2 濃度は排卵前 48 時間でピークレベルに到達し、18 時間ピークレベルを維持した後、排卵前 30 時間より低下し始め、排卵前 6 時間までに基底レベルに到達した。排卵前後で示した誘起発情群における変化では、 P_4 濃度の低下開始時（排卵前 144 時間）に子宮内膜厚が増加開始した（排卵前 144 時間）。また、 P_4 濃度が基底レベルに到達した（排卵前 78 時間）後に子宮内膜厚がピークレベルに到達した（排卵前 66 時間）。

4) 誘起発情群における $PGF_{2\alpha}$ 処置前後の子宮内膜厚変化率および血中中性ステロイドホルモン濃度の変化

誘起発情群における $PGF_{2\alpha}$ 処置前後の子宮内膜厚変化率およびホルモン濃度の変化を図 8 に、それぞれの所要時間を表 6 に示した。 $PGF_{2\alpha}$ 処置前後で示した誘起発情群の子宮内膜厚、 P_4 および E_2 濃度はいずれも $PGF_{2\alpha}$ 処置後直ちに（処置後 6 時間）それぞれ増加、低下および上昇し始めた。子宮内膜厚は増加し始めてから 18 時間後、すなわち $PGF_{2\alpha}$ 処置後 24 時間でピークレベルに到達した。その後、102 時間ピークレベルを維持し、 $PGF_{2\alpha}$ 処置後 126 時間より減少し始めたが、処置後 168 時間までに基底レベルに戻らなかった。 P_4 濃度は低下し始めてから 12 時間後、すなわち $PGF_{2\alpha}$ 処置後 18 時間で基底レベルに到達した。 E_2 濃度は上昇開始と同時に、すなわち $PGF_{2\alpha}$ 処置後 6 時間でピークレベルに到達し、84 時間ピークレベルを維持した後、処置後 90 時間より低下し始めたが、処置後 168 時間までに基底レベルに到達しなかった。 $PGF_{2\alpha}$ 処置前後で示した誘起発情群における変化では、 P_4 濃度の低下開始時（ $PGF_{2\alpha}$ 処置後 6 時間）に子宮内膜厚が増加開始した（ $PGF_{2\alpha}$ 処置後 6 時間）。また、 P_4 濃度が基底レベルに到達した（ $PGF_{2\alpha}$

処置後 18 時間) 後に子宮内膜厚がピークレベルに到達し (PGF_{2α} 処置後 24 時間)、P₄ 濃度の低下開始 (PGF_{2α} 処置後 6 時間) から子宮内膜厚のピークレベル到達 (PGF_{2α} 処置後 24 時間) までの所要時間は 18 時間であった。

5) 自然発情群および誘起発情群における子宮内膜厚変化率と血中性ステロイドホルモン濃度変化の比較

自然発情群および誘起発情群において、6 時間間隔で行った超音波検査により得られた子宮内膜厚変化率を排卵前 156 時間から排卵後 24 時間の期間で 2 群間比較した (図 9)。誘起発情群の子宮内膜厚は排卵前 60、54、36、30、18 および 12 時間において自然発情群よりも有意に厚かった ($P < 0.05$)。子宮内膜厚変化率の最高値は自然発情群で 1.38、誘起発情群で 1.61 であった (表 7)。P₄ 濃度、E₂ 濃度、E/P 比は、自然発情群および誘起発情群とも同様の推移を示し、2 群間で差は認められなかった。

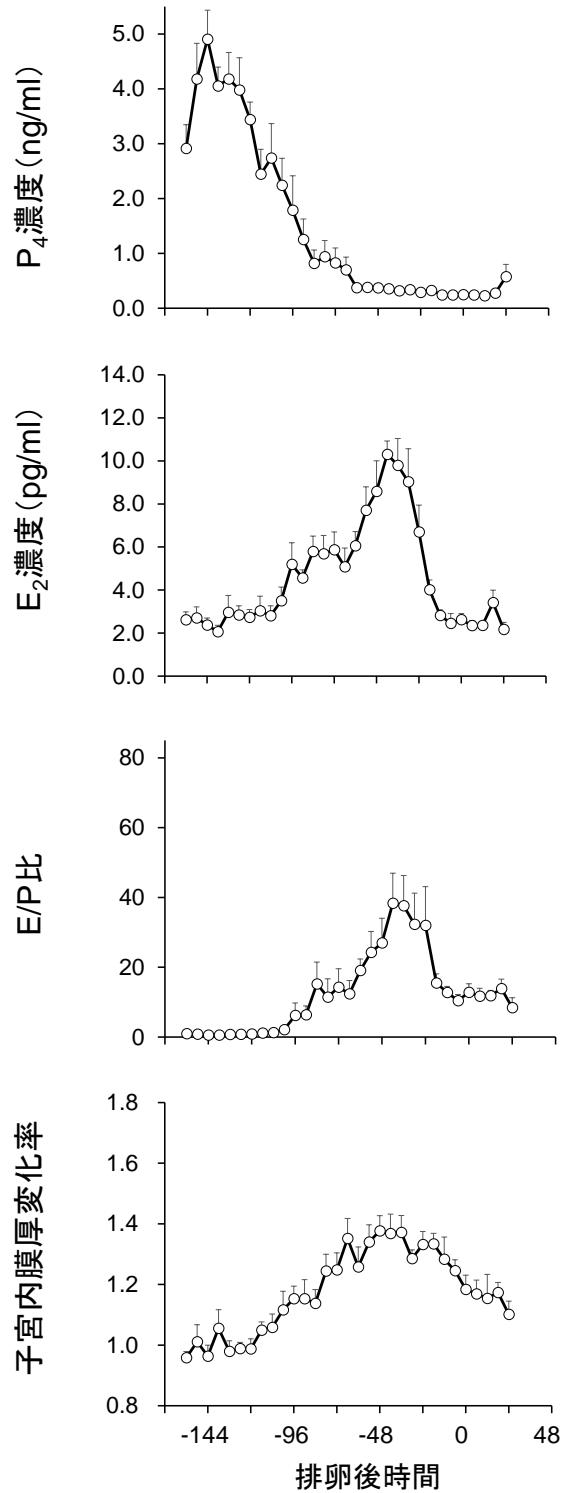


図 6. 自然発情における排卵前後の子宮内膜厚変化率、プロジェステロン(P₄)およびエストラジオール(E₂)濃度の変化

排卵を0時間としたときの自然発情群(○、n = 9)のグラフを示した(平均 ± 標準誤差)。子宮内膜厚は排卵後13日目の測定値に対する変化率で示した。

表 4

自然発情群における排卵前後の子宮内膜厚変化率およびホルモン濃度の変化の所要時間

評価項目	自然発情		
	子宮内膜厚	P ₄	E ₂
増加(上昇)または減少(低下)開始から排卵まで	114	138	132
PGF _{2α} 投与から増加(上昇)または減少(低下)開始まで	-	-	-
ピークレベルまたは基底レベル到達から排卵まで	96	66	54
増加(上昇)または減少(低下)開始からピークレベルまたは基底レベル到達まで	18	72	78
ピークレベル到達から減少(低下)開始まで (= ピークレベル持続期間)	102	-	24
減少(低下)開始から基底レベル到達まで	42	-	36
排卵から基底レベル到達まで	48	-	6

自然発情群における排卵を 0 時間とした場合の子宮内膜厚変化率、プロゲステロン (P₄) およびエストラジオール (E₂) 濃度の変化 (図 6) を解析し、上記評価項目の所要時間を示した。同一群内のデータ比較には Tukey- Kramer 多重比較検定を用いたが、その解析結果の解釈については図 4 を参照。

P₄ 濃度の低下開始 (排卵前 138 時間) から子宮内膜厚のピークレベル到達 (排卵前 96 時間) までの所要時間は 42 時間であった。

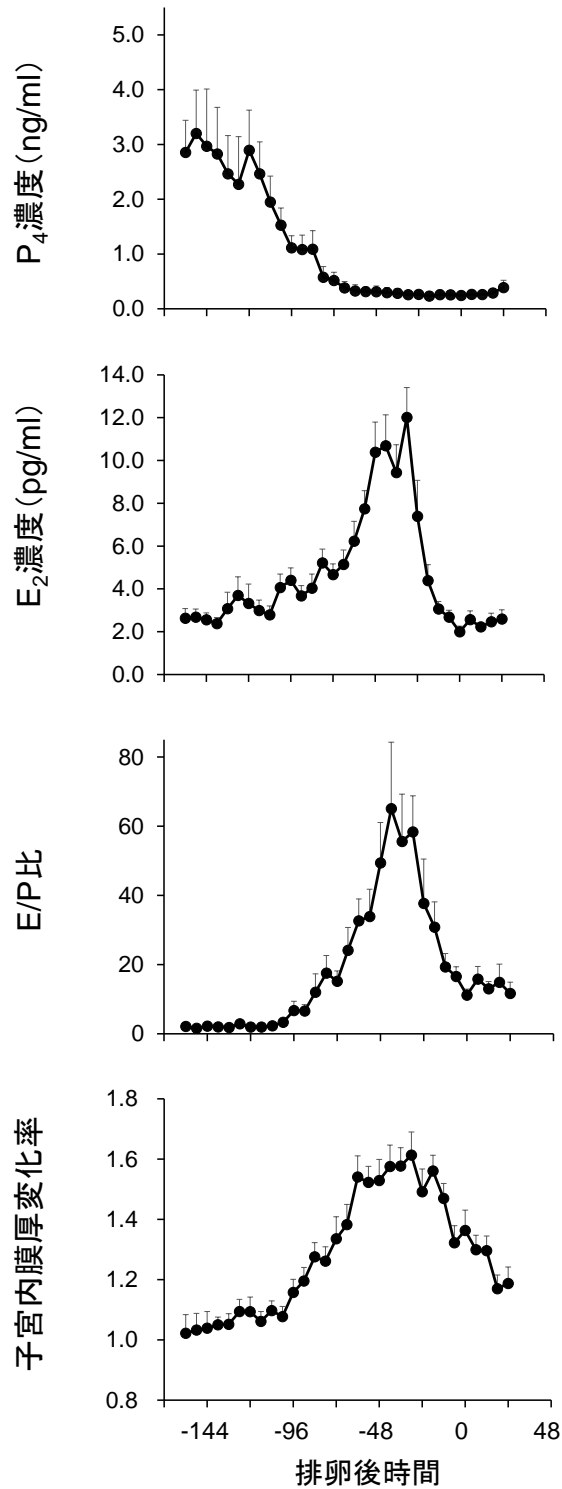


図 7. 誘起発情における排卵前後の子宮内膜厚変化率、プロジェステロン(P₄) およびエストラジオール(E₂)濃度の変化 - 排卵基準

排卵を0時間とした場合の誘起発情群(●、n = 11)のグラフを示した(平均 ± 標準誤差)。子宮内膜厚は排卵後13日目の測定値に対する変化率で示した。

表 5

誘起発情群における排卵前後の子宮内膜厚変化率およびホルモン濃度の変化の所要時間

評価項目	誘起発情(排卵前後)		
	子宮内膜厚	P ₄	E ₂
増加(上昇)または減少(低下)開始から排卵まで	144	144	102
PGF _{2α} 投与から増加(上昇)または減少(低下)開始まで*	-	-	-
ピークレベルまたは基底レベル到達から排卵まで	66	78	48
増加(上昇)または減少(低下)開始からピークレベルまたは基底レベル到達まで	78	66	54
ピークレベル到達から減少(低下)開始まで (= ピークレベル持続期間)	54	-	18
減少(低下)開始から基底レベル到達まで	60	-	18
排卵から基底レベル到達まで	48	-	-6

*排卵時間を基準(0時間)とするとプロスタグランジン(PG) F_{2α}処置時間は揃わなくなるため、値算出は不能であった。

誘起発情群における排卵を 0 時間とした場合の子宮内膜厚変化率、プロジェステロン(P₄)およびエストラジオール(E₂)濃度の変化(図 7)を解析し、上記評価項目の所要時間を示した。同一群内のデータ比較には Tukey- Kramer 多重比較検定を用いたが、その解析結果の解釈については図 4 を参照。

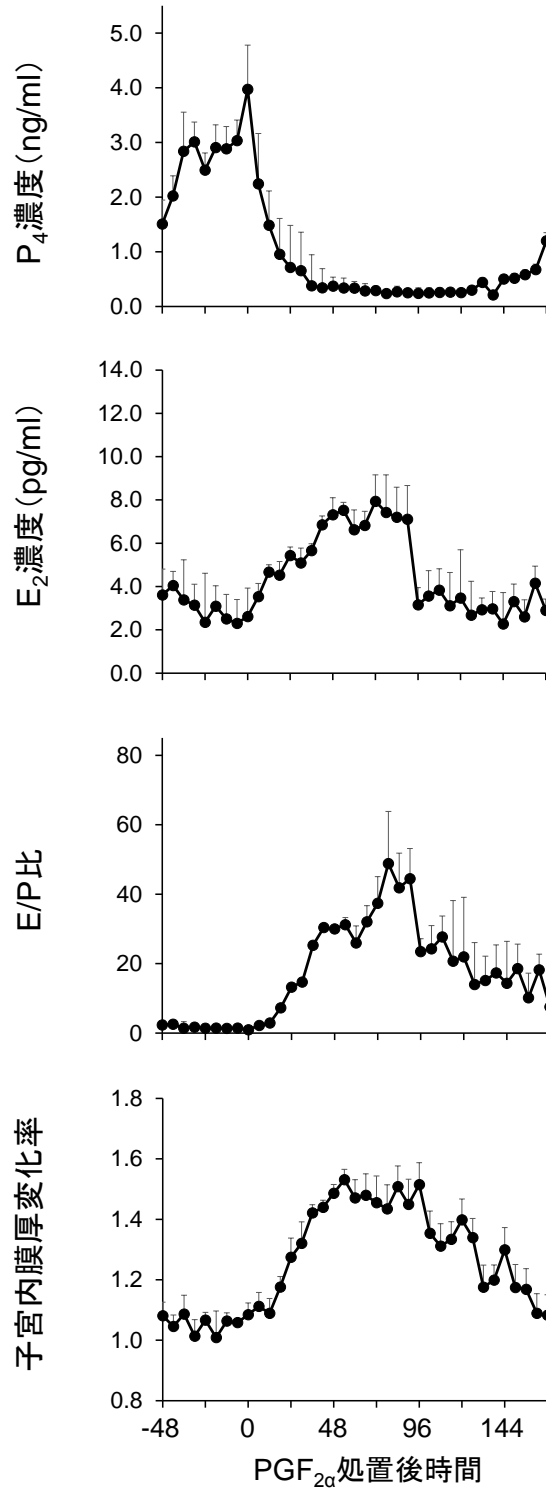


図 8. 誘起発情におけるプロスタグランジン (PG) F_{2α} 処置前後の子宮内膜厚変化率、プロゲステロン (P₄) およびエストラジオール (E₂) 濃度の変化

PGF_{2α} 処置時を0時間とした場合の誘起発情群 (●、n = 11) のグラフを示した (平均 ± 標準誤差)。子宮内膜厚は排卵後13日目の測定値に対する変化率で示した。

表 6

誘起発情群における PGF_{2α} 処置前後の子宮内膜厚変化率およびホルモン濃度の変化の所要時間

評価項目	誘起発情群 (PGF _{2α} 処置前後)		
	子宮内膜厚	P ₄	E ₂
増加(上昇)または減少(低下)開始から排卵まで*	-	-	-
PGF _{2α} 投与から増加(上昇)または減少(低下)開始まで	6	6	6
ピークレベルまたは基底レベル到達から排卵まで*	-	-	-
増加(上昇)または減少(低下)開始からピークレベルまたは基底レベル到達まで	18	12	0
ピークレベル到達から減少(低下)開始まで (= ピークレベル持続期間)	102	-	84
減少(低下)開始から基底レベル到達まで	-	-	-
排卵から基底レベル到達まで*	-	-	-

*プロスタグランジン (PG) F_{2α} 処置を基準 (0 時間) とすると排卵時間は揃わなくなるため、値算出は不能であった。

誘起発情群における PGF_{2α} 処置時を 0 時間とした場合の子宮内膜厚変化率、プロジェステロン (P₄) およびエストラジオール (E₂) 濃度の変化 (図 8) を解析し、上記評価項目の所要時間を示した。同一群内のデータ比較には Tukey- Kramer 多重比較検定を用いたが、その解析結果の解釈については図 4 を参照。

子宮内膜厚変化率は PGF_{2α} 処置後 6 時間で増加し始め、その 18 時間後にピークレベルに到達した。すなわち、子宮内膜厚は PGF_{2α} 処置後 24 時間でピークレベルに達した。したがって、P₄ 濃度の低下開始 (PGF_{2α} 処置後 6 時間) から子宮内膜厚のピークレベル到達 (PGF_{2α} 処置後 24 時間) までの所要時間は 18 時間であった。

E₂ 濃度は PGF_{2α} 処置後 6 時間で上昇開始と同時にピークレベルに到達した。

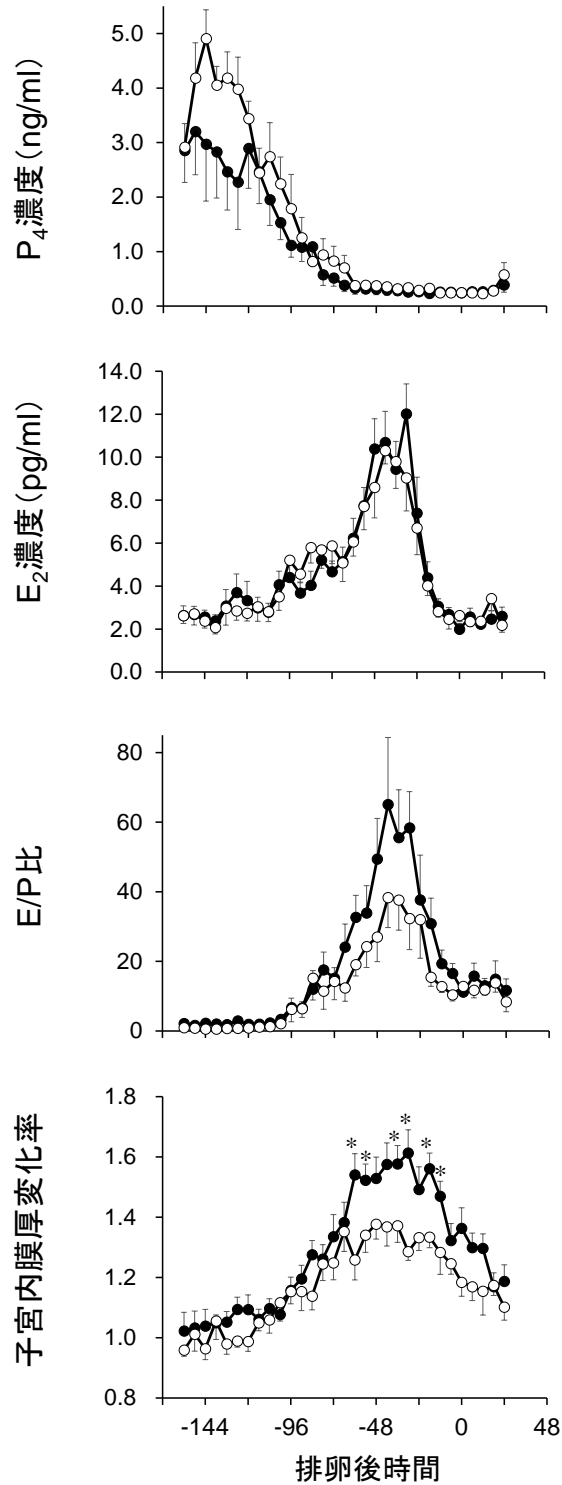


図 9. 自然発情および誘起発情における排卵前後の子宮内膜厚変化率、プロゲステロン(P₄)およびエストラジオール(E₂)濃度の変化

排卵を0時間とした場合の自然発情群(○、n = 9)と誘起発情群(●、n = 11)をそれぞれ比較した(平均 ± 標準誤差)。子宮内膜厚は排卵後13日目の測定値に対する変化率で示した。

* 同時間の2群間に有意差あり (P < 0.05)。

表 7
子宮内膜厚変化率のピークおよびピークレベルの比較

評価項目	自然発情群	誘起発情群	
	排卵前後	排卵前後	PGF _{2α} 処置前後
ピーク(最高値)*	1.38	1.61	1.53
ピーク到達時間	排卵前 48 時間	排卵前 30 時間	PGF _{2α} 処置後 54 時間
ピークレベル期間の平均値*	1.27	1.53	1.42
ピークレベル持続期間	排卵前 96～ 排卵後 6 時間	排卵前 66～12 時間	PGF _{2α} 処置後 24～126 時間
参照図	図 6	図 7	図 8

*子宮内膜厚変化率の値

自然発情(排卵を 0 時間)および誘起発情(排卵または PGF_{2α} 処置を 0 時間)における子宮内膜厚変化率のピークおよびピークレベルを比較した。同一群内のデータ比較には Tukey- Kramer 多重比較検定を用いたが、その解析結果の解釈については図 4 を参照。

4. 考察

本章では産次数や分娩後日数の異なる牛（表 1）を供試したが、子宮内膜厚には個体差があるため[75]、発情周期における子宮内膜厚の変化を比較するには子宮内膜厚の実測値を補正する必要があった。未経産牛を供試する場合は子宮の大きさによる個体差が小さく、比較しやすいという利点があるが[56]、経産牛を供試する場合には子宮内膜厚を客観的に評価する手法を確立するための試験も必要となる[75]。本章においては、すべての子宮内膜厚測定値を黄体期である排卵後 13 日目の測定値に対する変化の割合に換算し（図 5b）、子宮内膜厚変化率として比較解析した。この子宮内膜厚の標準化手法により、子宮内膜厚の個体差が補正され、発情周期中の子宮内膜厚の変化を比較することが可能となった。黄体期の 1 日の子宮内膜厚測定値を基準値に設定することは、子宮内膜浮腫の影響が小さいこと、子宮内容物（粘液）がないこと、子宮収縮の影響が少ないこと[10]などの要因で最も誤差範囲が小さく、卵胞期の子宮内膜厚の増加の程度を比較評価しやすい利点がある。本章では排卵後 13 日目の子宮内膜厚測定値を基準値として設定したが、黄体期（排卵後 5、7、9、11、13、15 および 17）のいずれの日の測定値を基準とした場合でも、子宮内膜厚変化率で示した子宮内膜厚の変化は同様の結果であった。したがって、子宮内膜厚の標準化の基準値は排卵後 13 日目に限定されず、黄体期（排卵後 5～17 日目）のいずれかの日の測定値を基準値に設定することが適していると判断された。

卵胞期における 6 時間間隔の超音波検査で子宮内膜厚を検査した時、各検査間での子宮内膜厚の変動が大きく、子宮内膜厚の測定値が波状の推移を示す場合が散見された。子宮内膜厚が波状の推移を示した理由として、子宮収縮や直腸の収縮が挙げられる。直腸検査や超音波診断装置のプロープによる

刺激は子宮収縮や直腸の収縮を促進する可能性がある。しかし、超音波検査動画を録画したビデオの解析により、超音波検査中の子宮収縮時に子宮角横断面が変形しても、子宮内膜厚の変動はわずかであったことが確認された。したがって、超音波検査時の刺激により生じた子宮収縮は、子宮内膜厚に大きく影響したとは考えられなかった。本章の子宮内膜厚の測定値は、子宮角横断面の子宮内膜領域の長径および短径の平均を算出し、子宮内腔領域を有する場合には子宮内膜領域と同様の方法で算出して子宮内膜厚測定値から減じていたため、子宮内膜が変形しても誤差範囲の小さい一定の値を得られたと考えられた。この子宮内膜厚の測定方法に加え、超音波検査中の子宮操作に細心の注意を払ったことも子宮収縮を誘引する刺激が抑えられ、子宮内膜厚測定値に対する影響を最小限に抑えることができた要因であると推察された。本章の研究における超音波検査部位は、検査毎の測定の再現性を高めるために子宮の角間膜付着部位とした[68]。しかしながら、毎回の検査で常に子宮角の全く同じ位置および横断面描出角度で超音波診断装置のプローブを当てることは困難である。超音波検査時の検査部位、プローブの角度の違いは描出される超音波画像中の子宮内膜の大きさや形状に影響するため、卵胞期における6時間間隔の超音波検査において子宮内膜厚の波状の推移を生じた可能性が考えられた。

本章において、9頭の供試牛（No. 1～9）の卵胞期（排卵前60～6時間、図5a）の子宮内膜厚は黄体期（排卵後5～17日目、図5a）に比べて有意に厚かった（ $P < 0.05$ ）。これらの結果は、牛子宮内膜厚は発情周期に応じて変化したとする過去の報告[18, 56, 57, 75]に対し、発情周期内におけるより詳細な変化を示すことができた。また、子宮内膜厚は排卵前3～4日頃に増加し始め[18, 56, 57, 75]、排卵後1～3日頃に減少した[18, 34, 56, 75]という報告とも類似していた。牛子宮内膜厚は卵胞期と黄体期で周期的変化を繰り返す。

返し、 E_2 濃度が上昇する卵胞期の子宮内膜厚が黄体期よりも有意に増加したことから、子宮内膜厚の増加には性ステロイドホルモン、特に E_2 が関与することが推測された。

本章では、子宮内膜厚とその調節に関与する性ステロイドホルモン (P_4 および E_2) の変化を解明するために 6 時間間隔の超音波検査および採血により子宮内膜厚およびホルモン濃度を測定した。これまでの研究報告では、性ステロイドホルモンは発情周期中の子宮内膜の機能や形態の変化を調節する中心的な役割を果たすことが示唆されてきた [10, 18, 31, 56, 57]。 E_2 濃度と子宮内膜厚の関係は人 [5, 39, 83]、ラット [85]、羊 [60] において報告されているが牛に関する報告は少ない。Souza ら [75] の報告によれば、 E_2 に加えて牛子宮内膜厚の変化には P_4 濃度が重要であることが示唆されており、排卵前後の P_4 濃度が高い場合 (≥ 0.5 ng/ml) は子宮内膜厚が薄くなり (≤ 8 mm)、逆に P_4 濃度が低い場合 (< 0.5 ng/ml) には子宮内膜厚が厚くなる (> 8 mm) という結果が示されている。本章の研究結果より、自然発情群において、 P_4 濃度が低下し始めた (排卵前 138 時間、表 4、図 6) 後に子宮内膜厚が増加し始めた (排卵前 114 時間) こと、また、誘起発情群において、 P_4 濃度が低下した時 (排卵前 144 時間、表 5、図 7 または $PGF_{2\alpha}$ 処置後 6 時間、表 6、図 8) に子宮内膜厚が増加し始め、 P_4 濃度が基底レベルに到達した (排卵前 78 時間または $PGF_{2\alpha}$ 処置後 18 時間) 後に子宮内膜厚がピークレベルに到達した (排卵前 66 時間または $PGF_{2\alpha}$ 処置後 24 時間) ことから、 P_4 濃度低下は子宮内膜厚の増加開始に関与していると考えられた。一方で、自然発情群、誘起発情群ともに子宮内膜厚の変化は E_2 濃度および E/P 比の変化と相似していた (図 6~8)。 P_4 濃度が低値で推移する卵胞期の E/P 比は E_2 濃度を反映しやすく、すなわち、 E_2 濃度が卵胞期の子宮内膜厚に対する増加促進や維持といった役割を果たしていることが推察された。しかしながら、自然

発情群では E_2 濃度がピークレベルに到達する（排卵前 54 時間）よりも早い段階で子宮内膜厚がピークレベルに達した（排卵前 96 時間）ことから、ピークレベル到達前の E_2 濃度でも子宮内膜厚増加促進には十分である可能性が示唆された。子宮内膜厚変化率、 P_4 および E_2 濃度の変化を解析した本章のこれら結果より、 P_4 濃度の低下は子宮内膜厚増加開始の役割があり、 E_2 濃度は子宮内膜厚の増加を促進する役割を果たしている可能性が示唆された。しかしながら、子宮内膜厚の変化に最も重要な因子は P_4 濃度および E_2 濃度のいずれであるのか、あるいは P_4 濃度と E_2 濃度のバランス（ E/P 比）が子宮内膜厚に影響するのか、本章の結果から明確にすることはできなかった。

これまでに、未経産牛の自然発情周期における子宮体部の子宮壁（子宮漿膜面から子宮内腔）の厚さを観察した研究[56]、あるいは経産牛の誘起発情における人工授精前後の子宮角の子宮内膜厚に関する研究が報告されている[75]。これらの研究報告ではそれぞれ使用された供試動物の条件、あるいは子宮の超音波検査部位や測定方法が異なり、直接比較することが困難であった。そこで、本章の研究では、乳牛の自然発情と誘起発情における子宮内膜厚、 P_4 および E_2 濃度の変化を直接比較検討した。その結果、自然発情群では P_4 濃度が低下し始め（排卵前 138 時間）、子宮内膜厚が増加してピークレベル到達（排卵前 96 時間）までの所要時間は 42 時間であり（表 4、図 6）、誘起発情群では $PGF_{2\alpha}$ を用いて発情誘起処置後に P_4 濃度が低下し始め（ $PGF_{2\alpha}$ 処置後 6 時間）、子宮内膜厚が増加してピークレベル到達（ $PGF_{2\alpha}$ 処置後 24 時間）までの所要時間は 18 時間であった（表 6、図 8）。また、誘起発情群の子宮内膜厚は排卵前 60、54、36、30、18 および 12 時間において自然発情群よりも有意に厚く（図 9）、子宮内膜厚変化率の最高値は自然発情群で 1.38、誘起発情群で 1.61（排卵基準）および 1.54（ $PGF_{2\alpha}$ 処置基準）

であった（表 7、図 9）。これらの結果は、誘起発情群の子宮内膜厚は自然発情群に比べて短時間で有意に厚くなることを示唆している。黄体退行を誘起してから 24 時間以内に子宮内膜厚が最も厚くなったという報告[75]と、自然発情において排卵の 3～4 日前に子宮内膜厚が増加し始めて排卵の 1 日前に最も厚くなったという報告[56]も合わせて考慮し、乳牛の誘起発情では自然発情と比較して、PGF_{2α} 処置後に子宮内膜厚が急速かつ有意に増加すると考えられた。

一般的に、発情誘起（PGF_{2α} 処置）時の黄体や卵胞などの卵巣構造物の大きさが同様の状態の牛群の場合、処置から排卵までの所要時間の誤差範囲が小さくなり、黄体退行処置の効果が集約される。本章の誘起発情群は機能性黄体を有し、主席卵胞に成長すると予測される大卵胞（≥ 10 mm）の存在下（排卵後 6～7 日目または 14 日目）で PGF_{2α} を投与された。その結果、誘起発情群における P₄ 濃度の低下、E₂ 濃度の上昇および子宮内膜厚の増加の開始は同時（PGF_{2α} 処置後 6 時間、表 2）に起こり、このことが自然発情群に比べて子宮内膜厚が短時間で有意に厚くなったことにつながったと考えられた。子宮内膜厚が排卵前 66 時間にピークレベルに達し、E₂ 濃度が排卵前 54 時間でピークレベルに到達した自然発情群の場合とは逆に、誘起発情群における E₂ 濃度は PGF_{2α} 処置後 12 時間でピークレベルに達し、処置後 24 時間でピークレベルに達した子宮内膜厚よりも 12 時間早い変化を遂げた。誘起発情群における P₄ および E₂ 濃度が PGF_{2α} 処置後同時に変化し始め、かつ急速に変化したことが相乗効果となり、自然発情群よりも有意な子宮内膜厚増加につながった可能性が考えられた。P₄ および E₂ の作用を解明することは、誘起発情における急速、かつ自然発情時よりも有意な子宮内膜厚増加の過程を明らかにすることができると考えられる。

子宮内膜厚の調節に関わる P₄ および E₂ の作用を解明するためには、血管

透過性や血管新生の調節効果をもたらす血管内皮細胞成長因子（VEGF）のような、子宮内膜に浮腫を誘引する生理学的機序を検査する必要がある。これまでに、齧歯類[17, 63, 72]や人[14]において、エストロジェンが血管透過性亢進因子である VEGF を増加させることによって子宮内膜に浮腫を誘引することが報告されてきた。E₂ はさらに子宮内膜の毛細血管量の増加に関係していることが羊[35, 60]および牛[21]で報告されている。牛の子宮内膜においても、VEGF mRNA の発現は発情時に、VEGF 蛋白の発現は黄体期初期に最も高かったと報告されており[77]、E₂ と VEGF との関連が示唆されている。齧歯類の子宮[17]、サルの子宮内膜[26]、および人の子宮内膜間質細胞[70]において、プロゲステロンも VEGF の発現を調節していることが報告されている。しかしながら、プロゲステロンの子宮内膜に対する浮腫、血管透過性、血管新生などの作用の強度はエストロジェンに比べて小さく、作用発現も緩徐である[17, 32]。P₄ および E₂ に関与し、子宮内膜浮腫を起こすと推測される牛子宮内膜の VEGF や種々の関連分子の生理的機序を分析することは、P₄ および E₂ の子宮内膜厚調節の作用機序を解明することにつながると考えられる。したがって、今後は牛の黄体退行期から排卵までの間の子宮内膜厚および性ステロイドホルモンの変化に加えて、子宮内膜浮腫を起こす因子を解析する必要がある。

5. 小括

自然発情および誘起発情における牛子宮内膜厚の周期的変化とそれに関わるプロジェステロン (P_4) およびエストラジオール (E_2) の変化を解明するため、超音波検査とホルモン測定を行った。ホルスタイン種経産牛 15 頭を供試し、いずれの供試牛も 1 回目の発情を誘起し、2 回目の発情は自然または誘起発情とし、自然発情群と誘起発情群に分けた。子宮内膜の測定部位は左右子宮角の角間間膜付着部とし、子宮内膜領域の長径および短径の平均値を算出し、さらに左右で平均した値を子宮内膜厚とした。

すべての子宮内膜厚測定値は排卵後 13 日目の測定値に対する変化率に換算することによって、個体差を補正することが可能であった。自然発情群では、 P_4 濃度の低下開始、 E_2 濃度の上昇開始、次いで子宮内膜厚の増加が認められた。誘起発情群で排卵を 0 時間とした場合、 P_4 濃度の低下および子宮内膜厚の増加は同時に開始し、次いで E_2 濃度が上昇したが、プロスタグランジン (PG) $F_{2\alpha}$ 処置を 0 時間とした場合、 P_4 濃度の低下、 E_2 濃度の上昇、子宮内膜厚の増加の開始は $PGF_{2\alpha}$ 処置後 6 時間で同時に起こった。

これらの結果より、 P_4 濃度の低下が子宮内膜厚増加開始の役割を果たし、 E_2 濃度の上昇は子宮内膜厚増加を促進することが示唆された。一方で、誘起発情群の子宮内膜厚は、排卵前 60~12 時間の間で自然発情群よりも有意に厚くなった ($P < 0.05$)。これは、誘起発情群の P_4 および E_2 濃度が $PGF_{2\alpha}$ 処置後同時かつ急速に変化したことが影響したと考えられた。牛子宮内膜厚を調節する P_4 および E_2 の作用機序を解明するためには、子宮内膜厚増加の主因である浮腫に関与し、ステロイドホルモンの影響を受ける生理学的因子の検討も必要である。

第Ⅱ章 乳牛の子宮内膜厚に対するプロジェステロンおよびエストラジオールの作用機序の解明

1. 序文

第Ⅰ章において、乳牛の子宮内膜厚は血中の性ステロイドホルモン濃度の影響を受けて発情周期中に変化し、誘起発情における子宮内膜厚の変化率は自然発情と比較して有意に高いことが明らかとなった。また、卵胞期にプロジェステロン (P_4) 濃度が低下し、エストラジオール (E_2) 濃度の上昇に伴って子宮内膜厚が増加する一連の変化より、 P_4 濃度の低下は子宮内膜厚増加開始に関係して作用し、 E_2 濃度は子宮内膜厚の増加を促進する役割を果たしている可能性が示唆された。脱落膜を形成する齧歯類や霊長類では P_4 および E_2 は共に子宮内膜厚の増加に作用するとされている [17, 70]。齧歯類および霊長類において、 P_4 および E_2 は血管内皮細胞成長因子 (VEGF) を増加させ (ただし、 P_4 の作用は E_2 ほど急速で強くはない)、VEGF が血管内皮細胞膜上の VEGF 受容体に結合することによって血管内皮細胞を活性化する。活性化した血管内皮細胞はタンパク分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を分泌し、血管基底膜や間質細胞成分を分解する。その結果、血管透過性が亢進して子宮内膜に浮腫が生じると同時に、血管内皮細胞が遊走・増殖して血管新生が生じ、子宮内膜の増殖に作用する。一方で、脱落膜を形成しない牛では子宮内膜厚に対する P_4 および E_2 の作用は齧歯類や霊長類とは異なる可能性があるが、その作用機序は明らかにされていない。牛子宮内膜における VEGF mRNA 発現は、黄体期に比べて発情期に有意に高かったことから [77]、卵胞期に低 P_4 濃度環境下で E_2 濃度が上昇し、牛子宮内膜に浮腫が生じてその厚さが増加する機序にも、VEGF が関与

しているものと予測される。VEGF は 7 つのファミリー（VEGF-A～E、胎盤増殖因子;PlGF-1～2）からなり、VEGF 受容体は VEGF 受容体 1～3 まで確認されている（表 8）[69]。

表 8
VEGF 受容体と VEGF ファミリー

受容体	リガンドとなる VEGF ファミリー	主な作用
VEGF 受容体 1	VEGF-A* VEGF-B PlGF-1 PlGF-2	・血管発生および新生誘導 ・単球走化性誘導 ・胎盤調節
VEGF 受容体 2	VEGF-A* VEGF-C VEGF-D VEGF-E	・血管新生誘導 ・血管透過性亢進 ・VEGF-E により強い血管新生活性と血管透過性亢進活性
VEGF 受容体 3	VEGF-C VEGF-D	・胎生期の血管調節 ・リンパ管新生

*VEGF-A は VEGF 受容体 1 との親和性は高いが作用は弱く、VEGF 受容体 2 との親和性は低いが作用は強く発現する

VEGF-A および B は VEGF 受容体 1 に結合し、血管新生や単球走化性の促進に作用する。VEGF-A、C、D および E は VEGF 受容体 2 に結合し、血管新生や血管透過性亢進に作用する。VEGF-C および D は VEGF 受容体 3 にも結合し、リンパ管新生に関わる。これらのうち、VEGF-A は VEGF 受容体 1 および受容体 2 の双方に結合可能であり、VEGF-A のサブタイプの中でも VEGF₁₆₅ は生体内に最も多く存在することが知られている [20]。

VEGF₁₆₅ は胎生期の血管形成や齧歯類や霊長類の子宮内膜の増殖時に他のサブタイプよりも高度に、かつ強力な血管新生作用を発現する[8, 84]。一方、牛の生殖器における VEGF の発現は VEGF₁₆₅ についての研究報告が最も多く、一次卵胞から二次卵胞への成熟の促進[89]、黄体における脈管形成[9]、卵管の収縮などに関わることが報告されている[22, 81]。牛の非妊娠期の子宮内膜における VEGF₁₆₅ の発現も確認され、プロスタグランジン (PG) F_{2α} の産生調節に関わることが示唆されている[77]。

本章では、乳牛の子宮内膜厚の調節に関わる P₄ および E₂ の作用機序を明らかにすることを目的とし、まず黄体期における E₂ 処置により高 P₄ 濃度環境における高 E₂ 濃度環境を作出し、子宮内膜厚へ及ぼす影響を観察した。次に、卵巣摘出牛を作出し、外因性性ステロイドホルモン（無処置、P₄ 単独処置、P₄ および E₂ の併用処置、E₂ 単独処置）の子宮内膜厚に及ぼす影響を観察した。また、子宮内膜厚の変化に関与すると考えられる液性因子（VEGF₁₆₅）およびその受容体（VEGF 受容体 1、VEGF 受容体 2）あるいは性ステロイドホルモン受容体の発現量を定量することによって、性ステロイドホルモンによる子宮内膜厚調節機序を検討した。

2. 材料および方法

1) 供試動物

本章は酪農学園大学動物実験指針に基づいて適正に実施された（承認番号：VH16C9）。酪農学園大学動物医療センター実習棟の非搾乳牛 10 頭（初産牛 4 頭、2 産以上の牛 6 頭、表 9）を供試した。供試牛は繋牛舎で飼養され、National Research Council（NRC、2001 年）に準拠した栄養要

求量を満たす分離給餌であった。本章の試験開始にあたり、供試牛に対し直腸検査、膣検査[82]、生殖器[66]および卵巢構造物[67]の超音波検査、子宮内膜細胞診[65]などの検査によって臨床的に正常で、生殖器に異常を認めない牛が選抜された。なお、本章の試験中に何らかの繁殖障害を呈した牛は供試から除外された。

表 9
第 II 章の研究における供試牛の使用内訳

産次数および試験区分	供試牛 No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
産次数	7	5	3	2	1	4	3	1	1	1
試験区分										
(1) 黄体期における E ₂ 処置										
EB 群	●	●	●	●	●	●				
対照群						●	●	●	●	●
(2) 無処置	●	●	●	●						
(3) P ₄ 単独処置	●	●	●	●						
(4) P ₄ + E ₂ 処置	●	●	●	●						
(5) E ₂ 単独処置	●	●	●	●						

No. 1~4 の供試牛は(1)黄体期における E₂ 処置試験後に卵巢摘出術を実施し、(2)以降の試験に供試した。

P₄: プロジェステロン、E₂: エストラジオール、EB: 安息香酸エストラジオール

2) 発情誘起と発情発見

すべての供試牛は、第 I 章 2. 材料と方法 2) 発情誘起と発情発見と同様に、膣内留置型プロジェステロン徐放剤 (CIDR1900、ゾエティス・ジャ

パン) と $\text{PGF}_{2\alpha}$ (ジノプロストトロメタミン、プロナルゴン F、ゾエティス・ジャパン) 25 mg を組み合わせたプログラムにより、発情を誘起された。検査実施時には毎回 2 名で 30 分間以上供試牛の発情行動を観察した。本章の研究は、フリーストール牛舎よりも発情発見が低下する繋牛舎にて飼養された牛を供試したため、透明で多量の牽糸性粘液の陰部からの漏出、咆哮、隣接牛への顎乗せ行動、乗駕行動などの発情行動の発見により発情と判断した。

3) 卵巣摘出手術

2 産以上の供試牛 6 頭のうち 4 頭 (No. 1~4、表 9) に左臍部切開による卵巣摘出手術を実施した。No. 1~4 の 4 頭の供試牛にはキシラジン (セラクタール 2% 注、バイエル薬品、東京) 0.1 mg/kg による鎮静処置下で全身麻酔薬としてペントバルビタール (ソムノペンチル、共立製薬、東京) 8 mg/kg を導入した。また、切開部は塩酸プロカイン (動物用塩プロ注、共立製薬) による局所麻酔を施した。卵巣摘出牛は 1 週間の回復期間を設け、その後実験に供試した。

4) 超音波検査による子宮内膜厚および卵巣構造物の評価

超音波検査診断装置の設定は第 I 章 2. 材料と方法 3) 超音波検査 (1) 機器の設定に準じた。超音波検査による子宮内膜厚および卵巣構造物の評価は、同 (2) 子宮内膜厚の評価および同 (3) 卵巣構造物の評価にそれぞれ準じた。排卵のタイミングは前章と同様に、排卵が確認された検査時とした。主席卵胞は直径 10 mm 以上、かつ次席卵胞との差が 2 mm 以上の卵胞とし [73]、すべての供試牛において最後に確認された発情徴候あるいは発情行動から 48 時間以内に主席卵胞の排卵が認められた。

5) 採血および血中性ステロイドホルモンの測定

採血および血漿中の性ステロイドホルモン (P_4 および E_2) 濃度の測定は第 I 章 2. 材料と方法 4) 採血および 5) ステロイドホルモンの測定に準じた。本章の研究の測定内および測定間変動は P_4 濃度測定においてそれぞれ 6.3% および 17.2%、 E_2 濃度の測定において 5.2% および 19.1% であった。

6) 子宮内膜組織の採取(子宮内膜バイオプシー)

子宮内膜組織の採取は、必要に応じて 2% リドカイン (キシロカイン 2% 注、アスペンジャパン K.K.、東京) による尾椎硬膜外麻酔処置下でバイオプシーガン (子宮内膜組織採取器澤向式、富士平工業、東京、図 10) を用いて実施した。子宮内膜組織の採取法として、まず、外陰部を清拭し、ビニールの鞘カバーを施した滅菌バイオプシーガンを腔内に挿入した。人工授精時の直腸腔法と同様に、直腸壁越しに子宮を触診し、腔内に挿入したバイオプシーガンの先端を外子宮口まで誘導した。外子宮口への挿入直前に、バイオプシーガンのビニール鞘カバーを破り、バイオプシーガンのみを子宮頸管から子宮体および子宮角内へと挿入した。その際には柔軟な子宮内膜を傷つけないよう細心の注意を払った。バイオプシーガンを子宮角分岐部から卵管接合部のおおよそ中間地点までゆっくりと挿入したところで、バイオプシーガンの内筒を 5 cm 程度引き抜き、子宮角内でバイオプシーガンの先端の採取溝 (15 × 4 mm、図 10e) を露出させた。直腸壁越しに子宮内膜組織をバイオプシーガンの採取溝へ押しつけ、引き抜いていた内筒を先端方向へスライドさせる (押し戻す) 要領で子宮内膜組織を切り取り採取した。子宮内膜組織は、子宮角内採取部の 12 時、3 時、9 時方向の 3 箇所の中から採取し、左右の子宮角で同様に行った。採取した子宮内膜組織は素早く計量した後すぐに RNA 安定溶液 (RNA レーター、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、

USA) に浸漬し、24 時間以上 4℃ 冷蔵保存した。その後、子宮内膜組織を再度計量し、新しいマイクロチューブに移して RNA の抽出まで -30℃ で冷凍保存した。



図 10. 子宮内膜バイオプシーガン（子宮内膜採取器）

- a. 組織押し出し棒（バイオプシーガン内の組織を取り出す際に使用）
- b. ビニール鞘カバー
- c. 内筒
- d. 外套
- e. 外套先端の組織採取溝（15 × 4 mm）
- f. 外套に内筒を挿入し、採取溝部分に子宮内膜組織を押し付け、内筒を先端方向へスライドさせることで子宮内膜組織を採取

7)リアルタイム PCR

本章の研究において採取した牛子宮内膜組織の total RNA の抽出には RNA 抽出キット (SV Total RNA Isolation System、Promega、Madison、WI、USA) を用い、分光光度計 (BioSpec-nano、島津製作所、京都) により定量した 1000 ng の total RNA を逆転写反応キット (ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix、東洋紡、大阪) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。作製した cDNA を鋳型に、リアルタイム PCR により子宮内膜組織中のプロジェステロン (P) 受容体、エストロジェン (E) 受容体 α 、E 受容体 β 、VEGF 受容体 1、VEGF 受容体 2、VEGF の mRNA 発現量を測定した。測定には THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (QPS-201、東洋紡) および LightCycler® 480 ver.2 (Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA) を用いた。反応液は一反応あたり qPCR-Mix 5 μ l、Forward Primer 1.5 μ l (3 pmol)、Reverse Primer 1.5 μ l (3 pmol)、cDNA 溶液 2 μ l (RNA 量として 20 ng) になるように調整し、合計液量は 10 μ l とした。増幅条件はキットの使用標準書に従い、P 受容体、E 受容体 α 、E 受容体 β 、VEGF 受容体 1、VEGF 受容体 2 については初期変性 (95°C 60 秒) の後、変性 (95°C 15 秒)、アニーリング (60°C 30 秒) および伸長反応 (72°C 45 秒) を 40 サイクル行った。VEGF については山田らの方法に従い[87]、初期変性 (90°C 60 秒) の後、変性 (95°C 15 秒)、アニーリング (55°C 15 秒) および伸長反応 (70°C 30 秒) を 40 サイクル行った。各遺伝子特異的プライマーの塩基配列および増幅条件を表 10 に示した。各種 mRNA の発現量は β actin の発現量を内部標準として補正し、比較 Ct (Threshold Cycle) 値法により mRNA の相対的発現量を比較した。各種 mRNA の発現量の算出方法は以下の通りである。

$$\text{発現量} = \text{定量対象の Ct} / \beta \text{ actin の Ct}$$

表10

各遺伝子のプライマー配列および増幅条件

遺伝子	プライマー名	配列5' -3'	GenBank Accession No.	PCR条件*	参考文献
β act in	bov ActB F 36-56	CGCCATGGATGATGATATTGC	AY141970.1	95°C-60秒 (95°C-15秒/60°C-30秒/72°C-45秒) × 40	[53]
	bov ActB R 85-101	AAGCCGGCCCTTGCACAT			
プロジェクトロン 受容体	bov PGR F 1719-1738	GGCAATGGAAGGACAGCATA	NM_001205356.1	95°C-60秒 (95°C-15秒/60°C-30秒/72°C-45秒) × 40	
	bov PGR R 1804-1823	CAGCACTTTCTAAGGGGACA			
エストロジェン 受容体 α	bov ESR1 F 1685-1704	CCTCTCTCACTTCAGGCACA	NM_001205356.1	95°C-60秒 (95°C-15秒/60°C-30秒/72°C-45秒) × 40	[53]
	bov ESR1 R 1764-1783	ATCTCCAGCAGCAGGTCGTA			
エストロジェン 受容体 β	bov ESR2 F 82-101	GGTCAATCCATCCTACCCCT	NM_174051.3	95°C-60秒 (95°C-15秒/60°C-30秒/72°C-45秒) × 40	[53]
	bov ESR2 R 326-345	TTCACGCCAAGGACTCTTTT			
VEGF受容体1	bov VEGFR1 F 141-160	GAAGGACGGGATGAGGATGC	X94263	95°C-60秒 (95°C-15秒/60°C-30秒/72°C-45秒) × 40	[74]
	bov VEGFR1 R 307-326	ATGGCGTTGAGCGGAATGTA			
VEGF受容体2	bov VEGFR2 F 21-40	TGGCCCAACAATCAGAGCAG	X94298.1	95°C-60秒 (95°C-15秒/60°C-30秒/72°C-45秒) × 40	[68, 74]
	bov VEGFR2 R 155-174	GAACGGAGCCCATGTCAGTG			
VEGF	bov VEGF F 548-567	GAACCTTCTGCTCTCTTGGG	M32976.1	90°C-60秒 (95°C-15秒/55°C-15秒/70°C-30秒) × 40	[84]
	bov VEGF R 868-887	CTGGCTTTGGTGAGGTTTGA			

* 上段: 初期変性条件

下段: (変性/アニーリング/伸長反応条件)

8) 試験プロトコール

(1) 高 P₄ 環境下(黄体期)における E₂ 処置

供試牛へのホルモン処置、子宮内膜バイオプシー、超音波検査および採血スケジュールを図 11 に示した。本章の 2. 材料と方法 2) 発情誘起と発情発見で述べた CIDR および PGF_{2α} を用いた方法にて、すべての供試牛 10 頭に発情を誘起し (のべ 11 回、表 9)、排卵を確認した。排卵を 0 日として、第 1 卵胞発育波における主席卵胞が決定する時期である排卵後 5~6 日目 (黄体期) の間に超音波検査で主席卵胞と黄体の存在を確認し、1 頭あたり安息香酸エストラジオール (EB; オバホルモン、あすか製薬、東京) 2 mg を 1 回投与した 6 頭 (図 11 上段) を EB 群とし、ホルモン剤を無処置のまま経過観察した 5 頭 (図 11 下段) を対照群とした。供試牛のうち 1 頭 (No. 6) は EB 群および対照群の両群に供試した (表 9)。子宮内膜バイオプシーは両群とも排卵後 3 日目に 1 回実施した。さらに、EB 群では排卵後 5~6 日目の EB 投与 12 時間後に 1 回、対照群では排卵後 5 日目に 1 回子宮内膜バイオプシーを実施した。なお、E₂ 製剤投与後の血中 E₂ 濃度は、投与量に関わらず、投与後 12 時間前後で最高濃度に達することが複数報告されているため [53, 74]、本章の研究において EB 投与後の子宮内膜バイオプシーは EB 投与 12 時間後に設定した。超音波検査および採血は両群とも PGF_{2α} 処置から排卵までは 12 時間間隔で行い、排卵から排卵後 9~10 日目までは 6 時間間隔で実施した。排卵後 9~10 日目に第 2 卵胞発育波の発現を確認した後、12 時間間隔で 2 回超音波検査および採血を実施した。子宮内膜バイオプシーにより採取した子宮内膜組織中の P 受容体、E 受容体 α、E 受容体 β、VEGF 受容体 1、VEGF 受容体 2、VEGF の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により測定した。

本章の研究のスケジュールとは別の期間において、本章の 2. 材料と方法

2) 発情誘起と発情発見で述べた CIDR および $\text{PGF}_{2\alpha}$ を用いた方法にて供試牛 ($n = 10$) に発情を誘起し、発情時 ($\text{PGF}_{2\alpha}$ 処置後 2~4 日、 $n = 9$) および黄体期 (排卵後 10 日目、 $n = 10$) に子宮内膜バイオプシーを実施した。採取した子宮内膜組織中の P 受容体、E 受容体 α 、E 受容体 β 、VEGF 受容体 1、VEGF 受容体 2、VEGF の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により測定し、本章の研究における発情期および黄体期の発現量として示した。

(2) 卵巣摘出牛に対する無処置での観察

供試牛 ($n = 4$ 、表 9) へのホルモン処置、子宮内膜バイオプシー、超音波検査および採血スケジュールを図 12 に示した。本章の 2. 材料と方法 3) 卵巣摘出術で述べた方法にて、4 頭の供試牛の両卵巣を摘出した。卵巣摘出手術日を 0 日として 1 週間の回復期を経て、術後 7~9 日の間に無処置で 6 時間間隔の超音波検査を 8 回実施した (図 12 上段)。その間、1 回子宮内膜バイオプシーを行った。

(3) 卵巣摘出牛への P_4 単独処置

P_4 単独の子宮内膜厚への効果を調査するため、 P_4 単独処置として CIDR のみを使用した (図 12 上段)。卵巣摘出術後 13 日目に CIDR を 2 本同時に腔内に挿入し、5 日間留置した。術後 18 日目に 2 本のうちの 1 本の CIDR を抜去した。翌日の術後 19 日目に残りの 1 本の CIDR を抜去した。超音波検査は CIDR 挿入の 12 時間前より開始し、12 時間間隔で術後 17 日目 (2 本中 1 本の CIDR 抜去 24 時間前、2 本目の CIDR 抜去 48 時間前) まで継続した。その後、6 時間間隔の超音波検査に切り替え、術後 21 日目 (2 本目の CIDR 抜去 48 時間後) まで継続した後、12 時間間隔の超音波検査を実施した。なお、この 12 時間間隔の超音波検査は次の試験区である P_4 および E_2 併用処置期間中まで継続した。子宮内膜バイオプシーは CIDR による 5 日間の P_4 感作後となる術後 18 日目 (1 本目の CIDR を抜去する直前)、術後 20

日目（2本目の CIDR 抜去の 24 時間後）および術後 22 日目（2本目の CIDR 抜去 72 時間後）に 1 回実施した。

(4) 卵巣摘出牛への P₄ および E₂ 併用処置

P₄ および E₂ による子宮内膜厚への効果を調査するため、P₄-E₂ 併用処置として CIDR と EB を使用した際の変化を観察した（図 12 中段）。卵巣摘出牛において CIDR により維持された P₄ 濃度は CIDR 抜去後 24 時間以内に低下し、P₄ の効力を失うと報告されているため[44]、前試験区の P₄ 単独処置の 2 本目の CIDR 抜去後 3 日間を空けてから本試験区である P₄-E₂ 併用処置を実施した。術後 22 日目に CIDR を 2 本同時に腔内に挿入して 5 日間留置し、術後 27 日目に 2 本のうちの 1 本の CIDR を抜去した。翌日の術後 28 日目に残りの 1 本の CIDR を抜去すると同時に、体重（BW）1 kg あたり EB 2 μg を投与した。EB は予め滅菌した植物油（コーン油、和光純薬、東京）を溶媒として 0.5 mg/ml になるよう調整したものをを用いた[51]。超音波検査は前試験区の P₄ 単独処置試験から継続しており、術後 21 日目（CIDR 挿入の 24 時間前）より 12 時間間隔の超音波検査を開始し、術後 26 日目（2 本中 1 本の CIDR 抜去 24 時間前、2 本目の CIDR 抜去 48 時間前）まで継続した。その後、6 時間間隔の超音波検査に切り替え、術後 31 日目（2 本目の CIDR 抜去 72 時間後）まで継続した後、12 時間間隔の超音波検査を術後 32 日目まで実施した。子宮内膜バイオプシーは、術後 28 日目（2 本目の CIDR 抜去の 12 時間後）および術後 31 日目（2 本目の CIDR 抜去の 72 時間後）に 1 回ずつ実施した。

(5) 卵巣摘出牛への E₂ 単独処置

E₂ 単独の子宮内膜厚への効果を調査するため、E₂ 単独処置として EB のみを使用した際の変化を観察した（図 12 下段）。合成型 E₂ 製剤である EB は天然型よりも体内での代謝に時間がかかるため作用時間が持続するとさ

れ、卵巣摘出牛への EB 処置において E₂ の効果が 9 日間持続したという報告があるため[43]、前試験区の P₄-E₂ 併用処置の EB 投与から 11 日間を空けて本試験区である E₂ 単独処置を実施した。術後 39 日目に EB 2 μg/kg BW を供試牛に投与した。超音波検査は術後 38 日目（EB 投与 24 時間前）より開始し、6 時間間隔で術後 42 日目（EB 投与 72 時間後）まで継続した。その後、術後 43 日目まで 12 時間間隔の超音波検査を実施した。子宮内膜バイオプシーは術後 39 日目（EB 投与 12 時間後）および術後 42 日目（EB 投与 72 時間後）に 1 回実施した。

(2) ~ (5) において子宮内膜バイオプシーにより採取した子宮内膜組織中の P 受容体、E 受容体 α、E 受容体 β、VEGF 受容体 1、VEGF 受容体 2、VEGF の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により測定した。

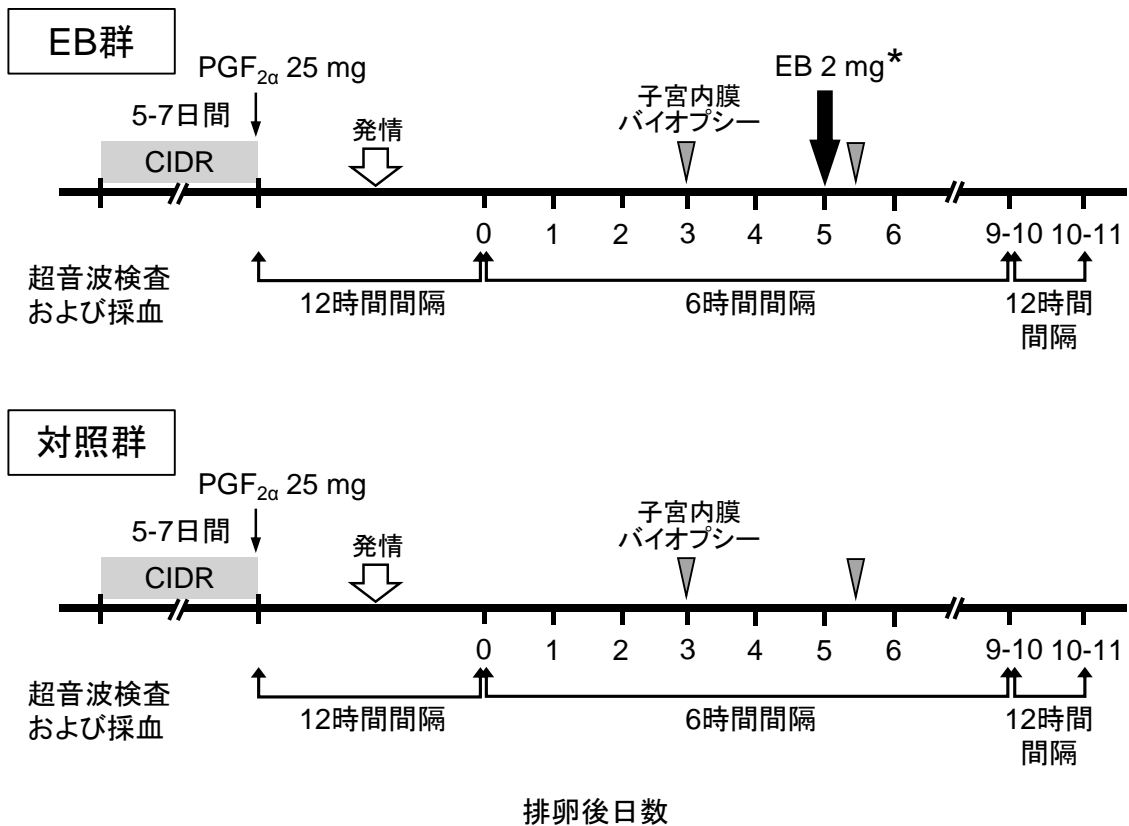


図 11. 黄体期におけるホルモン処置スケジュール

すべての供試牛 ($n = 10$) に腔内留置型プロジェステロン徐放剤 (CIDR) とプロスタグランジン (PG) $F_{2\alpha}$ を組み合わせた処置によつてのべ11回の発情を誘起し、排卵を確認した (表9)。黄体期である排卵後5~6日目の間に主席卵胞の存在を確認し、安息香酸エストラジオール (EB) 2 mgを1回投与した6頭 (図11上段) をEB群とし、ホルモン剤無処置の5頭 (図11下段) を対照群とした。子宮内膜バイオプシーは両群とも排卵後3日目に1回実施し、さらに、EB群はEB投与12時間後に1回、対照群は5日目に1回実施した。図は排卵日を0日とした。

*EB群において、EBは排卵後5~6日目の間に1回投与された。

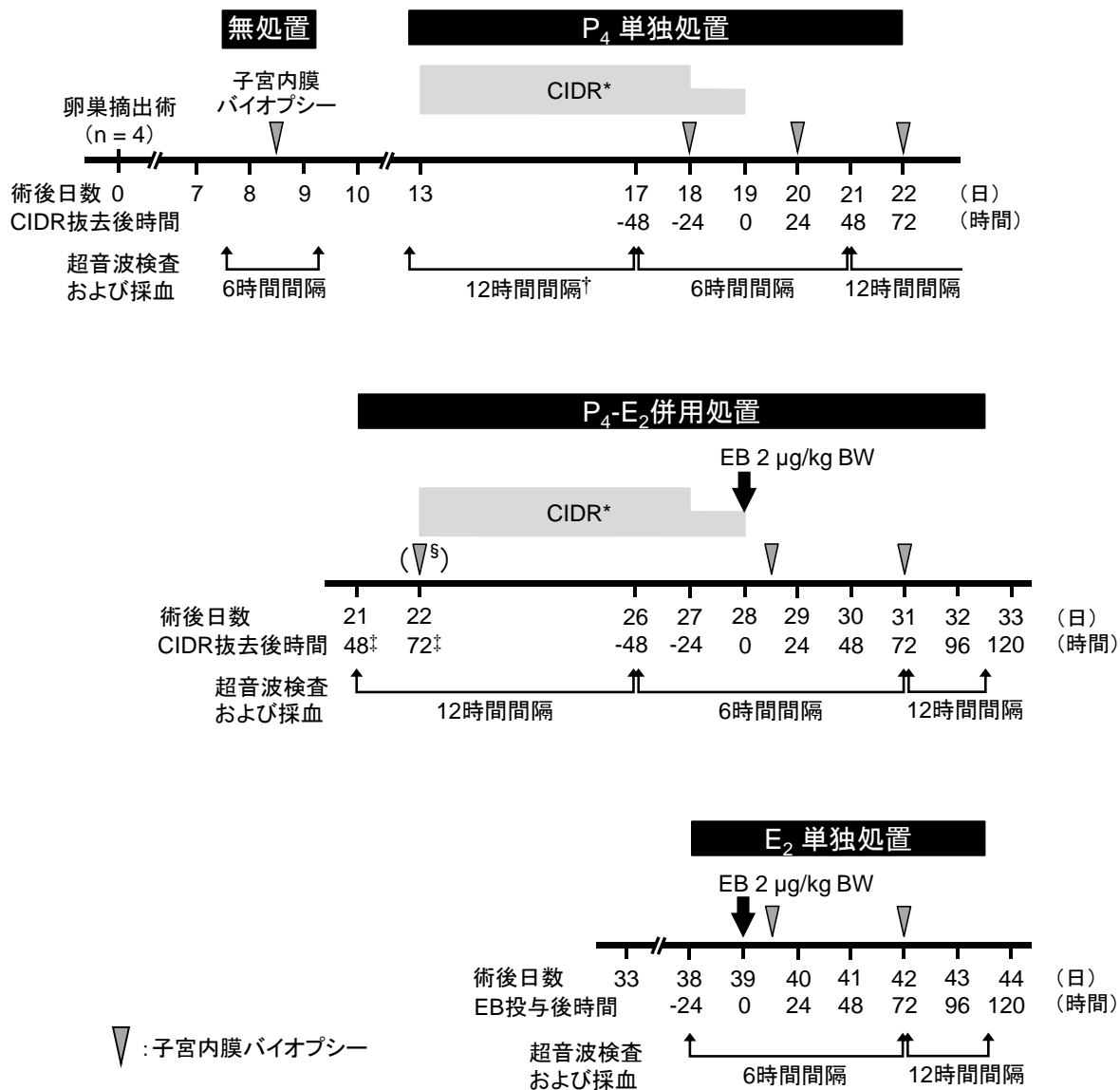


図 12. 卵巣摘出牛におけるホルモン処置スケジュール

4頭の卵巣摘出牛に対し、無処置、プロゲステロン(P₄)単独処置:腔内留置型P₄製剤(CIDR)のみ、P₄およびエストラジオール(E₂)併用処置:CIDR-安息香酸エストラジオール(EB)、E₂単独処置:EBのみを行った。時間軸の上段は術後日数、下段は2本目のCIDR抜去またはEB投与後経過時間を示した。

*CIDRは2本同時に挿入し、挿入から5日目に1本、6日目にもう1本を抜去した。

†12時間間隔の超音波検査をCIDR挿入の12時間前より開始した。

‡P₄単独処置時のCIDR抜去後時間を表す。

§P₄単独処置の試験区分に属するものとした。

9) 統計処理

それぞれの測定値は平均値 ± 標準誤差で示した。

前章における検討より、子宮内膜厚の標準化基準日は黄体期（排卵後 5～17 日）のいずれかの日に設定することが適切であったため、本章の研究においては排卵後 9 日目を基準日とし、すべての子宮内膜厚測定値を基準日の測定値に対する変化率に換算して示した。高 P₄ 環境下（黄体期）における E₂ 処置において、EB 群および対照群における P₄ 濃度、E₂ 濃度および子宮内膜厚変化率は二元配置分散分析重複測定を行った後、必要に応じて post hoc test として Student's *t*-test を用いて同一検査日の 2 群間の比較検定を行った。また、EB 群における EB 投与前後の E₂ 濃度および子宮内膜厚変化率の変化の解析には Dunnett の多重比較検定を行った。EB 群および対照群の mRNA の発現量の比較には二元配置分散分析重複測定を行った後、必要に応じて post hoc test として Student's *t*-test を行った。発情期および黄体期に採取した子宮内膜組織中の mRNA 発現の 2 群間比較には Student's *t*-test を用いた。

本章の研究の試験計画の (2) 以降は卵巣摘出後であり黄体期という区分がないため、試験計画の (2) においては、無処置で超音波検査を行った 8 回分の子宮内膜厚測定値の平均値を子宮内膜厚標準化の基準値として用いた。卵巣摘出牛に対する P₄ 単独処置および P₄-E₂ 併用処置における P₄ 濃度、P₄-E₂ 併用処置および E₂ 単独処置における E₂ 濃度および子宮内膜厚変化率について、二元配置分散分析重複測定を行った。同一群内における異なる検査日の 2 群間比較には子宮内膜厚変化率およびホルモン濃度の変化を解析した。その解析結果は第 1 章と同様に解釈した (図 4 参照)。mRNA 発現量の比較にはまず、卵巣の有無による子宮内膜組織中の mRNA 発現への影響を検討した。発情期および黄体期の子宮内膜組織中の mRNA 発現量と卵巣摘

出術後の無処置時に採取した子宮内膜組織中の mRNA 発現量を Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて比較した。次いで、卵巣摘出後の無処置、P₄ 単独処置、P₄-E₂ 併用処置、E₂ 単独処置時の子宮内膜組織中の mRNA 発現量を Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて比較した。

本章のいずれの検定結果も $P < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。これらの解析には、統計解析ソフト (Statcel 第 3 版、OMS 出版、埼玉) を使用した。

3. 結果

1) 高 P₄ 環境下(黄体期)における E₂ 処置

CIDR と PGF_{2α} を組み合わせた処置による発情誘起後の EB 群および対照群の P₄ 濃度、E₂ 濃度および子宮内膜厚変化率を図 13 に示した。図 13 において、EB 群は 1 頭あたり 2 mg の EB 投与時（排卵後 5～6 日の間）を 0 日とし、無処置で観察した対照群は排卵を 0 日として比較した。

(1) 血中 P₄ 濃度の変化

EB 群および対照群の P₄ 濃度の変化を図 13a に示した。発情誘起後、EB 群の P₄ 濃度は EB 投与前 8～4 日は低値で推移し、EB 投与前 4～3 日の間に上昇して 1 ng/ml を超えた。その後も P₄ 濃度は上昇し続け、EB 投与以降は 2 ng/ml 以上で推移した。発情誘起後の対照群の P₄ 濃度は排卵前 4 日～排卵後 3 日まで低値で推移し、排卵後 3～4 日の間に上昇して 1 ng/ml を超えた。その後、排卵後 5～6 日の間に 2 ng/ml を超えて推移した。EB 群と対照群の P₄ 濃度は EB 投与前 4～1 日（排卵後 1～4 日）の間で EB 群の P₄ 濃度が有意に高く推移したが ($P < 0.05$)、EB 投与前日（排卵後 4 日目）以降は 2 群間の P₄ 濃度差はなかった。

(2) 血中 E₂ 濃度の変化

EB 群および対照群の E₂ 濃度の変化を図 13b に示した。発情誘起後、EB 群および対照群とも同時期（それぞれ EB 投与前 7～6 日、排卵前 2～1 日）に発情の指標とされる E₂ の濃度（10 pg/ml）に達し、一過性の上昇を示した。その後、EB 群の E₂ 濃度は EB 投与前 6 日～投与直前まで低値で推移したが、EB 投与後に急速に上昇し、EB 投与後 3 日目まで 10 pg/ml 以上で推移した。対照群の E₂ 濃度は排卵前 1 日～排卵後 10 日目まで低値のまま推移した。EB 群および対照群の E₂ 濃度は EB 投与前（排卵後 5 日目）までは

2 群間の E_2 濃度に有意な差はなく推移したが、EB 投与後から投与後 3 日目（排卵後 8 日目）までは EB 投与群の E_2 濃度は対照群よりも有意に高く推移した（* $P < 0.05$ ）。また、EB 群の E_2 濃度は EB 投与直前と比較して EB 投与後 18 時間で有意に高くなった（X/Y、 $P < 0.05$ ）。

(3)子宮内膜厚の変化

EB 群および対照群の子宮内膜厚の変化を図 13c に示した。EB 群および対照群の子宮内膜厚変化率は CIDR および $PGF_{2\alpha}$ 処置による発情誘起後に増加し、EB 投与前 6 日目（排卵前 1 日）で最高値を示したのち、徐々に減少し、両群とも検査期間の EB 投与後 5 日目（排卵後 10 日目）まで低値で推移した。いずれの検査日においても 2 群間に有意な差はなく、EB 群においては EB 投与後に子宮内膜厚が増加する傾向は認められなかった。

(4)子宮内膜組織中の受容体および液性因子の発現量

性ステロイドホルモン受容体、VEGF 受容体および VEGF の発現量を図 14 に示した。P 受容体、E 受容体 β 、VEGF 受容体 1 および VEGF においては、対照群（図 14、斜線バー）と EB 群（図 14、黒塗りバー）間で排卵後 3 日目（EB 投与 2 日前）と 5 日目（EB 投与 12 時間後）の発現量に有意な差はなかった。しかし、EB 群の E 受容体 α の発現量は、EB 投与 2 日前（排卵後 3 日目）と EB 投与 12 時間後（排卵後 5 日目）で有意に低下し、また、対照群の発現量と比較しても E 受容体 α の発現量は有意に低かった。EB 群の EB 投与 12 時間後（排卵後 5 日目）の VEGF 受容体 2 の発現量は、対照群と比較して有意に高かった（A/B、 $P < 0.05$ ）。E 受容体 α 、VEGF 受容体 1 および受容体 2 の発現量は発情期および黄体期で有意な差はなかった（図 14、白抜きバー）。しかし、P 受容体の発現量は黄体期に少なくなる傾向があり、E 受容体 β は黄体期に、VEGF は発情期に有意に高かった（a/b、 $P < 0.05$ ）。

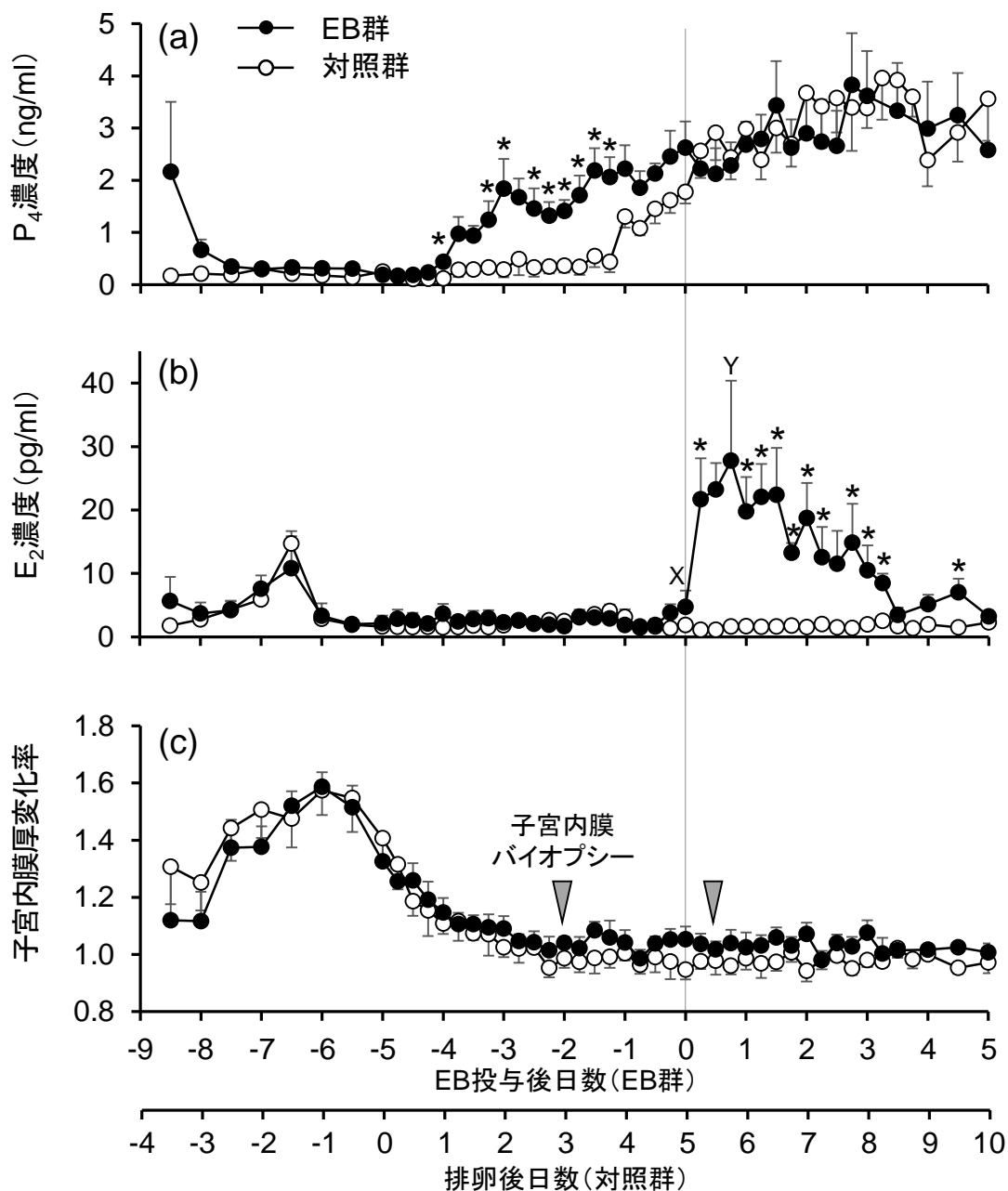


図 13. 高プロジェステロン(P₄)環境下(黄体期)におけるエストラジオール(E₂)処置
 供試牛 (n = 10) にのべ11回の発情を誘起し、排卵を確認した(表9)。排卵後5~6日目に主席卵胞および機能性黄体の存在を確認し、安息香酸エストラジオール(EB)を1頭あたり 2 mg投与した6頭をEB群、排卵後無処置で観察した5頭を対照群とした。EB群はEB投与時(排卵後5~6日の間)を0日とし、対照群は排卵を0日とし、(a)P₄濃度、(b)E₂濃度、(c)子宮内膜変化率の推移を示した(平均 ± 標準誤差、X/Y同群内有意差あり、*2群間有意差あり、P < 0.05)。子宮内膜バイオプシー(▽)はEB投与前2日(排卵後3日目)およびEB投与後12時間(排卵後5日目)に実施した。

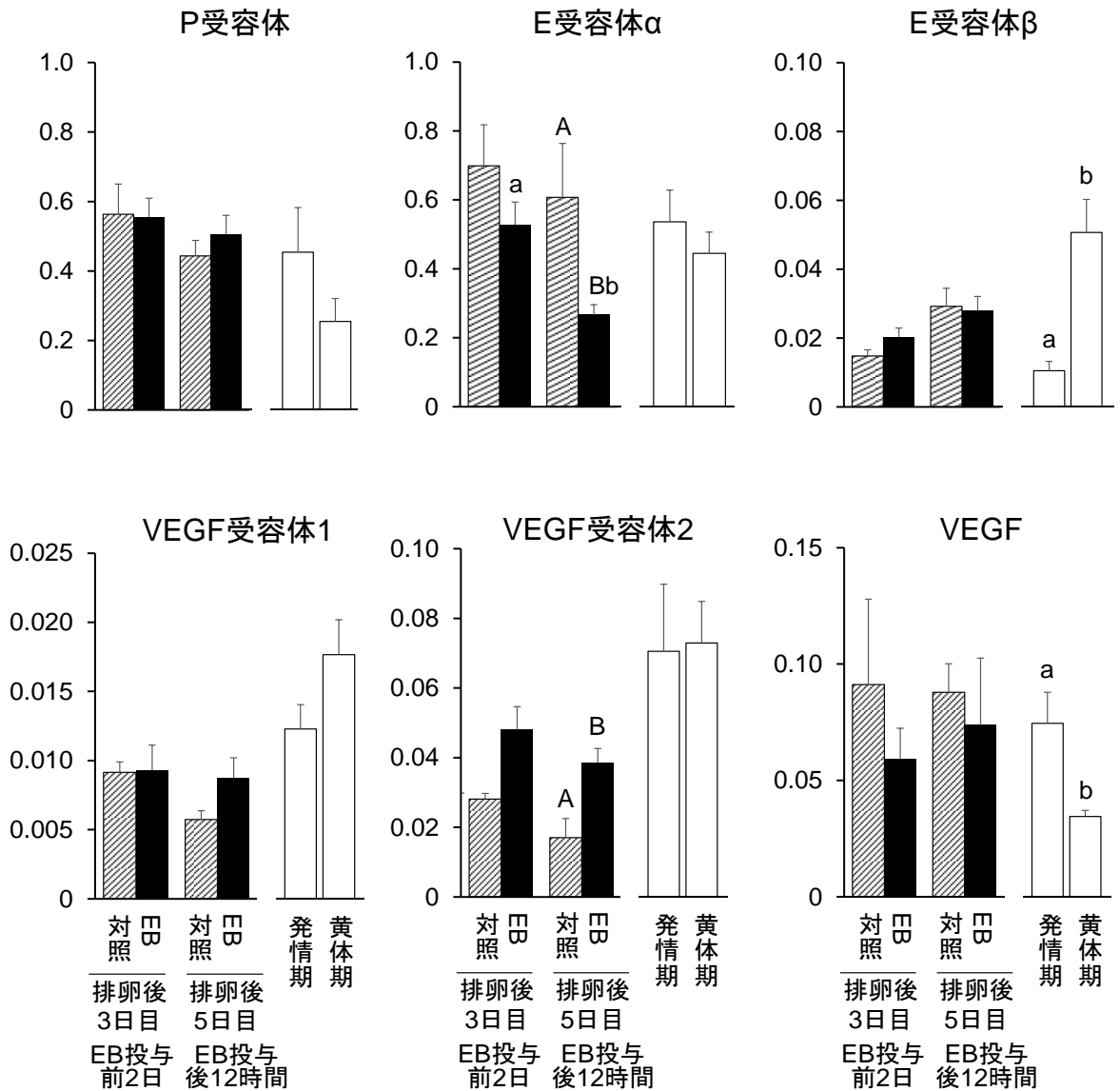


図 14. 対照群および安息香酸エストラジオール(EB)群における子宮内膜組織中の性ステロイドホルモン受容体、血管内皮細胞成長因子(VEGF)受容体、およびVEGFのmRNA発現量

対照群およびEB群の子宮内膜組織中のプロジェステロン(P)受容体、エストロジェン(E)受容体α、E受容体β、VEGF受容体1、VEGF受容体2、VEGFのmRNA発現量を示した(平均 ± 標準誤差、同一群内有意差あり a/b、2群間有意差あり A/B、 $P < 0.05$)。子宮内膜バイオプシーは対照群で排卵後3日目および5日目に、EB群でEB投与前2日(排卵後3日目)およびEB投与後12時間(排卵後5日目に)に実施した。

2) 卵巣摘出牛に対する無処置時の血中 P₄ 濃度、E₂ 濃度および子宮内膜厚の変化

卵巣摘出牛 (n = 4) に対し無処置時の P₄ 濃度、E₂ 濃度および子宮内膜厚の変化を図 15 に示した。卵巣摘出手術後 7~9 日の間に無処置で 6 時間間隔の超音波検査を 8 回実施した。同一群内における異なる検査日について多重比較したが有意差は認められず、P₄ 濃度、E₂ 濃度は共に低値のまま推移し(図 15ab)、子宮内膜厚は観察期間中一定の厚さを保って推移した(図 15c)。無処置で超音波検査を行った 8 回分の子宮内膜厚測定値の平均値を P₄ 単独処置、P₄ および E₂ 併用処置、E₂ 単独処置時の子宮内膜厚標準化の基準値として用いた。

3) 卵巣摘出牛への P₄ 単独処置時の血中 P₄ 濃度、E₂ 濃度および子宮内膜厚の変化

卵巣摘出牛に対し P₄ 単独処置時の P₄ 濃度、E₂ 濃度および子宮内膜厚の変化を図 16 および表 11 に示した。卵巣摘出手術後 13 日目より、2 本の CIDR を挿入することにより供試牛を P₄ に感作させた。P₄ 濃度は CIDR 挿入した 12 時間後には上昇し始め、翌日(術後 14 日目)には 5 ng/ml を超えてピークに達し、24 時間ピークレベルを維持した後、徐々に低下したが 1 本目の CIDR を抜去する(術後 18 日目)までは 2 ng/ml 以上で推移した(図 16a、表 11)。CIDR 挿入から 5 日目(術後 18 日目)に 1 本の CIDR を抜去したところ、P₄ 濃度はさらに低下したが、2 本目の CIDR を抜去する(術後 19 日目)までは 1 ng/ml 以上で推移した(図 16a)。2 本目の CIDR 抜去(術後 19 日目)後は 6 時間以内に基底に達し(1 ng/ml 未満に低下)、そのまま基底濃度で推移した(図 16a、表 11)。E₂ 濃度は群内の異なる検査日について多重比較したが有意差は認められず、観察期間中常に低値で推移した(図

16b)。子宮内膜厚は2本目のCIDR抜去（術後19日目）の6時間前より増加し始め、CIDR抜去後30時間でピークに達した（図16c、表11）。その後子宮内膜厚は減少し、CIDR抜去後72時間（術後22日目）までに基底に戻った。

4) 卵巣摘出牛への P₄ および E₂ 併用処置時の血中 P₄ 濃度、E₂ 濃度 および子宮内膜厚の変化

卵巣摘出牛に対し P₄-E₂ 併用処置時の P₄ 濃度、E₂ 濃度および子宮内膜厚の変化を図17および表12に示した。卵巣摘出手術後22日目より、2本のCIDRを挿入することにより供試牛を P₄ に感作させ、2本目のCIDR抜去時に EB 2 μg/kg BW を投与した。P₄ 濃度は CIDR 挿入した12時間後には上昇し始め、翌日（術後23日目）には 3 ng/ml を超えてピークに達し、84時間ピークレベルを維持した後、徐々に低下したが1本目のCIDRを抜去する（術後27日目）までは 2 ng/ml 以上で推移した（図17a、表12）。CIDR挿入から5日目（術後27日目）に1本のCIDRを抜去したところ、P₄ 濃度はさらに低下したが、2本目のCIDRを抜去する（術後28日目）までは 1 ng/ml 以上で推移した（図17a）。2本目のCIDR抜去およびEB投与（術後28日目）後は6時間以内に基底レベルに達し（1 ng/ml 未満に低下）、そのまま基底濃度で推移した（図17a、表12）。E₂ 濃度は、2本目のCIDR抜去（術後28日目）と同時にEB投与した直後（6時間後）に上昇し始めると同時に 10 pg/ml を超えてピークレベルに到達した（図17b、表12）。E₂ 濃度は2本目のCIDR抜去およびEB投与（術後28日目）の12時間後にピークを示したのち低下に転じ、2本目のCIDR抜去およびEB投与後48時間（術後30日目）で基底レベルに到達した。子宮内膜厚は2本目のCIDR抜去（術後28日目）の12時間前より増加し始め、CIDR抜去およびEB投

与後 18 時間でピークレベルに達し、30 時間ピークレベルを維持した（図 17c、表 12）。その後、子宮内膜厚は 2 本目の CIDR 抜去および EB 投与後 108 時間（術後 32 日目）までに基底レベルに戻らなかった。

5) 卵巣摘出牛への E₂ 単独処置時の血中 P₄ 濃度、E₂ 濃度および子宮内膜厚の変化

卵巣摘出牛に対し E₂ 単独処置時の P₄ 濃度、E₂ 濃度および子宮内膜厚の変化を図 18 および表 13 に示した。卵巣摘出手術後 39 日目に EB 2 μg/kg BW を投与した。P₄ 濃度は群内の異なる検査日について多重比較したが有意差は認められず、検査期間中常に低値で推移した（図 18a）。E₂ 濃度は群内の異なる検査日について多重比較したが有意差は認められなかった（図 18b）。しかし、E₂ 濃度は EB 投与後 12 時間で発情時の指標となる 10 pg/ml 近くまで上昇し、EB 投与後 42 時間で最高値（14.3 pg/ml）を示した。子宮内膜厚は EB 投与後 12 時間より増加し始め、EB 投与後 18 時間でピークレベルに達し、30 時間ピークレベルを維持した（図 18c、表 13）。その後、子宮内膜厚は EB 投与後 84 時間（術後 43 日目）までに基底レベルに戻った。

6) P₄ 単独処置、P₄ および E₂ 併用処置、E₂ 単独処置時の血中性ステロイドホルモン濃度および子宮内膜厚の変化の比較

前述の 3) P₄ 単独処置、4) P₄-E₂ 併用処置、5) E₂ 単独処置の試験結果を比較し、図 19 に示した。CIDR を用いて P₄ 感作させた P₄ 単独処置および P₄-E₂ 併用処置における P₄ 濃度の変化では、2 群間に有意な差は認められず、両群の P₄ 濃度は同様な推移を示した（図 19a）。また、EB を投与した P₄-E₂ 併用処置と E₂ 単独処置における E₂ 濃度の変化では、2 群間に有意な差は認められず、両群の E₂ 濃度は同様な推移を示した（図 19b）。子宮内膜厚は、

P₄ 単独処置、P₄-E₂ 併用処置、E₂ 単独処置のいずれの処置においても 2 本目の CIDR 抜去または EB 投与後に増加した (図 19c)。EB を投与した P₄-E₂ 併用処置と E₂ 単独処置における子宮内膜厚の変化では 2 群間に有意な差は認められず (図 19c)、EB 投与後の子宮内膜厚がピークレベルに達するまでの所要時間が 18 時間、ピークレベル持続時間が 30 時間と、両群の子宮内膜厚変化は同様な推移であった (表 14)。それに対し、P₄ 単独処置時の子宮内膜厚は EB を処置した場合と比較してピークに到達するまでの所要時間が 30 時間と長く、ピーク時の子宮内膜厚変化率も小さかった (図 19c、表 14)。すなわち、P₄ 濃度の低下で生じた子宮内膜厚の増加と比較して、E₂ 濃度の上昇に伴って生じた子宮内膜厚の増加は急速かつ高度であった。

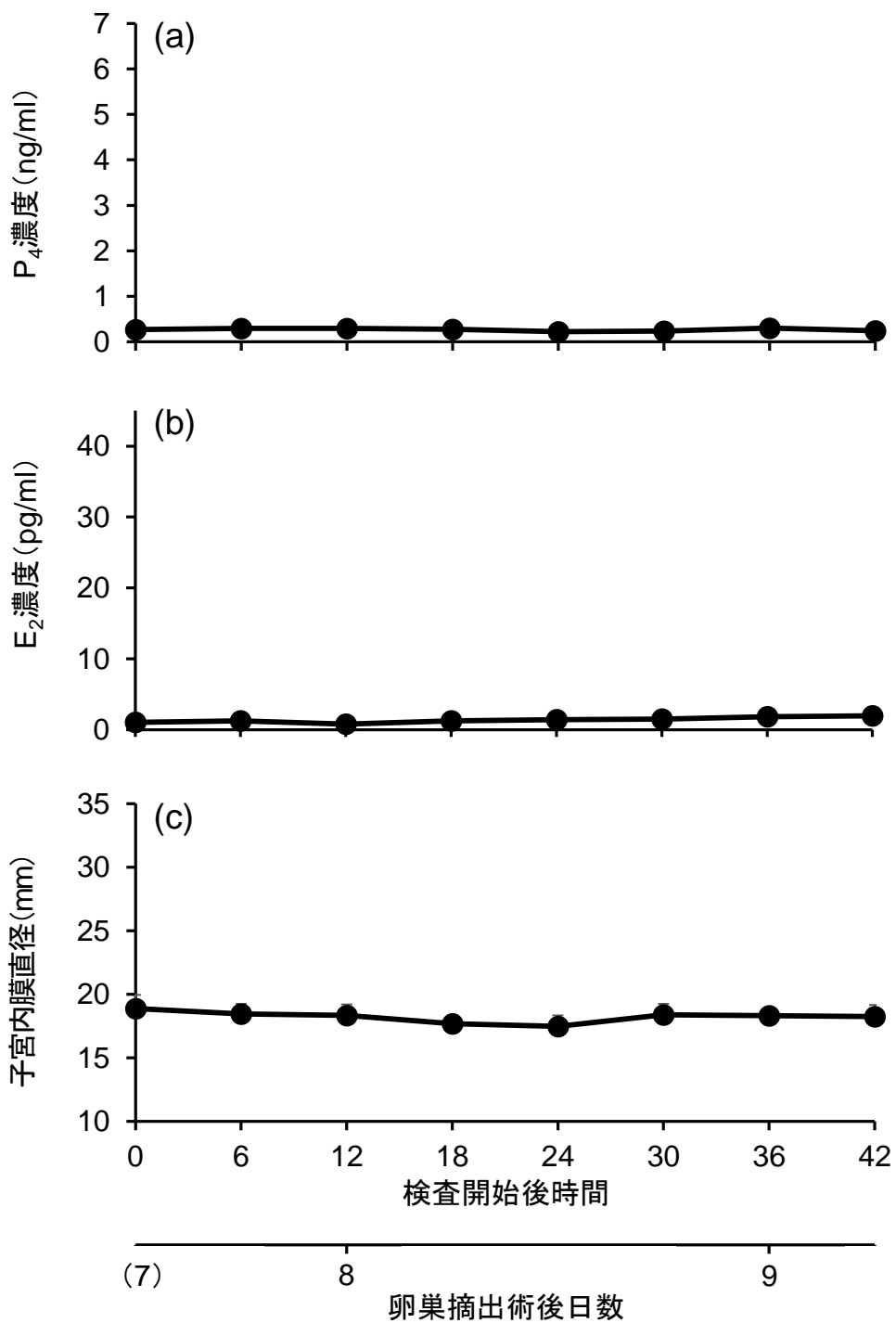


図 15. 無処置時のプロゲステロン(P₄)濃度、エストラジオール(E₂)濃度および子宮内膜厚の変化

卵巣摘出手術後7～9日の間に、無処置で6時間間隔の超音波検査を8回実施した時のP₄濃度(a)、E₂濃度(b)、子宮内膜直径実測値(c)の推移を示した(平均 ± 標準誤差)。

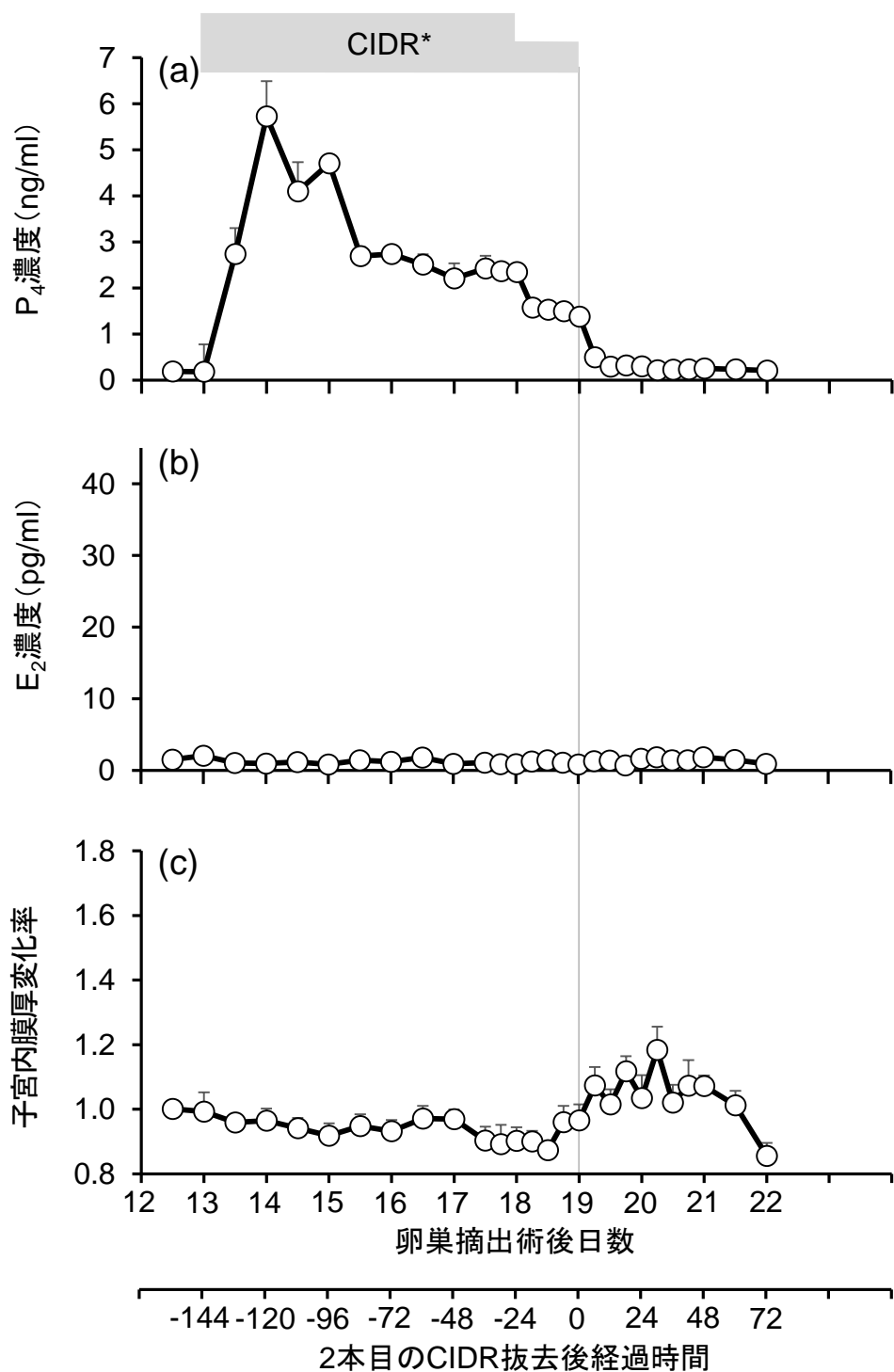


図 16. プロゲステロン(P₄)単独処置時のP₄濃度、エストラジオール(E₂)濃度および子宮内膜厚の変化

卵巣摘出手術後13日目より、腔内留置型P₄徐放剤(CIDR)を挿入してP₄に感作させ、2本目のCIDR抜去を0時間とした時のP₄濃度(a)、E₂濃度(b)、子宮内膜厚変化率(c)の推移を示した(平均 ± 標準誤差)。

*CIDRを2本挿入し、5日後に1本目、6日後に2本目を抜去した。

表 11

P₄ 単独処置試験における CIDR 抜去前後のホルモン濃度変化および子宮内膜厚変化の所要時間

評価項目	P ₄	E ₂	子宮内膜
CIDR 抜去から増加(上昇)開始からまで	-132	-	-6
CIDR 抜去からピークまで*	-120	-	30
増加(上昇)開始からピーク到達まで*	12	-	36
ピーク到達から減少(低下)開始まで* (= ピーク持続期間)	24	-	< 6
CIDR 抜去から基底レベル到達まで	6	-	72

2 本目の CIDR 抜去時(卵巣摘出手術後 19 日目、CIDR 挿入後 6 日目)を 0 時間とした時の P₄、E₂ 濃度および子宮内膜変化率の変化(図 16)を解析し、上記評価項目の所要時間を示した。同一群内のデータ比較には Tukey- Kramer 多重比較検定を用いたが、その解析結果の解釈については図 4 を参照。E₂ 濃度は群内で有意差はなく、低値のまま推移した(図 16b)。

*子宮内膜厚の変化は軽微であったためピークのみを検出であった(ピークレベルの段階は検出されなかった)。

P₄: プロジェステロン

E₂: エストラジオール

CIDR: 腔内留置型プロジェステロン徐放剤

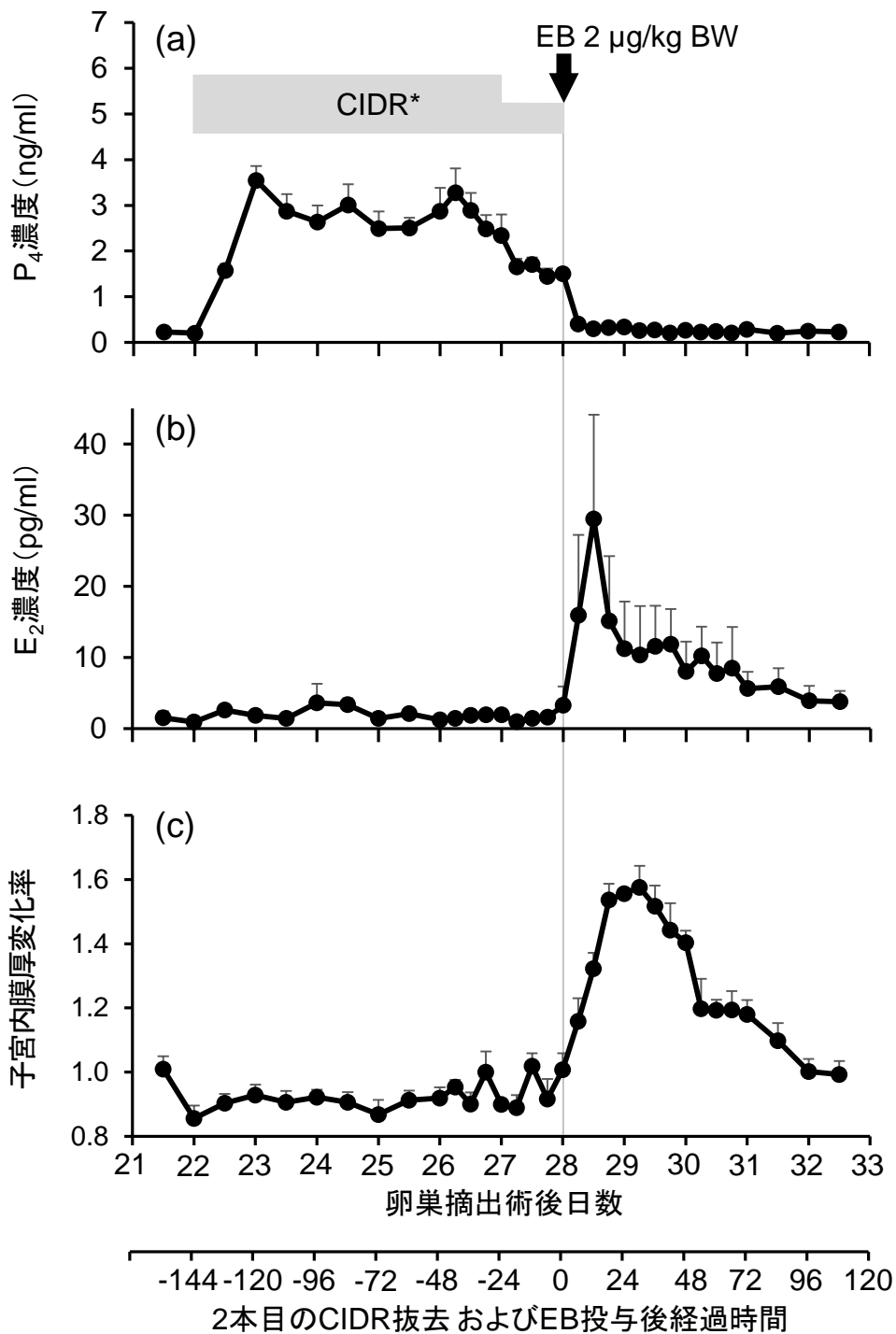


図 17. プロジェステロン(P₄)およびエストラジオール(E₂)併用処置時のP₄濃度、E₂濃度および子宮内膜厚の変化

卵巣摘出手術後22日目より、腔内留置型P₄徐放剤(CIDR)を挿入してP₄に感作させた後、CIDR抜去と同時に安息香酸エストラジオール(EB)を投与した時を0時間とし、その前後のP₄濃度(a)、E₂濃度(b)、子宮内膜厚変化率(c)の推移を示した(平均 ± 標準誤差)。

*CIDRを2本挿入し、5日後に1本目、6日後に2本目を抜去した。

表 12

P₄および E₂ 併用処置試験における CIDR 抜去/EB 投与前後のホルモン濃度変化および子宮内膜厚変化の所要時間

評価項目	P ₄	E ₂	子宮内膜
CIDR 抜去/EB 投与から増加(上昇)開始からまで	-132	6	-12
CIDR 抜去/EB 投与からピークレベルまで	-120	6	18
増加(上昇)開始からピークレベル到達まで	12	0	30
ピークレベル到達から減少(低下)開始まで (= ピークレベル持続期間)	84	12	30
CIDR 抜去/EB 投与から基底レベル到達まで	6	48	-

2 本目の CIDR 抜去および EB 投与時(卵巣摘出手術後 28 日目、CIDR 挿入後 6 日目)を 0 時間とした時の P₄、E₂ 濃度および子宮内膜変化率の変化(図 17)を解析し、上記評価項目の所要時間を示した。同一群内のデータ比較には Tukey-Kramer 多重比較検定を用いたが、その解析結果の解釈については図 4 を参照。CIDR 抜去後、子宮内膜厚は試験期間内に基底レベルに戻らなかった(図 17c)。

P₄: プロジェステロン

E₂: エストラジオール

CIDR: 腔内留置型プロジェステロン徐放剤

EB: 安息香酸エストラジオール

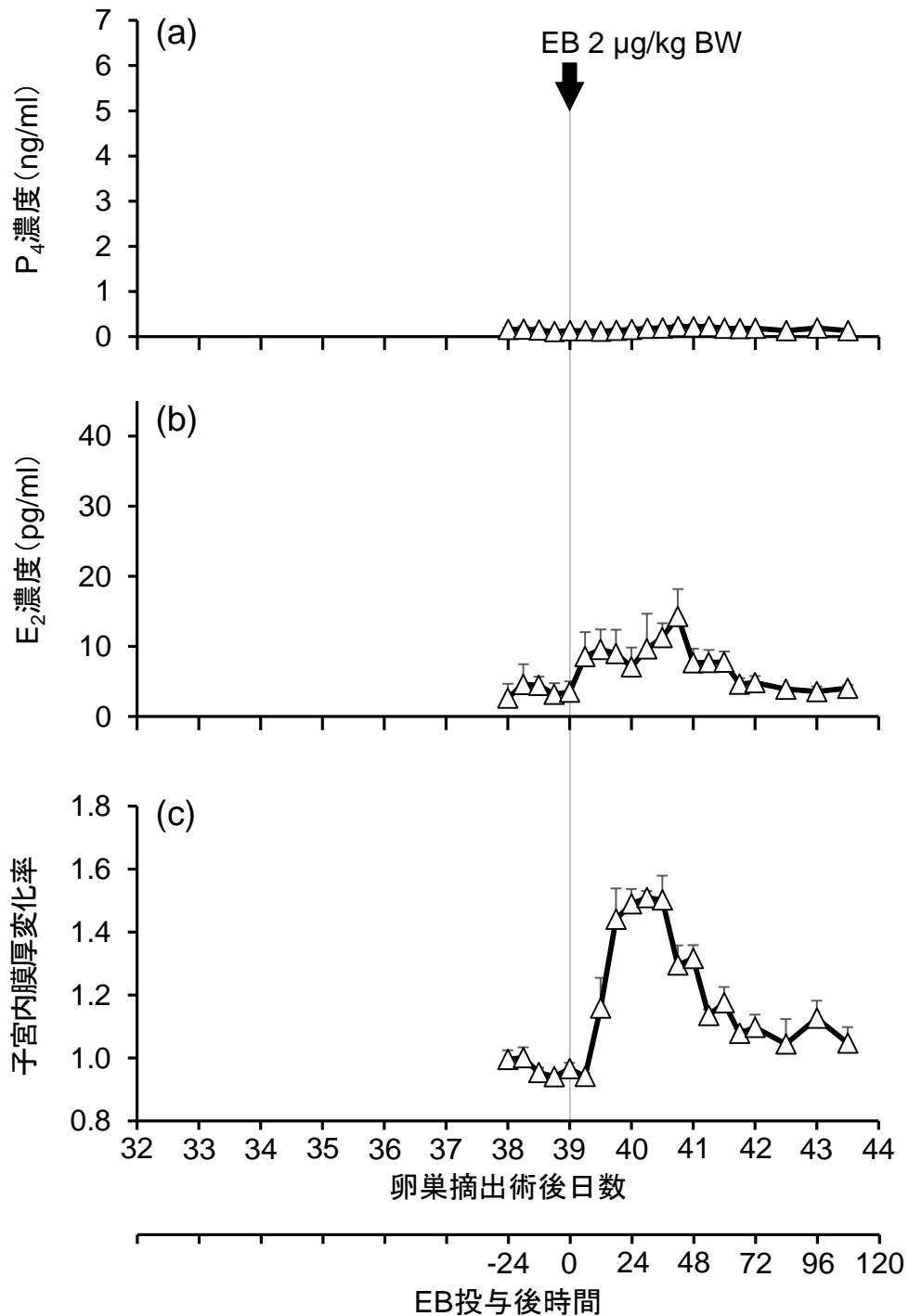


図 18. エストラジオール(E₂)単独処置時のプロジェステロン(P₄)濃度、E₂濃度および子宮内膜厚の変化

卵巣摘出手術後39日目に安息香酸エストラジオール(EB)を投与し、EB投与を0時間とした時のP₄濃度(a)、E₂濃度(b)、子宮内膜厚変化率(c)の推移を示した(平均 ± 標準誤差)。

表 13

E₂ 単独処置試験における EB 投与前後のホルモン濃度の変化および子宮内膜厚変化の所要時間

評価項目	P ₄	E ₂	子宮内膜
EB 投与から増加開始からまで*	-	-	12
EB 投与からピークレベルまで	-	-	18
増加開始からピークレベル到達まで	-	-	6
ピークレベル到達から減少(低下)開始まで (= ピークレベル持続期間)	-	-	30
EB 投与から基底レベル到達まで	-	-	84

EB 投与時(卵巣摘出術後 39 日目)を 0 時間とした時の P₄、E₂ 濃度および子宮内膜変化率の変化(図 18)を解析し、上記評価項目の所要時間を示した。同一群内のデータ比較には Tukey-Kramer 多重比較検定を用いたが、その解析結果の解釈については図 4 を参照。P₄ および E₂ 濃度は群内で有意差はなかった。P₄ 濃度は低値のまま推移し(図 18a)、E₂ 濃度は有意な上昇ではないが、発情の指標濃度である 10 pg/ml を超える上昇を認めた(図 18b)。

P₄: プロジェステロン

E₂: エストラジオール

EB: 安息香酸エストラジオール

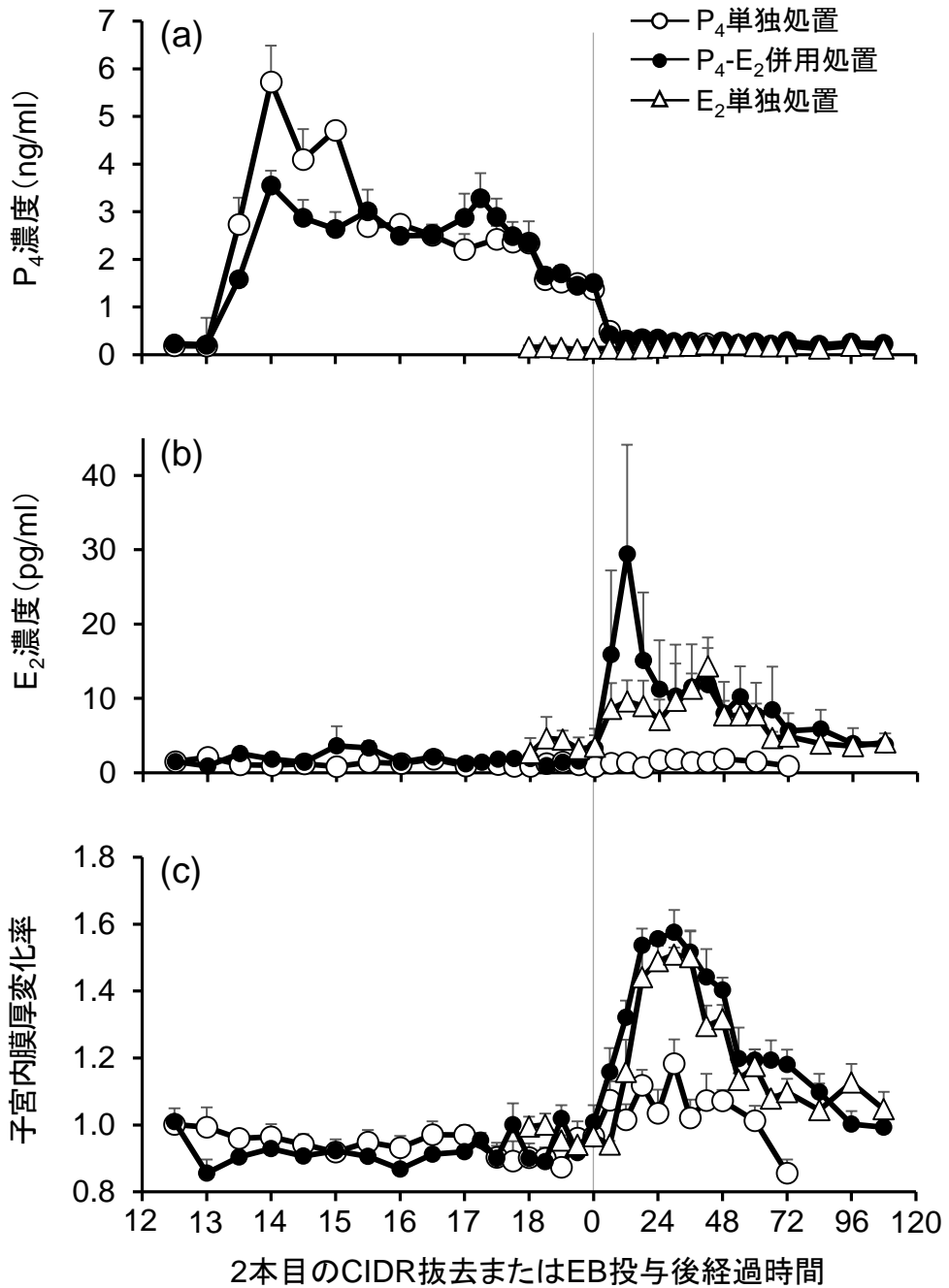


図 19. プロジェステロン(P_4)単独処置、 P_4 およびエストラジオール(E_2)併用処置、 E_2 単独処置時の P_4 濃度(a)、 E_2 濃度(b)および子宮内膜厚(c)の変化の比較

腔内留置型 P_4 徐放剤(CIDR)抜去または安息香酸エストラジオール(EB)投与時を0時間とした時の P_4 単独処置、 P_4 および E_2 併用処置、 E_2 単独処置における P_4 濃度(a)、 E_2 濃度(b)、子宮内膜厚変化率(c)の推移を比較した(平均 ± 標準誤差)。

表 14

評価項目	P ₄ 単独処置	P ₄ -E ₂ 併用処置	EB 単独処置
	CIDR	CIDR-EB	EB
ピーク(最高値)*	1.18	1.58	1.51
ピーク(レベル)到達時間	CIDR 抜去後 30 時間	CIDR 抜去および EB 投与後 18 時間	EB 投与後 18 時間
ピークレベル持続期間	< 6 時間	30 時間	30 時間
参照図	図 16	図 17	図 18

卵巢摘出牛に対する処置の違いによる子宮内膜厚変化率のピークの比較

*子宮内膜厚変化率の値

P₄:プロジェステロン

E₂:エストラジオール

CIDR:腔内留置型プロジェステロン徐放剤

EB:安息香酸エストラジオール

7) 卵巣摘出牛の子宮内膜組織中の受容体および液性因子の発現量

性ステロイドホルモン受容体、VEGF 受容体および VEGF の発現量を図 20 に示した。P₄ 単独処置（薄灰色バー）、P₄-E₂ 併用処置（斜線灰色バー）および E₂ 単独処置（黒塗りバー）におけるそれぞれの子宮内膜組織中の受容体および液性因子の発現量は、CIDR 抜去または EB 投与の翌日と CIDR 抜去または EB 投与の 3 日後のグループに分けて図 20 に示した。また、発情期および黄体期におけるそれぞれの発現量をグラフの左端に示した（図 20、白抜きバー）。発情期および黄体期に対して卵巣摘出後の無処置時の子宮内膜組織中の P 受容体および E 受容体 α は有意に多かった ($a/b, P < 0.05$)。また、E 受容体 β は卵巣摘出後に多くなる傾向にあった ($P = 0.054$)。VEGF 受容体 1、VEGF 受容体 2 および VEGF の発現量は発情期、黄体期、および卵巣摘出後の無処置時で有意な差はなかった。卵巣摘出後の無処置、P₄ 単独処置、P₄-E₂ 併用処置、E₂ 単独処置時において計 8 回採取した子宮内膜組織中の P 受容体、E 受容体 α および受容体 β 、VEGF 受容体 1 および受容体 2、VEGF の発現量はいずれも有意な差を認めなかった。しかしながら、P₄-E₂ 併用処置および E₂ 単独処置において、EB 処置後の VEGF の発現量は増加する傾向にあった。

子宮内膜バイオプシースケジュール

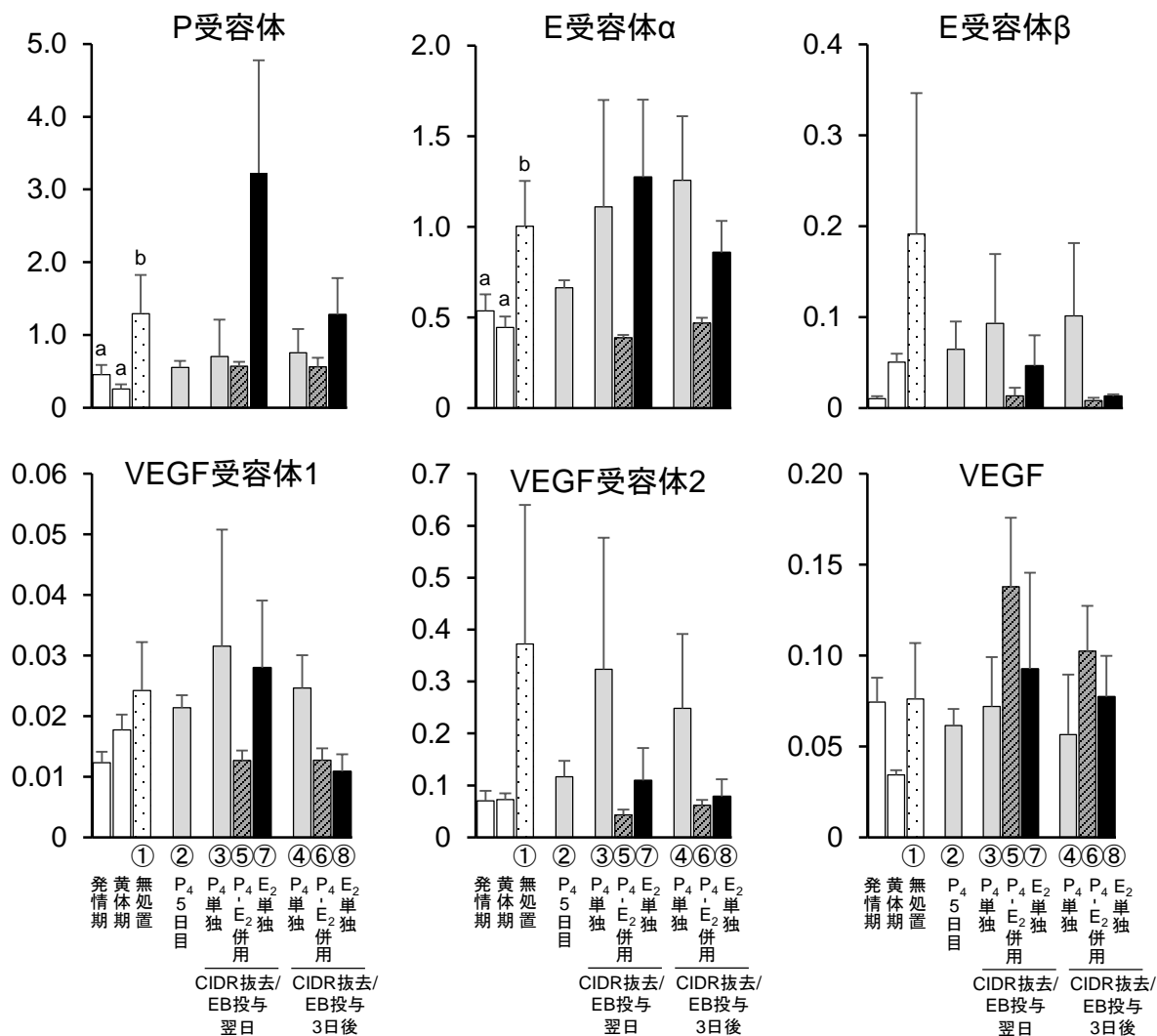
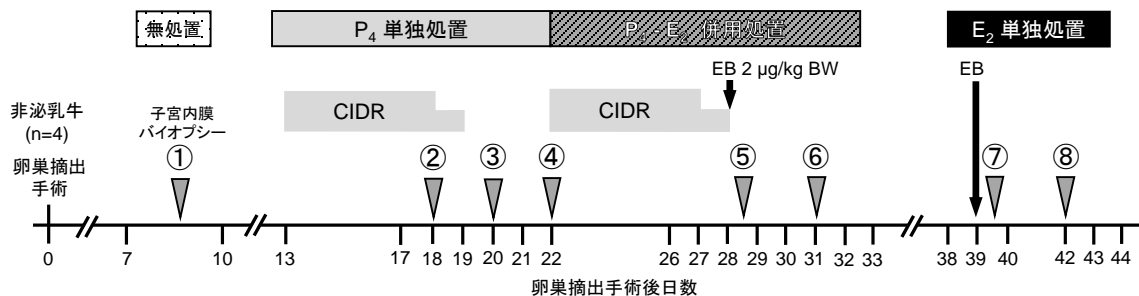


図 20. プロゲステロン(P₄)およびエストラジオール(E₂)の単独あるいは併用処置時の子宮内膜組織中の性ステロイドホルモン受容体、血管内皮細胞成長因子(VEGF)受容体、およびVEGFのmRNA発現量

上段に子宮内膜バイオプシースケジュールを示した。下段グラフの横軸ラベル番号は子宮内膜バイオプシー番号を表し、グラフはCIDR抜去またはEB投与の翌日および3日後に分けて示した(平均 ± 標準誤差、発情期・黄体期・無処置間で有意差あり a/b、 $P < 0.05$)。

4. 考察

本章の研究の目的は、子宮内膜厚の調節に関わる P_4 および E_2 の作用機序を明らかにすることであった。卵胞期の低 P_4 濃度環境において、 E_2 濃度の上昇に伴って子宮内膜厚が増加した第 I 章の研究結果を踏まえ、本章においては、まず高 P_4 濃度環境（黄体期）における E_2 濃度の上昇が子宮内膜厚に与える影響について検討した。正常な発情周期の牛では、発情後 16~18 日頃（排卵の 6~4 日前頃）から黄体退行に伴って P_4 濃度が急速に低下し、排卵前 3~1 日にかけて E_2 濃度が上昇する。すなわち、生体の正常周期中で E_2 濃度が上昇するときには既に P_4 濃度が低下し始めており、 P_4 の影響が小さくなっていると考えられる。したがって、本章の研究では、黄体の存在によって血中 P_4 濃度が 1 ng/ml 以上に保たれ、 P_4 作用の影響が全身に及んでいる黄体期に EB を投与して E_2 濃度を上昇させ、子宮内膜厚の変化を観察した。牛子宮内膜における E 受容体 α の発現は発情後 9~13 日目より低下したという報告があり [41, 48]、子宮内膜の E_2 に対する感受性低下時期における試験を避けるため、EB 投与のタイミングは発情後 9 日（排卵後 7~8 日）よりも前の排卵後 5~6 日とした。また、正常な発情周期の牛の場合、排卵後 5~6 日で第 1 卵胞発育波の主席卵胞が決定するが [23]、EB 投与時の排卵後 5~6 日にはすべての供試牛において主席卵胞の存在が確認され、本章で用いた供試牛は正常な発情周期であったことが確認できた。

EB 投与時の P_4 濃度は EB 群および対照群とも 1 ng/ml 以上であり、 P_4 が生体に作用している状態であると判断された（図 13）。排卵後の P_4 濃度の上昇のタイミングは EB 群よりも対照群の方が遅く、排卵後 1~4 日までの間に EB 群 P_4 濃度の方が有意に高かった。しかしながら、正常な発情周期の牛において、 P_4 濃度の上昇は排卵後 2~4 日頃とされ、いずれの群も P_4 濃

度の上昇のタイミングが逸脱していたわけではなかった。また、EB 投与の 1 日前には両群の P_4 濃度の差はなくなっていたことから、EB 投与前の子宮内膜に対する P_4 感作が EB 投与後（排卵後 5 日目以降）の子宮内膜厚の変化に及ぼす影響は両群で同等であったと考えられた。

本章の研究において黄体期（排卵後 10 日）の子宮内膜組織中の P 受容体の発現量は発情期よりも低下して推移したが、この結果は、黄体開花期にあたる発情後 11~13 日頃にその発現が有意に低下したという報告と一致していた [41, 62]。しかし、EB 群および対照群の P 受容体発現量は EB 投与前後で同等であったことから、子宮内膜の P_4 感受性は低下せず維持されていたと考えられた。黄体期の P_4 濃度を維持し、P 受容体が発現していたと判断された環境下において、EB 投与後の EB 群の E_2 濃度は発情の指標となる 10 pg/ml を超えて有意に上昇し、対照群よりも有意に高く推移していたにも関わらず、子宮内膜厚の増加は認められなかった（図 13）。また、EB 投与によって E_2 濃度は十分に上昇したが、EB 投与前後（排卵後 3 および 5 日目）の子宮内膜組織中の E 受容体 β 、VEGF 受容体および VEGF の発現量は EB 群および対照群ともに同等であった（図 14）。EB 投与後、EB 群の子宮内膜組織中の E 受容体 α の発現量は EB 投与前の発現量および対照群の発現量と比較しても有意に低下していたが、これは EB 投与によって急速に E_2 濃度が上昇したことにより、子宮内膜の E 受容体 α 発現が代償的に抑えられたものと推察された。しかし、EB 投与後の E 受容体 α は投与前の約半量は発現しており、それにもかかわらず子宮内膜厚にほとんど変化を認めなかったことから、E 受容体 α の発現低下による E_2 感受性の低下が子宮内膜厚を増加させなかった原因ではないと考えられた。子宮内膜組織中の VEGF 受容体 2 の発現は EB 群および対照群とも EB 投与前後（排卵後 3 および 5 日目）でその発現が低下して推移した（図 14）。これまでに、子宮内膜組織

中の VEGF 受容体 2 の発現量は発情期から黄体初期にかけて低下し、黄体開花期に再び発現量が増加したという研究報告がある[77]。高 P₄ 環境下（黄体期）における E₂ 処置試験では、排卵後 5～6 日目の黄体初期における EB 投与であったため、VEGF 受容体 2 の発現量が低下して推移した結果は既報と同様と考えられた。また、EB 群の EB 投与後の VEGF 受容体 2 の発現量が対照群よりも有意に高かったことから、EB 投与により VEGF 受容体 2 の発現が誘導された可能性が推察された。しかしながら、EB 群および対照群の VEGF 受容体 2 の発現量は、EB 投与 2 日前（排卵後 3 日目）の時点で、既に差のある傾向を認め（ $P = 0.079$ ）、そのことが EB 投与後（排卵後 5 日目）の発現量に影響した可能性も考えられた。E₂ 濃度の上昇が VEGF 受容体 2 の発現を誘引する作用についてはさらなる検討が必要である。

黄体期（月経周期の増殖期）における人あるいは幼若マウスへの E₂ 投与により子宮内膜に浮腫が生じたことが確認されており[4, 42]、また、齧歯類や霊長類において、E₂ は血管透過性亢進因子である VEGF を介して子宮内膜に浮腫を起こすことが報告されている[29, 63]。図 14 の VEGF 発現量のグラフで示されたように、発情期の子宮内膜組織中の VEGF の発現が有意に高かったことから、P₄ 濃度の低い環境下では E₂ 濃度の上昇は VEGF の増加を介した作用により、血管透過性が亢進して子宮内膜に浮腫が生じ、子宮内膜厚が増加する過程が推測された。高 P₄ 環境下（黄体期）における E₂ 処置試験において、牛の黄体期（排卵後 5～6 日目）に EB を投与し、E₂ 濃度を上昇させた場合も、VEGF の増加あるいは VEGF 受容体の増加を介して牛子宮内膜厚が増加することが予測されたが、子宮内膜厚は増加しなかった。すなわち、P₄ 濃度が高く、P₄ の作用が子宮内膜にも及んでいる環境下では、E₂ 濃度が上昇しても子宮内膜厚は増加しなかったという結果であり、P₄ が牛子宮内膜厚の増加を抑制していることが示唆された。また、P₄ 濃度

が高い環境下において、子宮内膜組織中の VEGF あるいは VEGF 受容体の発現量の低下を認めなかったことから、 P_4 が子宮内膜厚の増加を抑制する機序は、VEGF や VEGF 受容体の発現を抑制することではなく、 E_2 が VEGF に作用する過程、VEGF が VEGF 受容体に結合する過程、VEGF 蛋白受容体複合体が MMP を分泌させる過程あるいは MMP の活性を P_4 が阻害する過程など複数の抑制過程を P_4 が制御している可能性が示唆された(図 21)。

黄体期 (高 P_4 環境) における E_2 処置: 子宮内膜厚変化なし

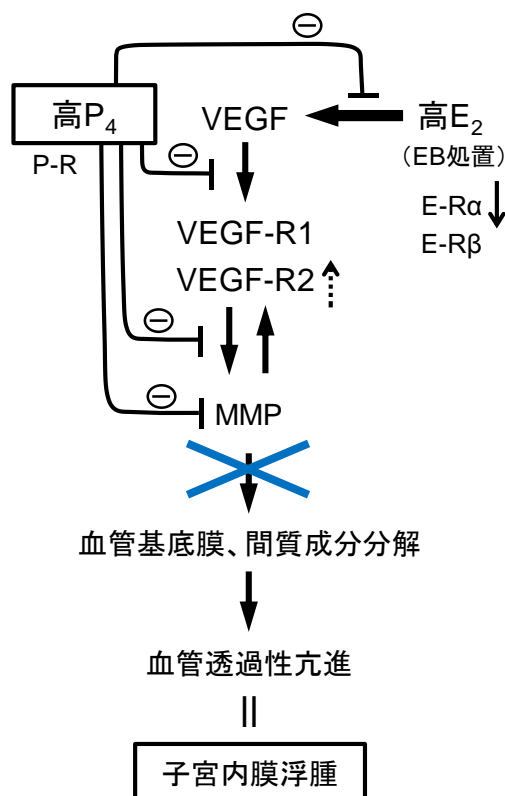


図 21. 黄体期における安息香酸エストラジオール(EB)投与(高 E_2 環境)時のプロゲステロン(P_4)による牛子宮内膜浮腫抑制機序の推測

P_4 は血管内皮細胞成長因子 (VEGF) あるいはその受容体の発現調節ではない機序によって子宮内膜の浮腫を抑制すると考えられた。

P-R: プロゲステロン受容体、E-R: エストロゲン受容体

VEGF-R1 および R2: VEGF 受容体 1 および受容体 2

MMP: マトリックスメタロプロテアーゼ

卵巣摘出牛に対して無処置で観察した時の P₄、E₂ 濃度および子宮内膜厚は低値のまま推移した (図 16)。血中の P₄ および E₂ が低値のまま一定であったことから、卵巣摘出は適正に実施され、卵巣由来の性ステロイドホルモン分泌を喪失していることが確認できた。また、無処置の状態を観察した 8 回分の子宮内膜厚の直径実測値の平均値を算出し、その後の P₄ 単独処置、P₄-E₂ 併用処置、および E₂ 単独処置時の子宮内膜厚を標準化する際の基準値として利用することが可能であった。

卵巣摘出牛への P₄ 単独処置として、2 本の CIDR を用いて P₄ 処置を行ったところ、血中 P₄ 濃度は急速に増加し、その後徐々に P₄ 濃度は低下した (図 16a)。2 本の CIDR を腔内に挿入している間は、P₄ 濃度は 2 ng/ml 以上を維持することができた。この時の P₄ 濃度の推移は、過去の報告と同様であった [44]。本章の研究において実施した、CIDR を 2 本同時に挿入して 1 本ずつ抜去していく方法は、P₄ 濃度を急速に下げることなく極力時間をかけて P₄ 濃度を低下させ、かつ E₂ 濃度の上昇を伴わない状態を作出した場合、P₄ 感作された子宮内膜がどのように変化するかを観察するためであった。卵巣摘出牛に CIDR を挿入して P₄ 濃度を測定した試験では、CIDR 抜去後 24 時間以内に P₄ 濃度が最低値まで低下したことから [44]、2 本の CIDR を利用して段階的に低下する P₄ 濃度環境を作出した。2 本の CIDR 挿入後 5 日目 (術後 18 日目) に 2 本のうちの 1 本の CIDR を抜去した直後に P₄ 濃度は低下したが、残りの 1 本の CIDR を抜去する (術後 19 日目) まで血中 P₄ 濃度は 1 ng/ml 以上に維持された (図 16a)。CIDR 抜去を 1 本ずつにすることで P₄ 濃度の低下は階段状となったが、30 時間以上かけて低下する P₄ 濃度環境を作出することができた。子宮内膜厚は 2 本目の CIDR を抜去する 6 時間前より増加し始めたが (図 16c、表 11)、この時 E₂ 濃度の上昇はいっさい認められず (図 16b)、2 本目の CIDR 抜去後 30 時間でピーク値を示した。

P₄ 単独処置におけるこれらの結果から、P₄ 濃度の低下が子宮内膜厚増加開始の因子であることが示唆された。

卵巣摘出牛への P₄ および E₂ 併用処置として、2 本の CIDR と EB を用いて P₄-EB 処置を行ったところ、P₄ 濃度の変化は P₄ 単独処置時と同様であり、階段状ではあったが 30 時間以上かけて低下する P₄ 濃度環境を作出することができた (図 17a)。2 本目の CIDR 抜去と同時に EB 2 μg/kg BW を投与した直後より E₂ 濃度は上昇し始め (EB 投与 6 時間後)、2 本目の CIDR 抜去および EB 投与 12 時間後にピーク値を示した (表 12)。P₄-E₂ 併用処置においても、2 本目の CIDR 抜去および EB 投与の 12 時間前、すなわち、EB 投与により E₂ 濃度が上昇する以前に子宮内膜厚の増加開始を認め、P₄ 濃度の低下が子宮内膜厚増加開始の因子であることが示唆された。また、2 本目の CIDR 抜去および EB 投与の 18 時間後に子宮内膜厚がピークレベルに到達した (図 17c、表 12)。P₄-E₂ 処置における性ステロイドホルモン濃度および子宮内膜厚の推移は、第 I 章の 3. 結果 4) 誘起発情における PGF_{2α} 処置前後の P₄、E₂ 濃度および子宮内膜厚の変化 (表 6) に類似した結果を示し、P₄-E₂ 併用処置により誘起発情に近い状態を再現できたと判断された。P₄-E₂ 併用処置においては、CIDR 抜去後に P₄ 濃度が低下したことで子宮内膜厚が増加し始め、EB 投与による E₂ 濃度の上昇が誘起発情と同様の 1.5 倍以上の子宮内膜厚変化を生じた因子であると考えられた。

卵巣摘出牛への E₂ 単独処置として EB を処置したところ、統計学的に有意な E₂ 濃度の変化は見出されなかった (図 18b)。しかし、血中の平均 E₂ 濃度は発情の指標となる 10 pg/ml 以上を示し、EB 2 μg/kg BW を投与 12 時間後より子宮内膜厚は増加し始め、18 時間後にピークレベルに到達した (表 13)。EB 単独処置において子宮内膜厚の増加が認められたことから、低 P₄ 濃度環境下であれば、E₂ 濃度の上昇は子宮内膜厚の増加を促進することが

明らかとなった。

P₄ 単独処置、P₄-E₂ 併用処置の結果より、2 本の CIDR を使用した P₄ 単独処置および P₄-E₂ 併用処置において P₄ 濃度の推移には統計学的な差はなく、同様の P₄ 濃度環境を作出できたと判断された。また、P₄ 単独処置および P₄-E₂ 併用処置の双方において、1 本目の CIDR 抜去後に P₄ 濃度が階段状の低下を示し、2 本目の CIDR を抜去する以前、すなわち E₂ 濃度の上昇を全く伴わない状態で子宮内膜厚が増加し始めたことから（表 11 および 12）、P₄ 濃度の低下は子宮内膜厚の増加開始の因子であることが示唆された。しかしながら、EB を使用していない P₄ 単独処置時の子宮内膜厚のピーク値は 1.18 であり P₄-E₂ 併用処置時の 1.58 よりも小さく、2 本目の CIDR 抜去からピークレベル到達までの所要時間も 30 時間を要し、P₄-E₂ 併用処置時の 18 時間よりも長かったことより（表 14）、子宮内膜に強い浮腫を起こしてその厚さを増加させるためには E₂ 濃度の上昇が欠かせないと考えられた。P₄-E₂ 併用処置時と EB 単独処置時の E₂ 濃度および子宮内膜厚の変化には統計学的に差はなく、P₄ による前感作がなくても低 P₄ 環境下であれば E₂ 濃度の上昇は子宮内膜厚を増加させることが可能であり、子宮内膜厚増加（浮腫）作用は P₄ よりも強力であることが示唆された。

子宮内膜組織中の P 受容体および E 受容体 α の発現量は卵巣摘出後に有意に多くなった（図 20、発情期、黄体期および卵巣摘出後の無処置時の比較、a/b、 $P < 0.05$ ）。また、E 受容体 β の発現量は卵巣摘出後に多くなる傾向があった（ $P = 0.054$ ）。子宮内膜組織中の P 受容体および E 受容体の発現量は性ステロイドホルモン濃度環境に影響を受けるとされており、卵巣摘出後に卵巣由来の性ステロイドホルモンを喪失し、渴望状態となっていたことが推測され、代償的に P 受容体および E 受容体の発現量が増加したと考えられた。また、卵巣摘出後の子宮内膜組織中の P 受容体、E 受容体、VEGF

受容体および VEGF の発現量は、無処置、 P_4 単独処置、 P_4 - E_2 併用処置および E_2 単独処置期間のいずれのタイミングにおいても有意な増加は認められなかった。子宮内膜組織中の VEGF 受容体および VEGF の発現量は卵巣摘出前後で差はなかったが（図 20、発情期、黄体期および卵巣摘出後の無処置時の比較、 a/b 、 $P < 0.05$ ）、このことはすなわち、VEGF 受容体および VEGF は性ステロイドホルモン濃度に依存せずに、子宮内膜の血管内皮細胞に常に一定量発現している可能性が考えられた。有意な発現量の増加ではなかったものの、VEGF は P_4 - E_2 併用処置および E_2 単独処置時にその発現量が高まっていたことから（図 20）、 E_2 濃度の上昇と VEGF の上昇には相関関係がある可能性が示唆された。

本章の研究の結果より見出された、牛子宮内膜厚に関与する P_4 および E_2 の作用を表 15 および図 22 に模式的にまとめた。牛子宮内膜が浮腫状態になってその厚さが増加する一連の反応には P_4 濃度が重要であることが示唆された。黄体期の高 P_4 濃度は子宮内膜厚の増加に対して抑制的に作用し、たとえこの環境下で E_2 濃度が上昇しても子宮内膜厚は増加しなかった。 P_4 濃度の低下は子宮内膜厚の増加を誘引するが、この時の P_4 による反応の強さは E_2 濃度の上昇時の子宮内膜厚増加作用よりも程度は小さく、緩徐な反応であった。子宮内膜組織中の VEGF 受容体や VEGF は性ステロイドホルモン濃度に関わらず、常に一定量が発現されており、 P_4 は子宮内膜組織中の血管内皮細胞に存在する VEGF 受容体や VEGF の発現を調節することによって VEGF の血管透過性亢進作用を抑制し、子宮内膜厚の増加を抑制するわけではないと考えられた。図 22 で示したように、牛子宮内膜厚の増加抑制の機序には、 E_2 の VEGF に対する作用、VEGF が VEGF 受容体に結合する過程、VEGF 蛋白受容体複合体が MMP を分泌させる過程あるいは MMP の活性などを P_4 が抑制すると推測されたが、その詳細の解明にはさらなる

試験が必要と考えられた。P₄ 単独処置後に子宮内膜厚が増加した原因として、これらの P₄ に抑制されている可能性のある子宮内膜浮腫過程の作用が、P₄ 濃度の低下により抑制が解除され、子宮内膜浮腫発生過程の進行により軽微な子宮内膜厚の増加を呈した可能性が考えられた。牛の卵胞期に認められるような明らかな子宮内膜厚の増加（1.38～1.61 倍の増加、表 7 および 15）には、E₂ 濃度の上昇が不可欠であり、P₄ による前感作の有無に関わらず、低 P₄ 環境下であれば E₂ 濃度の上昇は子宮内膜厚を増加させると考えられた。本章の研究において卵巣摘出牛に対して EB 使用時（P₄-E₂ 併用処置および E₂ 単独処置時）に VEGF 発現量が多くなったこと、また、子宮内膜組織中の VEGF 発現量が黄体期より発情期に有意に多く発現していたことから、牛子宮内膜厚増加の調節には E₂ 濃度の上昇と VEGF との関係性が高いことが示唆された。

表15
子宮内膜厚に対する性ステロイドホルモンの作用

	卵巣摘出前	卵巣摘出後		
	高P ₄ + 高E ₂	P ₄ 単独処置	P ₄ -E ₂ 併用処置	E ₂ 単独処置
処置内容	黄体期 + EB	CIDR	CIDR - EB	EB
ホルモン環境	P ₄ + E ₂	P ₄ ↓	P ₄ ↓ E ₂ ↑	E ₂ ↑
子宮内膜厚増加	—	↑	↑↑↑	↑↑↑
子宮内膜厚変化率	増加せず	1.18	1.58	1.51

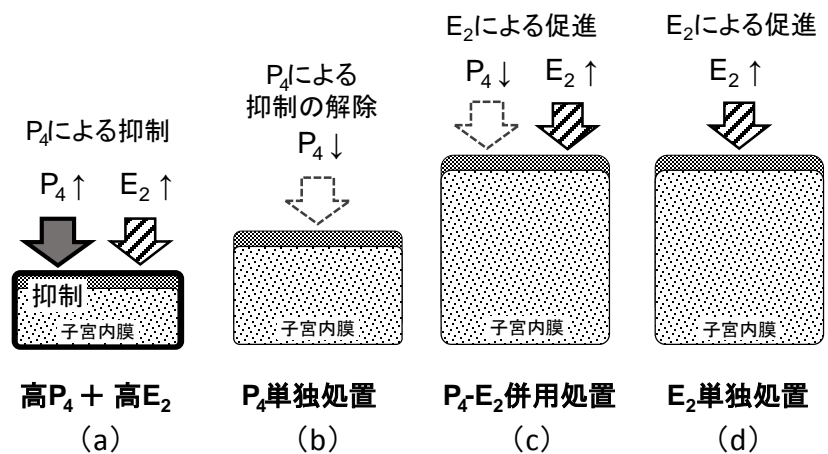


図22. 子宮内膜厚の変化とホルモン環境

(a) P₄濃度が高い環境ではP₄の抑制作用により、子宮内膜厚の増加は起こらない。(b) P₄濃度が低下すると子宮内膜厚が軽微に増加。(c) P₄濃度が低い環境にE₂濃度の上昇が起こると子宮内膜厚の増加率が大きい。(d) E₂単独でも子宮内膜厚を増加させる。(c)および(d)では子宮内膜組織中のVEGF発現が増加する傾向。

5. 小括

牛子宮内膜厚の調節に関わるプロジェステロン (P_4) およびエストロジオール (E_2) 作用機序を明らかにするため、非搾乳牛 10 頭を供試し、高 P_4 環境 (黄体期) における E_2 処置を実施した。次に、供試牛のうち 4 頭の両卵巢を摘出した後、 P_4 単独処置、 P_4 および E_2 併用処置、 E_2 単独処置を行った。それぞれのホルモン処置試験で子宮内膜の超音波検査、ホルモン測定および子宮内膜組織中のプロジェステロン (P) 受容体、エストロジオン (E) 受容体 α 、 E 受容体 β 、血管内皮細胞成長因子 ($VEGF$) 受容体 1、 $VEGF$ 受容体 2 および $VEGF$ の発現量を測定し、 P_4 および E_2 による子宮内膜への作用とその機序を検討した。

高 P_4 環境 (黄体期) で E_2 濃度が上昇しても子宮内膜厚の増加は認められなかった。しかし、 P_4 単独処置および P_4 - E_2 併用処置においては P_4 濃度が低下し始めた後、 E_2 濃度の上昇を伴わずに子宮内膜厚が増加し始めた。また、 P_4 - E_2 併用処置および E_2 単独処置においては P_4 単独処置時よりも急速かつ顕著な子宮内膜厚の増加を認めた。 P 受容体、 E 受容体 α および受容体 β の発現量は卵巢摘出による性ステロイドホルモン低下の影響を受けて増加したが、卵巢摘出後の外因性性ステロイドホルモン処置による発現量に有意な差は認められなかった。 $VEGF$ 受容体 1、 $VEGF$ 受容体 2 および $VEGF$ の発現量は卵巢摘出前後でも変わらず、 E_2 処置後に $VEGF$ の発現量が増加する傾向にあった。したがって、 P_4 濃度の低下は子宮内膜厚増加を誘引すること、および P_4 には $VEGF$ やその受容体の発現量の調節ではない機序によって子宮内膜厚の増加を抑制する作用があることが明らかとなった。 E_2 には子宮内膜厚増加を促進する作用があり、 $VEGF$ を介して子宮内膜に浮腫を起こすことが示唆された。

総括

哺乳類の子宮内膜は胚の着床の場であり、また胎盤を形成し妊娠を維持するために極めて重要な組織である。乳牛の高産乳化に伴って繁殖成績が低下し続ける原因には、高産乳牛の肝臓における性ステロイドホルモン代謝の亢進が挙げられている。乳牛の高産乳化の影響は性ステロイドホルモン濃度に関連して変化する子宮内膜にも及び、繁殖成績の低下の要因となっている可能性がある。牛の子宮内膜は卵胞期において浮腫によってその厚さを増し、黄体期に元の厚さに戻るという変化を繰り返す。したがって、子宮内膜厚の調節には性ステロイドホルモンの関与が示唆されているがその詳細は明らかにされておらず、高産乳化に伴う性ステロイドホルモン代謝亢進の影響も評価困難な状態である。また、牛の子宮内膜厚と受胎性に関する研究報告は少なく、牛子宮内膜厚の測定方法も確立していないのが現状である。乳牛の子宮内膜を客観的に評価する方法を確立し、性ステロイドホルモンの子宮内膜に対する作用を明らかにすることは、生産現場における子宮内膜評価の一助となり、低迷する繁殖成績の改善に貢献できると考え、以下の研究を展開した。

第 I 章においては、発情周期を通して牛子宮内膜の超音波検査を行い、個体毎に厚さの異なる子宮内膜厚を客観的に評価する測定方法を検討した。また、その手法を利用して自然発情および誘起発情における子宮内膜厚の形態学的変化を観察し、子宮内膜厚の変化、プロジェステロン (P_4) 濃度およびエストラジオール (E_2) 濃度の変化を解析した。その結果、左右子宮角の子宮内膜領域の長径および短径の平均値を子宮内膜厚とし、すべての子宮内膜厚測定値を黄体期の測定値に対する変化率に換算する手法によって、個体差を補正することが可能となった。自然発情においては、

P_4 濃度の低下、 E_2 濃度の上昇、子宮内膜厚の増加の順に変化を認めた。排卵を0時間とした誘起発情においては P_4 濃度の低下および子宮内膜厚の増加は同時に開始し、次いで E_2 濃度が上昇したが、プロスタグランジン(PG) $F_{2\alpha}$ 処置を0時間とした場合、 P_4 濃度の低下、 E_2 濃度の上昇、子宮内膜厚の増加の開始は $PGF_{2\alpha}$ 処置後同時であった。この結果より、 P_4 濃度の低下は子宮内膜増加開始として作用し、 E_2 濃度の上昇は子宮内膜厚の増加を促進することが示唆された。また、誘起発情における子宮内膜厚は自然発情よりも有意に厚くなったが、これは $PGF_{2\alpha}$ 処置後の P_4 濃度の低下および E_2 濃度の上昇が同時かつ急速に起きたためであると考えられた。

第II章においては、 P_4 および E_2 の子宮内膜に対する作用機序を明らかにするため、高 P_4 環境(黄体期)における E_2 処置および、卵巣摘出牛に対する P_4 単独処置、 P_4 および E_2 併用処置、 E_2 単独処置を行い、血中性ステロイドホルモン濃度および子宮内膜厚の変化を観察した。また、子宮内膜組織中のプロジェステロン(P)受容体、エストロジェン(E)受容体 α 、E受容体 β 、血管内皮細胞成長因子(VEGF)受容体1、VEGF受容体2およびVEGFの発現量を測定した。その結果、高 P_4 環境において E_2 濃度が上昇しても子宮内膜厚は増加せず、 P_4 は子宮内膜厚増加を抑制する作用を有することが示唆された。 P_4 単独処置および P_4 - E_2 併用処置においては P_4 濃度が低下し始めてから E_2 濃度の上昇を伴わない状態で子宮内膜厚の増加を認めた。これらのことから、子宮内膜厚の増加は P_4 濃度の低下によって誘引されると推察された。 P_4 - E_2 併用処置および E_2 単独処置において、子宮内膜厚は同等の増加を示したことから、 E_2 濃度の上昇は P_4 の前感作がなくとも子宮内膜厚を増加促進させると考えられた。一方、P受容体、E受容体 α および受容体 β の発現量は卵巣摘出後に増加し、卵巣摘出による性ステロイドホルモン濃度低下の影響を受けたが、卵巣摘出後の外因性性ス

ステロイドホルモン処置による有意な増減は認められなかった。VEGF 受容体 1、VEGF 受容体 2 および VEGF の発現量は卵巣摘出前後でも変わらなかったが、E₂ 処置後に VEGF の発現量が増加する傾向にあった。したがって、P₄ による子宮内膜厚の増加抑制作用は、性ステロイドホルモン受容体、VEGF 受容体あるいは VEGF の発現調節ではない機序、すなわち、E₂ の VEGF に対する作用、VEGF が VEGF 受容体に結合する過程、VEGF 蛋白受容体複合体がマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を分泌させる過程あるいは MMP の活性などの抑制による機序が推察され、E₂ は VEGF を介して子宮内膜に浮腫を起こし、子宮内膜厚増加を促進する作用を有することが示唆された。

本研究によって、牛子宮内膜厚測定方法が確立され、個体差を補正して子宮内膜厚の変化を比較検討することが可能となった。P₄ は性ステロイドホルモン受容体、VEGF 受容体および VEGF の発現調節ではない機序によって子宮内膜厚の増加を抑制する作用を有し、P₄ 濃度の低下は子宮内膜厚の増加開始を誘引することが示唆された。また、E₂ は VEGF の増加を介して子宮内膜厚の増加を促進する作用を有し、P₄ の前感作の有無によらず子宮内膜厚を増加させると考えられた。これらの P₄ および E₂ の作用が同時に起きた誘起発情の子宮内膜厚は自然発情よりも有意に増加したと推察された。本研究結果を基に、乳牛の人工授精、受精卵移植あるいは繁殖障害発生時の子宮内膜を評価し、受胎性や診断指針を見出すための基礎データを蓄積すること、また、子宮内膜厚調節機構の異常と低受胎畜との関係等を調査することが次なる課題である。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、細部に至るまで終始ご指導賜り、ご校閲をいただいた、酪農学園大学大学院獣医学研究科の生産動物医療学分野内科学教室 I・田島誉士教授、獣医衛生学教室・永幡肇教授、獣医薬理学教室・北澤多喜雄教授に一方ならぬ謝意を表します。また、大学院進学以前より素晴らしい研究環境を与えてくださると共に、不出来な筆者に対して常に忍耐強く懇切丁寧なご指導ご助言をくださいました北海道大学大学院獣医学研究院繁殖学教室・片桐成二教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の実施にあたり、研究遂行を支えて頂いた酪農学園大学獣医生化学教室・岩野英知教授、酪農学園大学生産動物医療学分野動物生殖学ユニット・中田健教授、同森好政晴准教授、同澤向豊 元教授ならびに大分大学医学部医学科全学研究推進機構・奥山みなみ助教に深謝いたします。

本研究の材料採取にご協力していただいた酪農学園大学フィールド教育センター酪農ステーションのスタッフの皆様に感謝の意を表します。また、本研究の意義を理解していただき、毎日早朝から深夜の採材まで全力で協力していただいた NOSAI 宮崎・秋吉俊獣医師、NOSAI 熊本・井上文博獣医師、ならびに酪農学園大学生産動物医療分野動物生殖学ユニットの北村亘氏に感謝申し上げます。さらに、材料採取ならびに技術提供に多大なるご協力をいただいた同ユニットの卒業生ならびに学生の方々に深く感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり、陰ながら筆者を支えてくださった酪農学園大学生産動物医療学分野・佐藤綾乃嘱託助手、NOSAI 道東・石川行一獣医師ならびに全国の友人たちに心より感謝いたします。

引用文献

1. Abdalla, H. I., Brooks, A. A., Johnson, M. R., Kirkland, A., Thomas, A. and Studd, J. W. 1994. Endometrial thickness: a predictor of implantation in ovum recipients? *Hum. Reprod.* **9**: 363–365.
2. Aghajanova, L., Stavreus-Evers, A., Nikas, Y., Hovatta, O. and Landgren, B. M. 2003. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil. Steril.* **79**: 808–814.
3. Alam, V., Bernardini, L., Gonzales, J., Asch, R. H. and Balmaceda, J. P. 1993. A prospective study of echographic endometrial characteristics and pregnancy rates during hormonal replacement cycles. *J. Assist. Reprod. Genet.* **10**: 215–219.
4. Astwood, E. B. 1938. A six-hour assay for the quantitative determination of estrogen. *Endocrinology* **23**: 25–31.
5. Baerwald, A. R. and Pierson, R. A. 2004. Endometrial development in association with ovarian follicular waves during the menstrual cycle. *Ultrasound Obs. Gynecol.* **24**: 453–460.
6. Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L. and Palmer, C. W. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* **69**: 714–723.
7. Basir, G. S., O, W. S., So, W. W., Ng, E. H. and Ho, P. C. 2002. Evaluation of cycle-to-cycle variation of endometrial responsiveness using transvaginal sonography in women undergoing assisted reproduction. *Ultrasound Obs. Gynecol.* **19**: 484–489.

8. Bates, D. O. and Harper, S. J. 2002. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul. Pharmacol.* **39**: 225–237.
9. Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W. and Einspanier, R. 2000. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* **63**: 1106–14.
10. Bonafos, L. D., Kot, K. and Ginther, O. J. 1995. Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology* **43**: 713–721.
11. Cairoli, F., Mollo, A., Veronesi, M. C., Renaville, B., Faustini, M. and Battocchio, M. 2006. Comparison between cloprostenol-induced and spontaneous oestrus fertility in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* **41**: 175–179.
12. Cerri, R. L., Rutigliano, H. M., Chebel, R. C. and Santos, J. E. 2009. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* **137**: 813–823.
13. Chao, L. M., Sato, S., Yoshida, K., Kawano, Y., Kojima, T. and Kubota, C. 2010. Comparison of oestrous intensity between natural oestrus and oestrus induced with Ovsynch based treatments in Japanese Black cows. *Reprod. Domest. Anim.* **45**: 168–170.
14. Charnock-Jones, D. S., Sharkey, A. M., Rajput-Williams, J., Burch, D., Schofield, J. P., Fountain, S. A., Boocock, C. A. and Smith, S. K. 1993. Identification and localization of alternately spliced mRNAs

- for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol. Reprod.* **48**: 1120–1128.
15. Check, J. H., Nowroozi, K., Choe, J. and Dietterich, C. 1991. Influence of endometrial thickness and echo patterns on pregnancy rates during in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **56**: 1173–1175.
 16. Coulam, C. B., Bustillo, M., Soenksen, D. M. and Britten, S. 1994. Ultrasonographic predictors of implantation after assisted reproduction. *Fertil. Steril.* **62**: 1004–1010.
 17. Cullinan-Bove, K. and Koos, R. D. 1993. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* **133**: 829–837.
 18. DesCôteaux, L., Chastant-Maillard, S., Gnemmi, G., Colloton, J. D., and Bollwein, H. 2010. Chapter 5: Bovine uterus. pp. 61-65. *In*: Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography, (DesCôteaux, L., Colloton, J. and Gnemmi, G. eds.) Wiley-Blackwell publishing, Ames. IA. U.S.A.
 19. Dickey, R. P., Olar, T. T., Curole, D. N., Taylor, S. N. and Rye, P. H. 1992. Endometrial pattern and thickness associated with pregnancy outcome after assisted reproduction technologies. *Hum. Reprod.* **7**: 418–421.
 20. Ferrara, N. 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell*

- Physiol.* **280**: C1358-66.
21. Ford, S. P., Chenault, J. R. and Echterkamp, S. E. 1979. Uterine blood flow of cows during the oestrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. *J. Reprod. Fertil.* **56**: 53–62.
 22. Gabler, C., Einspanier, A., Schams, D. and Einspanier, R. 1999. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its corresponding receptors (flt-1 and flk-1) in the bovine oviduct. *Mol. Reprod. Dev.* **53**: 376–383.
 23. Ginther, O. J., Kastelic, J. P. and Knopf, L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* **20**: 187–200.
 24. Gonen, Y. and Casper, R. F. 1990. Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF). *J. Vitro. Fert. Embryo Transf.* **7**: 146–152.
 25. Gonen, Y., Casper, R. F., Jacobson, W. and Blankier, J. 1989. Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: a possible predictor of implantation in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **52**: 446–450.
 26. Greb, R. R., Heikinheimo, O., Williams, R. F., Hodgen, G. D. and Goodman, A. L. 1997. Vascular endothelial growth factor in primate endometrium is regulated by oestrogen-receptor and progesterone-receptor ligands in vivo. *Hum. Reprod.* **12**: 1280–1292.
 27. Griffin, P. G. and Ginther, O. J. 1991. Dynamics of uterine diameter

- and endometrial morphology during the estrous cycle and early pregnancy in mares. *Anim. Reprod. Sci.* **25**: 133–142.
28. Hansel, W. and Asdell, S. A. 1951. The effects of estrogen and progesterone on the arterial system of the uterus of the cow. *J. Dairy Sci.* **34**: 37–44.
29. Hastings, J. M., Licence, D. R., Burton, G. J., Charnock-Jones, D. S. and Smith, S. K. 2003. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelial proliferation induced by 17 β -estradiol in the mouse uterus. *Endocrinology* **144**: 326–334.
30. Hatayama, H., Kanzaki, H., Iwai, M., Kariya, M., Fujimoto, M., Higuchi, T., Kojima, K., Nakayama, H., Mori, T. and Fujita, J. 1994. Progesterone enhances macrophage colony-stimulating factor production in human endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology* **135**: 1921–1927.
31. Hayes, K. E., Pierson, R. A., Scraba, S. T. and Ginther, O. J. 1985. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. *Theriogenology* **24**: 465–477.
32. Hyder, S. M., Huang, J. C., Nawaz, Z., Boettger-Tong, H., Mäkelä, S., Chiappetta, C. and Stancel, G. M. 2000. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ. Health Perspect. Suppl* **108**: 785–90.
33. Isaacs, J. D., Wells, C. S., Williams, D. B., Odem, R. R., Gast, M. J. and Strickler, R. C. 1996. Endometrial thickness is a valid monitoring parameter in cycles of ovulation induction with menotropins alone. *Fertil. Steril.* **65**: 262–266.

34. Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L., Smith, G. W., Hou, X., Davis, J. S., Lonergan, P., Evans, A. C. and Ireland, J. J. 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod.* **80**: 1272–1281.
35. Johnson, M. L., Redmer, D. A. and Reynolds, L. P. 1997. Effects of ovarian steroids on uterine growth, morphology, and cell proliferation in ovariectomized, steroid-treated ewes. *Biol. Reprod.* **57**: 588–596.
36. 神崎秀陽 1998. 子宮内膜の周期性変化と月経(女性性機能の生理). *日本産婦人科学会誌* **50**: 107–110.
37. Kariya, M., Kanzaki, H., Hanamura, T., Imai, K., Narukawa, S., Inoue, T., Hatayama, H. and Mori, T. 1994. Progesterone-dependent secretion of macrophage colony-stimulating factor by human endometrial stromal cells of nonpregnant uterus in culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**: 86–90.
38. Kasius, A., Smit, J. G., Torrance, H. L., Eijkemans, M. J., Mol, B. W., Opmeer, B. C. and Broekmans, F. J. 2014. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Updat.* **20**: 530–541.
39. Khalifa, E., Brzyski, R. G., Oehninger, S., Acosta, A. A. and Muasher, S. J. 1992. Sonographic appearance of the endometrium: the predictive value for the outcome of in-vitro fertilization in stimulated cycles. *Hum. Reprod.* **7**: 677–680.

40. Kholkute, S. D., Katkam, R. R., Nandedkar, T. D. and Puri, C. P. 2000. Leukaemia inhibitory factor in the endometrium of the common marmoset *Callithrix jacchus*: localization, expression and hormonal regulation. *Mol. Hum. Reprod.* **6**: 337–43.
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. Klebe, U., Moltz, L. and Pickartz, H. 1983. Effects of cyproterone acetate and ethinylestradiol on endometrial histology. *Arch. Gynecol.* **234**: 113–20.
43. Kummer, V., Zralý, Z., Canderle, J. and Masková, J. 1995. Light and scanning electron microscopy of endometrium of ovariectomized cows treated with oestradiol. *Vet. Med. (Praha)*. **40**: 265–271.
44. Long, S. T., Yoshida, C. and Nakao, T. 2009. Plasma progesterone profile in ovariectomized beef cows after intra-vaginal insertion of new, once-used or twice-used CIDR. *Reprod. Domest. Anim.* **44**: 80–82.
45. López-Helguera, I., López-Gatius, F. and Garcia-Ispuerto, I. 2012. The influence of genital tract status in postpartum period on the subsequent reproductive performance in high producing dairy cows. *Theriogenology* **77**: 1334–1342.
46. Lopez, H., Satter, L. D. and Wiltbank, M. C. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* **81**: 209–223.
47. Maracek, I., Elecko, J., Hajurka, J., Choma, J., Bekeová, E. and

- Jusíková, A. 1984. Micromorphology of the endometrium of dairy cows after estrus synchronization with cloprostenol. *Vet. Med.* **29**: 679–688.
48. Martin, I., Torres Neto, R., Oba, E., Buratini, J., Binelli, M., Laufer-Amorim, R. and Ferreira, J. C. P. 2008. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. *Reprod. Domest. Anim.* **43**: 415–421.
49. Mussard, M. L., Burke, C. R., Behlke, E. J., Gasser, C. L. and Day, M. L. 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J. Anim. Sci.* **85**: 937–943.
50. 永田俊一, 近藤昌弘, 金子浩之, 荒木一司, 南保泰雄, 及川正明, 渡辺元と田谷一善 1996. アセトニトリル・n-ヘキサン分配法を用いた低濃度の血中エストラジオール-17 β 測定のための簡便な脱脂法. *J. Reprod. Dev.* **42**: 43–49.
51. Nakada, K., Moriyoshi, M., Nakao, T. 2001. Changes in peripheral levels of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in prepubertal heifers after estradiol treatment. *J. Reprod. Dev.* **47**: 341–349.
52. Noyes, N., Liu, H. C., Sultan, K., Schattman, G. and Rosenwaks, Z. 1995. Endometrial thickness appears to be a significant factor in embryo implantation in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* **10**: 919–922.

53. O'Rourke, M., Diskin, M. G., Sreenan, J. M. and Roche, J. F. 2000. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **59**: 1–12.
54. 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.
55. Perry, G. A., Smith, M. F., Lucy, M. C., Green, J. A., Parks, T. E., MacNeil, M. D., Roberts, A. J. and Geary, T. W. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 5268–5273.
56. Pierson, R. A. and Ginther, O. J. 1987. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**: 995–1001.
57. Priedkalns, J. Leiser R. 1998. Female reproductive system. pp. 257-265. *In*: Textbook of veterinary histology. (Dellmann, H.D. and Eurell, J. A. eds.), Wiley-Blackwell publishing, Ames. IA. U.S.A.
58. Pryce, J. E., Royal, M. D., Garnsworthy, P. C. and Mao, I. L. 2004.: Fertility in the high-producing dairy cow. *Livest. Prod. Sci.* **86**: 125–135.
59. Rashidi, B. H., Sadeghi, M., Jafarabadi, M. and Tehrani Nejad, E. S. 2005. Relationships between pregnancy rates following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection and endometrial

- thickness and pattern. *Eur. J. Obs. Gynecol. Reprod. Biol.* **120**: 179–184.
60. Reynolds, L. P., Kirsch, J. D., Kraft, K. C., Knutson, D. L., McClafin, W. J. and Redmer, D. A. 1998. Time-course of the uterine response to estradiol-17beta in ovariectomized ewes: uterine growth and microvascular development. *Biol. Reprod.* **59**: 606–612.
61. Richter, K. S., Bugge, K. R., Bromer, J. G. and Levy, M. J. 2007. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. *Fertil. Steril.* **87**: 53–59.
62. 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.
63. Rockwell, L. C., Pillai, S., Olson, C. E. and Koos, R. D. 2002. Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen-induced uterine edema and implantation in rodents. *Biol. Reprod.* **67**: 1804–1810.
64. Sangsritavong, S., Combs, D. K., Sartori, R., Armentano, L. E. and Wiltbank, M. C. 2002. High feed Intake increases liver blood Flow and metabolism of progesterone and estradiol-17β in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* **85**: 2831–2842.
65. Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. and Gilbert, R. O. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* **65**: 1516–1530.

66. Sheldon, I. M. and Noakes, D. E. 1998. Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet. Rec.* **142**: 575–579.
67. Sheldon, I. M., Noakes, D. E. and Dobson, H. 2000. The influence of ovarian activity and uterine involution determined by ultrasonography on subsequent reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* **54**: 409–419.
68. Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N. and Dobson, H. 2002. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet. Rec.* **151**: 531–534.
69. 渋谷 正史 2004. 血管新生とその制御－Vegfと受容体を中心に－. *日本炎症・再生医学会* **24**: 144–153.
70. Shifren, J. L., Tseng, J. F., Zaloudek, C. J., Ryan, I. P., Meng, Y. G., Ferrara, N., Jaffe, R. B. and Taylor, R. N. 1996. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 3112–3118.
71. Shimizu, T. and Miyamoto, A. 2007. Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120 and Flk-1, its receptor, in bovine granulosa cells. *Anim. Reprod. Sci.* **102**: 228–237.
72. Shweiki, D., Itin, A., Neufeld, G., Gitay-Goren, H. and Keshet, E. 1993. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **91**: 2235–2243.

73. Sirois, J. and Fortune, J. E. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* **127**: 916–925.
74. Souza, A. H., Cunha, A. P., Caraviello, D. Z. and Wiltbank, M. C. 2005. Profiles of circulating estradiol-17 β after different estrogen treatments in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.* **2**: 224–232.
75. Souza, A. H., Silva, E. P., Cunha, A. P., Gümen, A., Ayres, H., Brusveen, D. J., Guenther, J. N. and Wiltbank, M. C. 2011. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology* **75**: 722–733.
76. Strelow, L. W. 1993. A retrospective analysis of the effect of prostaglandin F2a on conception rates in commercial dairy herds. *Theriogenology* **40**: 199–204.
77. Tasaki, Y., Nishimura, R., Shibaya, M., Lee, H. Y., Acosta, T. J. and Okuda, K. 2010. Expression of VEGF and its receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: effects of VEGF on prostaglandin production in endometrial cells. *J. Reprod. Dev.* **56**: 223–229.
78. Tenhagen, B. A., Drillich, M., Surholt, R. and Heuwieser, W. 2004. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations. *J. Dairy Sci.* **87**: 85–94.
79. Vasconcelos, J. L., Sartori, R., Oliveira, H. N., Guenther, J. G. and Wiltbank, M. C. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle

- reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* **56**: 307–314.
80. Weissman, A., Gotlieb, L. and Casper, R. F. 1999. The detrimental effect of increased endometrial thickness on implantation and pregnancy rates and outcome in an in vitro fertilization program. *Fertil. Steril.* **71**: 147–149.
81. Wijayagunawardane, M. P. B., Kodithuwakku, S. P., Yamamoto, D. and 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. Dev.* **72**: 511–520.
82. Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C., Noakes, D. E., Dobson, H. and Sheldon, I. M. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* **63**: 102–117.
83. Wolff, E. F., Vahidi, N., Alford, C., Richter, K. and Widra, E. 2013. Influences on endometrial development during intrauterine insemination: clinical experience of 2,929 patients with unexplained infertility. *Fertil. Steril.* **100**: 194–9.e1.
84. Woolard, J., Wang, W. Y., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., Cui, T. G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J. D., Whittles, C. E., Mushens, R. E., Gillatt, D. A., Ziche, M., Harper, S. J. and Bates, D. O. 2004. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice

- variant: Mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer. Res.* **64**: 7822–7835.
85. Wu, J. and Zhu, Y. 2008. Effects of estrogen and estrogenic compounds on cognition in ovariectomized rats. *Climacteric* **11**: 212–220.
86. Xu, Z. Z., Burton, L. J. and Macmillan, K. L. 1997. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF₂alpha and progesterone. *Theriogenology* **47**: 687–701.
87. Yamada, T., Higuchi, M. and Nakanishi, N. 2013. Plasma 8-Isoprostane Concentrations and Adipogenic and Adipokine Gene Expression Patterns in Subcutaneous and Mesenteric Adipose Tissues of Fattening Wagyu Cattle. *J. Vet. Med. Sci.* **75**: 1021–27.
88. Yanagawa, Y., Matsuura, Y., Suzuki, M., Saga, S., Okuyama, H., Fukui, D., Bando, G., Nagano, M., Katagiri, S., Takahashi, Y. and Tsubota, T. 2015. Accessory corpora lutea formation in pregnant Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) investigated by examination of ovarian dynamics and steroid hormone concentrations. *J. Reprod. Dev.* **61**: 61–66.
89. Yang, M. Y. and Fortune, J. E. 2007. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **74**: 1095–1104.