

## 博士学位論文

### 学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 杉浦 智親

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 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

#### 審査委員

主査 教授 田島 誉士（生産動物内科学Ⅰ）

副査 教授 永幡 肇（獣医衛生学）

副査 教授 北澤多喜雄（獣医薬理学）

## 学位論文要旨

### 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

獣医学研究科 獣医学専攻博士課程  
生産動物医療学分野 杉浦智親

哺乳類の子宮内膜は胚の着床の場であり、胎盤を形成し妊娠維持のために極めて重要な組織である。人の子宮内膜は月経周期において剥離と増生を繰り返し、産婦人科領域において子宮内膜の厚さ（子宮内膜厚）は受胎性を評価する指標の一つとなっている。しかし、牛の子宮内膜は剥離せず、卵胞期に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。また、牛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されていないのが現状である。一方、齧歯類や霊長類の子宮内膜厚の増加にはプロジェステロン（ $P_4$ ）およびエストラジオール（ $E_2$ ）が関与し、いずれも血管内皮細胞成長因子（VEGF）を介して子宮内膜厚を増加させる作用が報告されている。発情周期に応じて変化する牛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、その調節機序は明らかにされていない。高産乳化に伴って低下し続ける乳牛の繁殖成績の原因の一つとして、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、その影響は子宮内膜にも及んでいる可能性がある。性ステロイドホルモンによる牛子宮内膜厚調節機序の解明は、牛の子宮内膜厚と受胎性との関係を追究する上で必要不可欠である。したがって、本研究では、個体毎に厚さの異なる乳牛の子宮内膜厚の発情周期における変化を客観的に比較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とその機序を検討した。

第 I 章において、発情周期を通して牛子宮内膜の超音波検査を行い、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を測定し、子宮内膜厚の変化、 $P_4$ および $E_2$ 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、誘起発情においてはプロスタグランジン（PG） $F_{2\alpha}$ 処置後、 $P_4$ 濃度の低下、 $E_2$ 濃度の上昇、子宮内膜厚の増加が同時に起こった。この結果より、 $P_4$ 濃度の低下は子宮内膜増加開始の合図となり、

$E_2$ 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、卵巣摘出牛に対する  $P_4$ 単独処置、 $P_4$ - $E_2$ 併用処置および  $E_2$ 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 $\alpha$ 、E受容体 $\beta$ 、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、 $P_4$ が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開始を認めた。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 $\alpha$ および受容体 $\beta$ 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、 $E_2$ 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、 $P_4$ 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であることが推察された。また、 $E_2$ 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。 $P_4$ 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、 $P_4$ 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、 $E_2$ 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、 $P_4$ 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  $P_4$ および  $E_2$ 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厚を評価し、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。

# 論文審査の要旨および結果

## 1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

### 論文の概要について

本論文は、乳牛の受胎性を向上させることを目的として、受胎性を評価する指標の一つになる子宮内膜の厚さ(子宮内膜厚)の客観的な比較評価法を確立し、性ステロイドホルモンの子宮内膜に対する作用とその機序を検討した。繁殖検診でも活用されている超音波画像診断装置を利用して、子宮内膜厚の簡便かつ客観的な測定法が確立された。また、これを利用して発情周期における子宮内膜厚の変化と各種バイオマーカーの変化とを経時的に観察することによって、性ステロイドホルモンによる新たな子宮内膜厚調節機序の可能性を見いだした。

### 研究の背景と目的

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。人の子宮内膜は月経周期において剥離と増生を繰り返し、子宮内膜厚は受胎性を評価する指標の一つとなっている。しかし、牛の子宮内膜は人の子宮内膜のように剥離せず、卵胞期に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。また、牛子宮内膜厚と受胎性に関する研究報告は限られ、牛子宮内膜厚の測定方法も確立されていないのが現状である。一方、齧歯類や霊長類の子宮内膜厚の増加にはプロジェステロン (P4) およびエストラジオール (E2) が関与し、いずれも血管内皮細胞成長因子 (VEGF) を介して子宮内膜厚を増加させる作用が報告されている。性ステロイドホルモンによる牛子宮内膜厚調節機序の解明は、今後牛の子宮内膜厚と受胎性との関係を追究する上で必要不可欠である。したがって、本論文においては、個体毎に厚さの異なる乳牛の子宮内膜厚の発情周期における変化を客観的に比較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とその機序を検討した。

### 研究の成果

第I章において、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、P4濃度およびE2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、P4濃度の低下、E2濃度の上昇、子宮内膜厚の増加の順に変化を認め、誘起発情においてはプロスタグランジン (PG) F2 $\alpha$  処置後、P4濃度の低下、E2濃度の上昇、子宮内膜厚の増加が同時に起こった。これらの結果より、P4濃度の低下は子宮内膜増加開始の合

図となり、E2 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 PGF2 $\alpha$  処置後の P4 濃度の低下および E2 濃度の上昇が同時かつ急速に起きたことによるものと考えられた。

第 II 章においては、P4 および E2 の子宮内膜に対する作用機序を明らかにするため、高 P4 環境（黄体期）における E2 処置、卵巣摘出牛に対する P4 単独処置、P4-E2 併用処置および E2 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  $\alpha$ 、E 受容体  $\beta$ 、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 P4 環境において E2 濃度が上昇しても子宮内膜厚は増加せず、P4 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。P4 単独処置および P4-E2 併用処置においては P4 濃度が低下し始めてから E2 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 P4 濃度の低下によって誘引されると推察された。P4-E2 併用処置および E2 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、E2 濃度の上昇は P4 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  $\alpha$  および  $\beta$  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。E2 は VEGF を介して子宮内膜に浮腫を起し、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。

## 研究の評価

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客観的に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。さらに、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することを示した。これらの検討結果は、乳牛の受胎性向上のために大いに活用できるものと期待された。

以上のことから、杉浦 智親 氏は博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

## 2 最終試験の結果

審査委員3名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2018年2月7日

### 審査委員

主査 教授 田島 誉士

副査 教授 永幡 肇

副査 教授 北澤多喜雄