

ブタ子宮の神経支配と薬物反応性の筋層差と部位差

— と畜場標本を用いての検討 —

北 澤 多喜雄・種 池 哲 朗・曹 金 山*

Smooth muscle layer- and region-dependent differences in autonomic innervation and responsiveness to bioactive substances in the porcine uterus

Takio KITAZAWA, Tetsuro TANEIKE and Jinshan CAO*
(Accepted 9 December 2021)

1) はじめに

家畜において子宮運動を制御する薬物は、分娩時期の人為的コントロールや早産の防止などを目的として多くの場合人体薬が使われているが、子宮運動は、種差が著しい子宮（筋）形態、支配神経、発現するホルモン受容体によって影響を受けるために、対象となる動物の子宮を用いて神経支配、薬物反応性、収縮調節機構等を解析し、これを基にその動物の子宮に適した子宮運動調節薬を使用することが肝要と考えられる。また、得られた結果を基に新しいコンセプトの子宮運動調節薬が生まれる可能性もある。

ブタ子宮は双角子宮であり、図1に示したような形態を有している。この形態からブタ子宮は頸部、体部と長い角部に区分することができる。また、いずれの子宮部位においても長軸方向に走る縦走筋と横軸方向に走る輪走筋の分離が容易であり、各部位での縦走筋、輪走筋の薬物反応性や神経支配を調べることが可能である（Taneike et al., 1991）。

我々はこれまでと畜場から得たブタ子宮を利用して子宮各部位の輪走筋、縦走筋の自律神経支配および薬物反応性を機能的実験、組織化学的実験および生化学的実験から明らかにしてきた（Taneike et al., 1991, 1994, 1995; Kitazawa et al., 1997, 1998, 1999, 2000, 2001a, 2001b; Cao et al., 2002, 2004, 2005; Nakamura et al., 2008）。今回は、その結果の概要を述べブタ子宮では筋層と子宮部位により薬物反応性と自律神経支配に差があることを示していく。と畜場材料を使用しての実験は実験動物を使用しないので、実験目的によっては実験動物数の削減につながり、子宮に限らず有用なアプローチになると考える。

子宮筋の薬物反応性は性周期によって変化することが予想されるが、本実験では採材時の卵巣の状態を見て未経産で発情前期のものを選別して実験に使用しているため、性周期による薬物反応性の変化などは検討ができないという側面がある。

2) 自律神経支配と神経伝達物質反応性

子宮機能は他の多くの臓器と同じく、副交感神経と交感神経によって2重拮抗支配を受けている。副交感神経は仙部から出る骨盤神経で、choline 作動性の節後神経が子宮を支配する。一方、交感神経は腰部部から出た節前神経が腸間膜または頸部神経節でadrenaline 作動性の節後神経に乗り換え子宮を支配している（Bell, 1972; Garfield, 1986; Bulat et al., 1989）。そこでまずブタ子宮の神経支配を明らかにするために、子宮を角部（先端部）、体部および頸部と3つの部位に大別し、それぞれの部位で伝達物質反応性や神経支配に差異があるかどうかを検討した。ブタ子宮壁は、内腔側から表層へ子宮内膜、輪走筋、縦走筋の順位なっているため、表層をピンセットでつまんで剥がし縦走筋標本を作製した（縦走筋、輪走筋の分離は容易、図1）。残りのシートの内膜をはさみで物理的に取り除き、輪走筋の走行を確認して輪走筋標本とした。作製した3つの子宮部位、角先端部、体部および頸部の縦走筋、輪走筋、合計6種類の標本を加温し（37℃）、混合ガス（95% O₂ + 5% CO₂）で平衡化したクレブス液を満たした浴槽に固定して標本の収縮活性をトランスジューサーで測定し記録した。種々の薬物は浴槽内に直接滴下して作用させた。また、懸垂した標本を挟むように設置した一対の白金電極を用いて0.5 ms-1 ms 刺激幅の矩形波を加えて組織内の神経要素を刺激し

* 酪農学園大学獣医学群 069-8501 江別市文京台緑町 582
School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan.

た。刺激により誘起された反応が神経原性かどうかは Na^+ チャンネル遮断薬の tetrodotoxin で反応が消失することから確認した。いずれの部位の縦走筋、輪走筋でも自発収縮活性が認められたが、頻度は輪走筋>縦走筋であった。なお、本文中に出てくる数値は4例以上の実験の平均値である。

角部縦走筋に電気刺激を加えると、弛緩または収縮後弛緩と標本により異なる反応が誘起された。これら反応の中で弛緩作用は、propranolol で抑制され収縮に反転した。収縮後弛緩反応を起こす標本でも弛緩は propranolol で消失した。一方、収縮反応は phentolamine で消失した。このことから角部縦走筋は主に adrenaline 作動性神経に支配されており分布する α 受容体 (収縮作用)、 β 受容体 (弛緩作用) の量により弛緩作用、収縮後弛緩作用の差が生じると考えられた。一方、角部輪走筋では電気刺激

により収縮反応のみしか発現しなかった。この収縮は、phentolamine では抑制を受けずに atropine で抑制されたことから、choline 作動性神経の興奮によると考えられた (Taneike et al., 1991, 1994)。すなわち、同じ角先端部でも縦走筋と輪走筋では神経支配が異なることが明らかになった。同様な電気刺激を体部、頸部の縦走筋、輪走筋に行いその薬理的な性質を解析して結果を表1にまとめた。縦走筋の神経支配には部位により異なり、体部では choline 作動性神経と adrenaline 作動性神経、頸部では choline 作動性神経と角部から頸部に向かうにつれて choline 作動性神経支配が強くなっていった。一方、輪走筋では部位による差がなく体部、頸部いずれでも choline 作動性の神経支配であった (表1)。

次に各部位の両筋層における acetylcholine と noradrenaline の反応性を検討した。Noradrenaline による反応は propranolol の存在下で観察される α 性収縮反応と、phentolamine の存在下で観察される β 性弛緩反応 (自発収縮の消失) に分けることができた。Noradrenaline は propranolol 下でいずれの部位の縦走筋も収縮させ、収縮反応の大きさは、角先端部>体部>頸部の順となった。しかしながら輪走筋ではいずれの部位でも収縮反応は誘起されなかった。Phentolamine 下で noradrenaline は、いずれの部位の縦走筋の自発収縮活性も濃度に依存して同程度抑制した (部位差は顕著ではない)。輪走筋では noradrenaline の抑制作用は縦走筋で観察される反応に比べて弱かったが、部位差が認められた (角先端部=体部<頸部)。Acetylcholine は、3 部位の縦走筋、輪走筋いずれにも収縮を誘起したが、収縮の大きさには縦走筋でのみ部位差 (角部>体部>頸部) があり、輪走筋ではいずれの部位も類似の反応性を示した (表1)。輪走筋と縦走筋の比較では縦

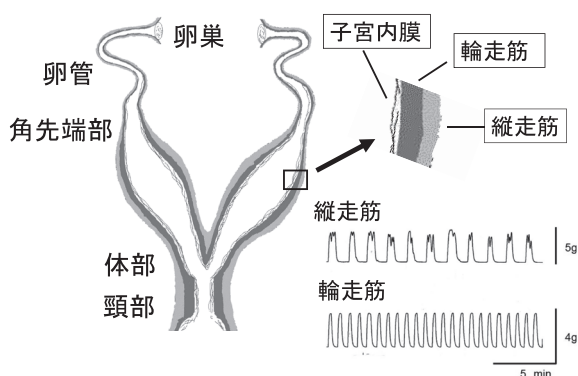


図1 プタ子宮筋の模式図

プタ子宮は双角子宮であり、卵巣、卵管、子宮角先端部、体部 (双角が合流した部分) と頸部に分けることができる。また、各部位の子宮壁は縦走筋、輪走筋および子宮内膜から成り立っており、機械的に縦走筋と輪走筋を分離することが容易であった。子宮角先端部の縦走筋、輪走筋で認められた自発収縮の典型例を示した。輪走筋の方で高頻度の自発収縮が認められた。

表1 プタ子宮各部位の神経支配と noradrenaline および acetylcholine 反応性の比較

			角先端部	体部	頸部
縦走筋					
神経支配			Adrenaline 作動性	Adrenaline 作動性 + choline 作動性	Choline 作動性
Noradrenaline 反応性	収縮	$\alpha 2$ 受容体	高	中	低
	弛緩	$\beta 2$ 受容体	中	中	高
Acetylcholine 反応性	収縮	M3 受容体	高	中	低
輪走筋					
神経支配			Choline 作動性	Choline 作動性	Choline 作動性
Noradrenaline 反応性	収縮	$\alpha 2$ 受容体	無反応	無反応	無反応
	弛緩	$\beta 2$ 受容体	低	低	高
Acetylcholine 反応性	収縮	M3 受容体	収縮反応, 部位による反応性の差なし		

走筋の方が acetylcholine 反応性は高かった。部位差についてまとめると、acetylcholine や noradrenaline による収縮反応は角先端部で強く発現し、頸部に向かうと弱くなる傾向にあった。Noradrenaline による弛緩反応は、頸部が最も高かった。このことは、自律神経の興奮により角先端部では収縮が強く発現し頸部に向かい収縮が減弱するとともに弛緩作用が強く発現し、子宮内に角先端部から頸部に向かう圧勾配を作り、内容物の輸送を容易にしている可能性を示唆している (Taneike et al., 1994; Kitazawa et al., 2001b)。

3) Acetylcholine および noradrenaline の反応に関与する受容体種の解明

Acetylcholine による反応は atropine で、noradrenaline による収縮は phentolamine で、noradrenaline による弛緩は propranolol で抑制されることから muscarine 受容体、 α -adrenaline 受容体が収縮に、 β -adrenaline 受容体が弛緩に関与していることが明らかになった。そこで種々の受容体サブタイプに特異的な作動薬、遮断薬を用いて反応に関与する受容体サブタイプを解析した。

Muscarine 受容体：Acetylcholine の濃度依存性収縮を無処置下、遮断薬処置下で検討して濃度反応曲線の右方平行移動の程度から pA₂ 値を計算した。pA₂ 値は作動薬単独の濃度反応曲線を 2 倍右方に平行移動させる時の遮断薬のモル濃度の逆数の常用対数で遮断薬の受容体に対する親和性を示し受容体種の分析に使用される (Tallarida, 1988)。各遮断薬の pA₂ は、atropine (8.95), N,N-dimethyl-4-piperidinyl diphenylacetate (4-DAMP, 8.83), tropicamide (7.07), himbacine (7.01), pirenzepine (6.42), 11-[[2-[(diethylamino) methyl]-1-piperidinyl] acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido [2,3-b] [1,4] benzodiazepin-6-one (AF-DX116, 5.96) と算出された。また、受容体結合実験でも各遮断薬の結合解離作用を検討した。Muscarine 受容体の指標となる [³H]-quinuclidinyl benzilate 結合は、atropine (解離定数, pK_i=8.22), 4-DAMP (8.18), tropicamide (6.78), pirenzepine (5.46), AF-DX116 (5.12) の力価順で抑制された。Muscarine 受容体刺激によって子宮組織内の cAMP は変化しなかったため M2 および M4 受容体の関与は否定された。Muscarine 受容体サブタイプに対する遮断薬の力価順序は、M1 受容体では 4-DAMP>pirenzepine>tropicamide>himbacine>AF-DX116, M2 受容体では 4-DAMP>himbacine>AF-DX116>

tropicamide>pirenzepine, M3 受容体では 4-DAMP>tropicamide>himbacine>pirenzepine>AF-DX116, M4 受容体では 4-DAMP>himbacine>tropicamide>pirenzepine>AF-DX116 と報告されている (Lazareno and Birdsall, 1993; Doods et al., 1993; Eglen et al., 1996)。それ故、ブタ子宮筋での acetylcholine 誘発性収縮に対する遮断薬の力価順序から、収縮には M3 サブタイプが関与すると推察した (Kitazawa et al., 1999)。

α -Adrenaline 受容体：Noradrenaline の収縮作用が prazosin (α 1 受容体遮断薬) では抑制されず yohimbine (α 2 受容体遮断薬) で抑制されたこと、clonidine および xylazine で低濃度から収縮が誘起されたことから収縮に関与する受容体は α 2 タイプと考えられた。しかしながら、 α 1, α 2 受容体に特異的に結合する放射性リガンドの結合実験の結果から、 α 1 受容体が存在する可能性についても完全には否定できなかった。子宮角先端部縦走筋の α 1 : α 2 の比率は 1 : 7 となり、この比率は輪走筋でも同様であった。また、縦走筋と輪走筋の比較ではいずれの α 受容体サブタイプも縦走筋で輪走筋の 4 倍程度多く存在していた。以上より、ブタ子宮では α 2 受容体が α 1 受容体に比べ 7 倍多く筋層依存性 (縦走筋>輪走筋) に存在し、noradrenaline による縦走筋の収縮を仲介することがわかった (Taneike et al., 1995)。

β -Adrenaline 受容体：ブタ子宮縦走筋収縮は、 β 2 受容体を選択的な作動薬である clenbuterol で著明に抑制されたが、xamoterol (β 1 作動薬) では全く弛緩が認められなかった。 β 3 作動薬の BRL37344 は高濃度でもわずかな弛緩しか起こさなかった。また、isoproterenol (β 作動薬) の弛緩作用は、 β 2 特異的遮断薬の ICI118, 551 で抑制され親和性を示す pA₂ (8.0) は、すでに報告されているこの化合物の β 2 受容体への親和性と類似していた (pK_i=8.42, El Alj et al., 1989)。これらのことからブタ子宮に存在する β 受容体は β 2 タイプであることが明らかになった (Kitazawa et al., 2001b)。これらの検討で明らかにした受容体サブタイプを表 1 に示した。

4) Prostaglandins の反応性

Prostaglandin (PG) 類は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼによって合成される活性物質の総称であり、PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂ α および thromboxane A₂ (TXA₂) がある。これらの PG 類は、それぞれ EP, IP, DP, FP および TP 受容体に比較的選択的に作用し種々の生理活性を誘起する。

表2 Prostaglandin 類のブタ子宮角先端部縦走筋および輪走筋の自発収縮に与える影響

	縦走筋	輪走筋
PGE1	2 相性反応, 低濃度 (1-100 nM) で収縮増大, 高濃度 (100 nM-10 μ M) で収縮抑制	高濃度 (1 μ M) で収縮抑制
PGE2	2 相性反応, 低濃度 (1-100 nM) で収縮増大, 高濃度 (100 nM-10 μ M) で収縮抑制	高濃度 (1 μ M) で収縮抑制
PGF2 α	収縮増大 (1 nM-100 nM)	高濃度 (10 μ M) で収縮抑制
PGD2	収縮増大 (10 nM-1 μ M)	収縮抑制 (1 nM-1 μ M)
PGI2	収縮増大 (100 nM-10 μ M)	高濃度 (100 μ M) で収縮抑制

EP 受容体にはさらに EP1, EP2, EP3, EP4 のサブタイプに分けられる。それぞれの受容体の情報伝達系も明らかになっており, FP と TP 受容体は, Gq/11-inositol trisphosphate 促進系, IP と DP 受容体は, Gs-adenylate cyclase-cAMP 促進系とカップルしている。EP 受容体では, EP1 は, Gq/11-inositol trisphosphate 促進系, EP2, EP4 は, Gs-adenylate cyclase-cAMP 促進系, そして EP3 は, inositol trisphosphate 促進系と adenylate cyclase-cAMP 抑制系の両方とカップルしている。これらの情報伝達系が平滑筋細胞内で駆動したと考えると PG 受容体は平滑筋収縮性受容体 (FP, EP1, EP3, TP) と弛緩 (抑制) 性受容体 (DP, IP, EP2, EP4) とに分類することができる (Narumiya et al., 1999)。分娩誘起に PG が関与していることは, 1) PG により子宮筋の収縮性が修飾されること, 2) 外因性 PG の適用により分娩が誘起され, PG 合成阻害薬の処置により分娩が遅延すること, 3) 子宮の PG 含有量が分娩時に上昇すること, 4) プロスタノイド受容体 (FP) ノックアウトマウスでは正常な分娩が誘起されないことから推察されている (Chan, 1983; Dyal and Crankshaw, 1988; Romero et al., 1996; Ushikubi et al., 2000)。これらのことから, ブタ子宮筋にも種々の PG 受容体が存在して分娩をはじめとして子宮収縮調節に関与すると考えられるが, ブタで子宮に存在する PG 受容体の種類の報告はない。そこで種々の PG 類と合成 PG 受容体作動薬, 遮断薬を用い子宮角先端部 (縦走筋, 輪走筋) に存在する受容体の同定を試みた。また, いくつかの受容体では子宮部位差の検討もおこなった (Cao et al., 2002; 2005)。

まず 5 種類の天然 PG 類 (PGE1, PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2) の作用について検討した (1 nM-10 μ M)。尚, TXA2 は不安定で試薬として手に入らないため初期の検討では解析していない (安定性の TP 受容体作動薬, U46619 の検討結果は後述する)。角先端部縦走筋では, いずれの PG 類も収縮を増大

させた。力価順序は, PGF2 α >PGE2=PGE1>PGD2>PGI2 であった。また, PGE1 と PGE2 では, 1-100 nM で収縮増大作用が誘起されたが, 100 nM-10 μ M では逆に収縮は抑制され濃度反応関係はベル型になった。一方, 輪走筋においては縦走筋での成績とは異なり, いずれの PG 類によっても収縮の増大は起きなかった。5 種類の PG の中で, PGD2 は低濃度 (10 nM) から自発収縮を抑制し, 100 nM-1 μ M では収縮をほぼ完全に消失させた。他の PG 類では, PGE1, PGE2 により 1 μ M で, PGF2 α により 10 μ M で, PGI2 により 100 μ M で 20% 程度の自発収縮高の抑制が引き起こされた。それゆえ, 抑制作用の力価は, PGD2>PGE2=PGE1>PGF2 α >PGI2 と推定された (表 2)。

PG 受容体の情報伝達系から平滑筋では PG 受容体を収縮性 (FP, EP1, EP3, TP) および弛緩性 (DP, IP, EP2, EP4) 受容体に分類できることは既に述べたが, 今回の成績では縦走筋で PGD2 と PGI2 により収縮が誘起されたり, 輪走筋で PGF2 α により収縮抑制が起きたりと必ずしも受容体の分類と一致しない反応が観察された。原因としては, ブタ子宮に複数の PG 受容体が存在すること, PG 類は濃度により種々の受容体に作用することが考えられた (たとえば, PGD2 は低濃度では DP に作用するが, 高濃度では他の PG 受容体にも作用する可能性がある)。そこで, それぞれの PG 受容体に選択性が高い作動薬を用い, それら作動薬の縦走筋, 輪走筋の自発収縮におよぼす影響を観察した (表 3)。

FP 受容体: 選択的作動薬の cloprostenol は, 1 nM から子宮角先端部縦走筋の収縮を増大させ 100 nM で最大反応が認められた (無処置の収縮高を 100% とすると最大収縮は 380%)。一方, 輪走筋では反応性が低く, 100 nM より収縮が増大し 10 μ M まで順次上昇したが, 最大反応は 156% と縦走筋に比べて明らかに低かった。このことは, cloprostenol の作用は縦走筋で著明に発現することを示しており, FP 受容体の分布に筋層差 (縦走筋>輪走筋)

表3 プロスタノイド受容体作動薬のブタ子宮角先端部縦走筋および輪走筋収縮に与える影響

	縦走筋	輪走筋	筋層差
Cloprostenol FP	収縮増大	収縮増大	縦走筋>輪走筋
BW-245C DP	収縮抑制	収縮抑制	縦走筋<輪走筋
Cicaprost IP, EP3	収縮増大	収縮抑制	縦走筋<輪走筋 (IP) 縦走筋>輪走筋 (EP3)
U46619 TP	収縮増大	収縮増大	縦走筋<輪走筋
ONO-DI-004 EP1	収縮増大	無反応	縦走筋>>輪走筋
ONO-AE-248 EP3	収縮増大	収縮増大	縦走筋>輪走筋
ONO-AE1-259 EP2	収縮抑制	収縮抑制	縦走筋=輪走筋
ONO-AE1-329 EP4	無反応	無反応	

がある可能性が示唆された(Cao et al., 2002)。また、子宮部位により反応に差があるかどうかを明らかにするために体部、頸部の筋層で反応性を検討したところ、いずれの筋層においても収縮増大反応の大きさは、角先端部>体部=頸部であった(Cao et al., 2005)。

DP 受容体：DP 受容体作動薬の BW-245C は、子宮角先端部輪走筋では 3 nM から自発収縮を抑制し、100 nM では全ての標本において自発収縮を完全に消失させた。半分抑制を起こす濃度は 17 nM であった。BW-245C は縦走筋においても自発収縮活性を濃度に依存して抑制したが、最大抑制率は 10 μM でも 60% であり自発収縮活性を消失させるまでには至らなかった。最大抑制の半分の大きさの反応を起こす濃度は 120 nM であった。これらの成績から、DP 受容体は輪走筋に多く発現し収縮抑制に関与すると考えられた(Cao et al., 2002)。子宮部位による差を検討したところ、輪走筋では BW-245C の収縮抑制作用に部位差は認められなかったが、縦走筋においては、抑制反応は頸部=体部>角先端部の順となり、頸部と体部では縦走筋と輪走筋の間に反応性の差が無くなっていた(Cao et al., 2005)。

IP 受容体：IP 受容体の機能を検討するために特異的作動薬 cicaprost の作用を検討した。子宮角先端部縦走筋では、1-10 nM の低濃度でわずかに自発収縮を抑制する傾向(5-12%の抑制)を示した後、100 nM-10 μM では逆に濃度依存性の収縮増大作用が認められた。一方、輪走筋では cicaprost は濃度依存性に自発収縮を抑制した(半分抑制濃度は 5.9 μM, 最大抑制は 88%)。これら縦走筋と輪走筋での cicaprost の反応の違いは、cicaprost の性質と筋層に依存した IP 受容体の分布によると考えられた。Cicaprost は低濃度では IP 受容体に作用するが(Ki 値, 11 nM)、高濃度では EP3 受容体(Ki 値, 170 nM)にも作用する(Kiriyama et al., 1997)。それぞれの受容体の情報伝達経路から収縮抑制には IP 受

容体、収縮増強には EP3 受容体が関与していると考えられた。IP と EP3 受容体の分布が輪走筋では IP>>EP3 であるのに対して、縦走筋では EP3>>IP であると考ええるとブタ子宮での cicaprost の反応は説明可能であった(Cao et al., 2002)。

興奮性 EP 受容体 (EP1, EP3)：Cicaprost の作用からブタ子宮に興奮性の EP3 受容体の存在が示唆されたので、ONO-DI-004 (EP1 作動薬) と ONO-AE-248 (EP3 作動薬)(Suzawa et al., 2000) の作用を子宮角先端部縦走筋と輪走筋で検討した。ONO-DI-004 は、濃度依存性(100 nM-10 μM)に縦走筋の収縮活性を増大させたが、輪走筋では 10 μM でも著明な反応を誘起しなかった。このことから EP1 は縦走筋のみに存在することが示唆された。一方、ONO-AE-248 は、縦走筋、輪走筋いずれにおいて濃度依存性の収縮増大作用を示したが、誘起される反応は縦走筋の方が大きかった(10 μM での収縮増大作用、縦走筋：210%, 輪走筋：140%)。このことから、EP3 は縦走筋、輪走筋のいずれにも存在するが、縦走筋の方が量的に多いと考えられた(Cao et al., 2002)。ONO-AE-248 の作用を子宮体部、頸部から得た筋層標本でも検討し、角先端部の反応と比較したところ、縦走筋では角先端部>>体部=頸部であった。一方、輪走筋では部位による差は認められなかった(Cao et al., 2005)。

抑制性 EP 受容体 (EP2, EP4)：PGE1 と PGE2 の高濃度では自発収縮が抑制されてベル型濃度反応曲線になったことから、収縮を抑制する EP 受容体の存在が示唆された。そこで、ONO-AE1-259 (EP2 作動薬) と ONO-AE1-329 (EP4 作動薬)(Yamane et al., 2000) の作用を検討した。ONO-AE1-259 は縦走筋、輪走筋いずれの収縮も濃度依存性に抑制し消失させた(10 nM-10 μM)。作用力価に著明な筋層差は認められなかった(半分抑制濃度、縦走筋：390 nM, 輪走筋：520 nM)。このことは EP2 受容体が縦走筋にも輪走筋にも同程度存在することを示し

表 4 Histamine, 5-hydroxytryptamine, oxytocin および endothelin のブタ子宮角先端部縦走筋および輪走筋収縮に与える影響と筋層差

	縦走筋	輪走筋	筋層差
Histamine H1	収縮増大	収縮増大	縦走筋＞輪走筋
Histamine H2	収縮抑制 (H1 遮断薬下)	無反応	縦走筋＞＞輪走筋
5-Hydroxytryptamine 5-HT2A	収縮増大 (5-HT7 遮断薬下)	収縮増大 (5-HT7 遮断薬下)	縦走筋＞輪走筋
5-Hydroxytryptamine 5-HT7	収縮抑制	収縮抑制	縦走筋＜輪走筋
Oxytocin OXT	収縮増大	無反応	縦走筋＞＞輪走筋
Endothelin ETA	収縮増大	収縮増大	縦走筋＞輪走筋

ている。一方, ONO-AE1-329 は 10 μ M でもいずれの筋層の自発収縮も全く抑制しなかったので, 抑制性の EP4 受容体はブタ子宮には存在しないことが示唆された (Cao et al., 2002)。ONO-AE1-259 の収縮抑制作用を体部, 頸部の筋層でも検討し角先端部の反応性と比較したところ, 縦走筋では頸部=体部＞角先端部, 輪走筋では頸部＞体部=角先端部となり, いずれの筋層も頸部での反応性が高いことがわかった (Cao et al., 2005)。

TP 受容体: TP 受容体については合成作動薬の U46619 を使用した。U46619 は, 縦走筋, 輪走筋いずれにおいても濃度に依存した収縮を誘起した。収縮作用の半分効果濃度は輪走筋 (pEC50, 7.69) の方が縦走筋 (pEC50, 6.69) よりも高かったが, 最大反応は縦走筋 (358%) の方が輪走筋 (182%) よりも大きく発現した。一方, 3 H-SQ29548 を用いた受容体結合実験では, 両筋層で結合親和性に差は見られなかったが (縦走筋: 29.6 nM, 輪走筋: 30.8 nM), 最大結合量は輪走筋の方が 2 倍高かった (縦走筋: 58.2 fmol/mg protein, 輪走筋: 90.9 fmol/mg protein)。収縮実験では縦走筋で反応が大きく発現しているが, 結合実験の成績はその逆となった。収縮実験の成績と結合実験の成績に差異が生じる原因は不明であった (Cao et al., 2004)。

以上のプロスタノイド受容体作動薬の成績 (角先端部) をまとめたのが表 3 である。この表から, ブタ子宮には収縮性の FP, TP, EP1, FP3 受容体と収縮抑制性の DP, IP, EP2 受容体が存在していることが明らかになった。このブタ子宮に存在するプロスタノイド受容体の種類は, ヒト子宮で報告されているものと一致していた (Senior et al., 1991, 1992; Crankshaw, 2001)。また, 各作動薬の反応の大きさ, すなわち受容体分布には筋層差が認められた。収縮を誘起する FP, TP, EP1, EP3 受容体を介する反応は縦走筋で強く発現したが, DP, IP 受容体を介する収縮抑制性反応は輪走筋で強く発現した。EP2 受容体を介する収縮抑制作用にははっきりとした筋層差が認められなかった。

5) Histamine と serotonin (5-hydroxytryptamine)

子宮には多くの肥満細胞が存在し, この細胞から放出される活性物質がパラクライン的に子宮筋細胞に働き子宮収縮調整に関与しているのではないかと考えられている (Rudolph et al., 1993, 1997; Garfield et al., 2000)。顆粒に含まれる活性物質として histamine と serotonin を推定し, 両物質の作用を検討した (表 4)。

Histamine: Histamine は子宮角先端部で縦走筋, 輪走筋いずれにも著明な収縮を誘起した。半分効果濃度 (pEC50) は, 縦走筋で 6.34, 輪走筋で 5.4 であった。誘起される収縮反応の最大値は縦走筋 (232%) の方が大きかった (輪走筋 190%)。この収縮作用は H1 受容体遮断薬の pyrilamine で抑制されたことから H1 受容体が関与していると考えられた。Pyrilamine (1 μ M) 存在下で histamine (3-10 μ M) は, 縦走筋の自発収縮を抑制した後に 30 μ M 以上では収縮増大を誘起した。このような収縮抑制作用は輪走筋では認められなかった。この histamine による自発収縮の低下は ranitidine によって減弱したことから, H2 受容体作動薬の dimaprit でも縦走筋でのみ自発収縮抑制が誘起されたことから, H2 受容体は縦走筋にのみ存在し収縮抑制に関与すると考えられた。 3 H-Pyrilamine を用いて H1 受容体の結合実験を行ったところ, 結合親和性に筋層差はないものの, 結合部位の密度 (受容体量) は縦走筋で約 2.5 倍輪走筋よりも高かった。以上の成績から, ブタ子宮において H1 および H2 受容体共に縦走筋に多く存在し, histamine による収縮 (H1) および弛緩 (H2) に関与すると考えられた。正常状態では, H1 による収縮作用が優勢に発現し, H2 を介する抑制作用は H1 がマスクされた状態で顕在化すると推察された (Kitazawa et al., 1997)。

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 以下 5-HT): まず, 子宮角先端の縦走筋, 輪走筋標本に 5-HT を適用して自発収縮に与える影響を検討した。輪走筋では自発性収縮は 5-HT により濃度依存性に抑制

され 300 nM から 1 μ M では完全に消失した (EC₅₀ は 84 nM)。一方、縦走筋では標本により自発収縮抑制作用に差異が認められた。18 例の縦走筋標本の内、7 例では収縮は完全に消失したが (10–100 μ M)、7 例では部分抑制 (抑制率、10–90%)、4 例では殆ど抑制が起きなかった (抑制率 10% 以下)。抑制作用が認められた 14 例をまとめると、半分効果濃度が 1.44 μ M、抑制率は 68% と算出された。5-HT による抑制作用は tetrodotoxin では抑制を受けなかったため、平滑筋に直接作用した結果誘起されるものと考えられた。そこで、5-HT の作用が著明に発現した輪走筋において収縮抑制作用に関する受容体を明らかにするために各種 5-HT 受容体作動薬と遮断薬の作用を検討した。5-HT 受容体は 5-HT₁ から 5-HT₇ まで区分され、その下にさらにサブタイプが存在する (Hoyer et al., 1994)。5-HT を含む 5-HT 受容体作動薬の中で 5-HT、5-carboxy-tryptamine (5-CT, EC₅₀ : 1.7 nM)、5-methoxy-tryptamine (5-MeOT, 5.2 μ M)、(±)-8-hydroxy-2-(di-n-propyl amino) tetralin (8-OH-DPAT, 27.5 μ M) の 4 種類が輪走筋の自発収縮を顕著に抑制することがわかった。力価順は、5-CT > 5-HT > 5-MeOT > 8-OH-DPAT となった。一方、oxymethazoline (5-H₁ 作動薬)、 α -methyl-5-HT (5-HT₂ 作動薬) および 2-methyl-5-HT (5-HT₃ 作動薬) には自発収縮抑制作用は認められなかった。遮断薬を用いた検討では、pindolol (5-HT₁ 遮断薬)、ketanserin (5-HT₂ 遮断薬)、MDL72222 (5-HT₃ 遮断薬)、tropisetron (5-HT₃/5-HT₄ 遮断薬) および GR113808 (5-HT₄ 遮断薬) は 5-HT による収縮抑制作用には影響を与えなかった。他の遮断薬を検討したところ methiothepin (pA₂, 8.05)、methysergide (7.92)、metergoline (7.4)、mianserine (7.08)、clozapine (7.06)、spiperone (6.86) がこの力価順序で 5-HT の自発収縮抑制作用を減弱させることがわかった。以上の 5-HT 受容体作動薬と遮断薬を用いた検討の成績から、5-HT による収縮抑制に関与する受容体は 5-HT₁、5-HT₂、5-HT₃、5-HT₄ タイプ以外である可能性が示唆された。5-HT の細胞内 cAMP に対する影響を検討したところ、5-HT 濃度に依存して細胞内 cAMP が上昇したので、受容体は Gs タンパク質とカップルしている可能性が示唆された。残りの 3 種類の受容体 (5-HT₅、5-HT₆ および 5-HT₇) の内、5-HT₆ と 5-HT₇ が Gs とカップルし cAMP を増大させることが知られているので (Ruat et al., 1993; Hoyer et al., 1994; Kohen et al., 1996)、どちらかの受容体が収縮抑制に関与すると

考えられた (5-HT₅ 受容体の情報伝達系は不明)。5-HT₆ と 5-HT₇ 受容体では 5-HT と 5-CT の力価順に差があり、5-HT₆ 受容体では 5-HT > 5-CT、5-HT₇ 受容体では 5-CT > 5-HT であるとの報告がある (Shen et al., 1993; Kohen et al., 1996)。それゆえ、ブタ子宮の自発収縮抑制に関与している受容体は 5-HT₇ ではないかと推察した。5-HT の収縮抑制作用に有効だった遮断薬の pA₂ 値とこれら遮断薬のマウス 5-HT₇ 受容体に対する親和性の間の相関を解析したところ有意な相関が認められた ($r = 0.88$, $p < 0.05$)。それゆえ、収縮抑制を起こす受容体を 5-HT₇ 受容体と結論した。縦走筋と輪走筋で 5-HT₇ 受容体を介する収縮抑制作用に差異が認められる原因について ³H-5-CT を用いた受容体結合実験を行ったところ、膜分画の結合親和性には差がないものの、受容体量では輪走筋の方で 4 倍高いことが明らかになった。このことから 5-HT による抑制作用の筋層差は 5-HT₇ 受容体発現量の差に起因すると考えられた (Kitazawa et al., 1998; 2000)。

しかしながら、縦走筋において 5-HT₇ 受容体の遮断薬 (SB209970) で処置すると 5-HT により収縮の増大が観察された。すなわち SB209970 (1 μ M) の存在下では、5-HT の収縮抑制作用が反転して収縮増大作用に変化した。この増大作用は ketanserin で抑制されたことから 5-HT₂ 受容体に関与した反応であることがわかった。一方、輪走筋では 5-HT による抑制は低濃度の SB209970 (10–100 nM) により減弱し、濃度反応曲線は右方に移動したのみであったが、高濃度 (1 μ M) の SB209970 処置では、5-HT (100 nM–10 μ M) によりまず収縮が増大した後 30 μ M 以上では抑制が誘起された (Nakamura et al., 2008)。この輪走筋での収縮増大作用も ketanserin で抑制された。これらのことからブタ子宮には抑制性 5-HT₇ 受容体に加えて興奮性 5-HT₂ 受容体が存在することが示唆された。5-HT₂ 受容体には、2A、2B、2C のタイプが知られているが、ketanserin はそれぞれのサブタイプに異なる親和性で結合する (pK_i, 2A 8.87; 2B 5.49; 2C 7.32, Bonhaus et al., 1997)。そこで SB209970 (1 μ M) で処置した縦走筋における 5-HT の濃度反応曲線が ketanserin によりどれくらい右方シフトするかを検討した。Ketanserin (10 nM) は、5-HT の濃度反応曲線を 3.5 倍右方に移動させ、親和性の指標である pA₂ は 8.52 と計算された。 α -Methyl-5-HT は 5-HT₂ 受容体を選択的な作動薬であるが、この薬物による縦走筋の収縮も ketanserin (10 nM) で抑制され、濃度反応曲線の右方移動の程度から pA₂ は 8.78 と計算

された。得られた ketanserin の pA2 値の類似性からブタ子宮に存在する 5-HT2 受容体は 5-HT2A である事が強く示唆された。そこで特異的な primer を設計し real time PCR 法でそれぞれの筋層に存在する 5-HT2A, 5-HT7 受容体 mRNA の量を測定したところ、5-HT2A mRNA に関しては縦走筋に輪走筋の 3.2 倍、5-HT7 mRNA に関しては輪走筋に縦走筋の 5.1 倍多く発現していることが明らかになった。また、5-HT2A, 5-HT7 受容体 mRNA は、子宮の部位によっても異なって分布することがわかった (5-HT2A, 縦走筋: 角先端部 < 体部 = 頸部, 輪走筋: 角先端部 > 体部 = 頸部, 5-HT7, 縦走筋: 部位差なし, 輪走筋: 角先端部 > 体部 = 頸部)。すなわち、5-HT2A (縦走筋 > 輪走筋) と 5-HT7 受容体 (輪走筋 > 縦走筋) は筋層間、部位間で不均等に分布し子宮運動の調節に関与していると推察された。免疫組織化学的検討により、子宮腺の上皮細胞に 5-HT が含まれていることがわかった。子宮腺は外分泌腺なので内膜面に放出された 5-HT が拡散し主に輪走筋収縮に影響を与える可能性が考えられる (Nakamura et al., 2008)。

6) Oxytocin と endothelin

Oxytocin と endothelin は子宮を収縮させる活性ペプチドとしてよく知られている (Alexandrova and Soloff, 1980; Heluy et al., 1995; Sakamoto et al., 1997)。特に下垂体後葉から神経分泌される oxytocin は分娩時の子宮収縮に関与することが明らかになっている (Alexandrova and Soloff, 1980; Fuchs et al., 1984)。そこでブタ子宮筋において両ペプチドの収縮作用を検討した (表 4)。

Oxytocin : Oxytocin (0.1-300 nM) は、ブタ子宮先端部の縦走筋、輪走筋いずれにも収縮を誘起したが、縦走筋の方で感受性が高く (pEC50 は縦走筋で 9.5, 輪走筋で 8.1), 大きな収縮反応が誘起された (最大反応は縦走筋の方が 2 倍大きい)。一方、低 Ca^{2+} (0.4 mM), 低 Mg^{2+} 濃度 (0.2 mM) のクマガイ液下 (クレブス液では 2.5 mM Ca^{2+} , 1.2 mM Mg^{2+} , Kumagai et al., 1952) で、oxytocin は縦走筋を収縮させたものの (pEC50 = 8.5), 輪走筋では全く収縮が起きなかった。子宮部位で oxytocin 反応性に差があるかどうかを明らかにするために、ブタ子宮の体部および頸部から作製した縦走筋、輪走筋でも oxytocin の作用をクマガイ液下で検討した。輪走筋ではどの部位でも反応は誘起されなかったが、縦走筋では体部および頸部、いずれにおいても収縮が誘起され、反応性は角先端部 > 体部 = 頸部で

あった (Kitazawa et al., 2001a)。 ^3H -Oxytocin での受容体結合実験では、角先端部では縦走筋の方が輪走筋に比べて 5 倍受容体密度が高かった。各部位での差では、縦走筋では、角先端部の受容体量を 100% とすると体部 (60%) および頸部 (45%) と部位によって受容体量が減少した。これらの結果は収縮実験の成績と一致していた。一方、輪走筋でも、受容体量は、角先端部を 100% とすると体部 86%, 頸部 69% と減少が認められた。これらの成績から、ブタ子宮において oxytocin はその受容体分布の不均等性により筋層および子宮部位に依存した収縮反応を起こすことが明らかになった (Kitazawa et al., 2001a)。

Endothelin (ET) : Endothelin-1 (ET-1) は豚子宮角先端部の縦走筋、輪走筋のいずれも収縮させた。誘起される最大収縮には筋層差があり、縦走筋 > 輪走筋であった。一方、ET-3 の収縮活性はいずれの筋層でも ET-1 に比べて極めて弱かった。ET-1 による収縮反応は、ETA 受容体の遮断薬である BQ123 や FR139317 で抑制されたことから ET による収縮には ETA 受容体が発現すると推察された。 ^{125}I -ET-1 の結合実験を行ったところ、受容体量も縦走筋の方で輪走筋よりも 2 倍程度多く存在していることが明らかになり、収縮実験の筋層差を支持する結果になった (Isaka et al., 2000)。

7) ま と め

今回、と畜場から得たブタの子宮筋を機能的な実験に使用し子宮収縮を調節する神経系とその伝達物質、子宮運動に影響を与えられとされる生理活性物質の作用を検討した。マウス、ラットやモルモットなどの小実験動物を用いた検討と異なり、ブタ子宮は双角で十分に大きいサイズであるため、子宮部位 (子宮角先端部、体部、頸部) での神経支配や薬物反応性を比較することが可能であった。また、ブタ子宮筋では子宮角の長軸方向に走る縦走筋とそれと垂直に交わる輪走筋を分離することが容易であり、縦走筋と輪走筋の活性物質に対する反応性の差を明らかにすることができる利点があった。表 5 は種々の活性物質を用いて行った角先端部の縦走筋、輪走筋の成績からそれら活性物質の作用点となる受容体を解析してその受容体がどちらの筋層に多く存在するかを示した。例外も認められたが、縦走筋には収縮性の受容体が、輪走筋には弛緩性の受容体が多く存在していた。子宮筋の縦走筋、輪走筋の機能が消化管のそれと類似すると考えると、縦走筋の収縮は管腔内容物の移動に、輪走筋の弛緩は内容物の

表5 ブタ子宮角先端部における各種受容体分布の筋層差

縦走筋	輪走筋
M3muscarine 受容体 (収縮)	5-HT7 受容体 (弛緩)
α 2adrenaline 受容体 (収縮)	DP 受容体 (弛緩)
β 2adrenaline 受容体 (弛緩)	IP 受容体 (弛緩)
H1histamine 受容体 (収縮)	TP 受容体 (収縮)
H2histamine 受容体 (弛緩)	
Oxytocin 受容体 (収縮)	
5-HT2A 受容体 (収縮)	
FP 受容体 (収縮)	
EP1 受容体 (収縮)	
EP3 受容体 (収縮)	
ETA endothelin 受容体 (収縮)	

機能的実験 (収縮, 結合実験) の成績から受容体がどちらの筋層に優勢に存在するか推察した。

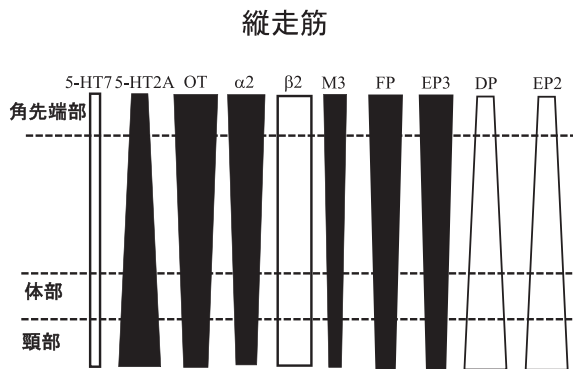


図2 縦走筋における各種受容体分布の子宮部位差

ブタ子宮の縦走筋で部位 (子宮角先端部, 体部および頸部) により発現・機能する受容体量がどのように変化するのかを実験成績から推定した。白カラムは抑制性受容体, 黒カラムは収縮性受容体を示す。台形のカラムは部位により反応性に差があることを, 長方形のカラムは部位によっても反応が同じことを示している。5-HT7 受容体を介する弛緩作用は他に比べて弱いので細い長方形で示した。例外もあるが, 収縮性受容体の反応は角先端部で強く頸部では減弱した。一方, 抑制性受容体の反応は角先端部では弱く, 頸部で増大した。この反応性の勾配は各先端部から頸部に向かい収縮性の勾配, すなわち圧勾配を作り出し, 内容物の輸送に寄与すると考えられた。

保持に関係すると考えられる。両筋層の収縮と弛緩が相互関係を持ちながら子宮運動機能の調節にあたると推察された。

ブタ子宮は角先端部, 体部および頸部が明確に分けられるために各部位での縦走筋, 輪走筋で acetylcholine, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, oxytocin および各種 PG 受容体作動薬の作用を比較検討することができた。その結果, 縦走筋において収縮性受容体による作用は 5-HT2A を除いては角先端部で高く, 体部, 頸部に行くに従い減弱した。一方, 抑制性の受容体を介する反応は部位によっても変化しないか, 角先端部から頸部に向かい増大した。このことは縦走筋では角先端部から体部, 頸部に向かい収縮性が減少するという勾配ができてい

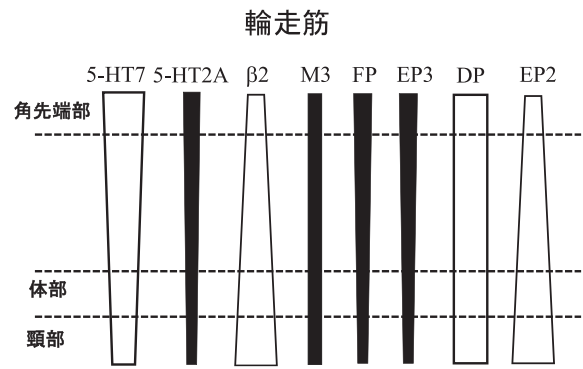


図3 輪走筋における各種受容体分布の子宮部位差

ブタ子宮の輪走筋で部位 (子宮角先端部, 体部および頸部) により発現・機能する受容体量がどのように変化するのかを実験成績から推定した。白カラムは抑制性受容体, 黒カラムは収縮性受容体を示す。台形のカラムは部位により反応性に差があることを, 長方形のカラムは部位によっても反応が同じことを示している。また, カラムの太さは誘起される反応が大きい小さいを示した。オキシトシン (OXT) と α 2-adrenaline 受容体を介する反応は輪走筋では殆ど認められないためにカラムを示さなかった。収縮性受容体の反応は角先端部で強く頸部では減弱した。一方, 抑制性受容体の反応は例外もあるが, 角先端部では弱く, 頸部で増大した。この反応性の勾配は縦走筋と同様に角先端部から頸部に向かい減弱する収縮性の勾配, すなわち圧勾配を作り出す。このことは, 角先端部は, 内容物の主に移送に, 体部頸部は保持に関与する可能性を示唆する。

可能性が示唆された (図2)。輪走筋では収縮性受容体を介する反応は縦走筋と同様に角先端部で少し高く, 体部, 頸部では減少する傾向があった (oxytocin と α 2 受容体を介する収縮は殆ど発現しなかった)。収縮抑制反応では, β 2 と EP2 受容体を介する反応には著明な部位差があったが (角先端部 < 体部・頸部), DP 受容体を介する弛緩には部位差がなかった。一方, 5-HT7 受容体を介する弛緩には部位差が認められるものの, β 2 と EP2 受容体の部位差とは逆であった (角先端部 > 体部・頸部)。総じて輪走筋では収縮抑制性受容体が多く存在し, その作用は角先端部より体部・頸部で強く発現した (図3)。弛緩反応は内容物の保持に関連する機械的な

動きであり、運動性が高い角先端部から移動してきた内容物が、弛緩作用が大きな体部で保持されその後、頸管を通して排出するのに適した内圧勾配を作り上げていると考えられた。

ブタ子宮筋を用いた検討から神経支配や神経伝達物質を含む生理活性物質の反応性に著明な筋層差と部位差があることが明らかになった。しかしながら、本検討は卵巣状態から未経産、発情前期と推定したブタ子宮での結果であり、種々の刺激により誘起される反応が性周期や妊娠により変化する可能性は否定できない。実験小動物では卵巣摘出やホルモン処置により人為的に子宮を取り巻く環境を制御できるが、そのようなことが難しいのがと畜場標本であり、実験に用いる標本の性質を理解して実験成績を解釈する必要がある。

参 考 文 献

1. Alexandrova, M., Soloff, M.S. 1980. Oxytocin receptors and parturition. I. control of oxytocin receptor concentration in the rat myometrium at term. *Endocrinology*, 106: 730-735.
2. Bell, C. 1972. Autonomic nervous control of reproduction: circulatory and other factors. *Pharmacol. Rev.*, 24: 657-736.
3. Bonhaus, D.W., Weinhardl, K.K., Taylor, M., DeSouza, A., McNeeley, P.M., Szczepanski, K., Fontana, D.J., Trinh, J., Rocha, C.L., Dawson, M.W., Flippin, L.A., Eglen, L.M. 1997. RS-102221: a novel high affinity and selective 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology*, 36: 621-629.
4. Bulat, R., Kannan, M.S., Garfield, R.E. 1989. Studies of the innervation of rabbit myometrium and cervix. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 67: 837-844.
5. Cao, J., Mikeremu, S., Tajima, T., Kitazawa, T., Taneike, T. 2002. In vitro pharmacological characterization of the prostanoid receptor population in the non-pregnant myometrium. *Eur. J. Pharmacol.*, 442: 115-123.
6. Cao, J., Wakatsuki, A., Yoshida, M., Kitazawa, T., Hatakeyama, H., Taneike, T. 2004. Thromboxane A₂ (TP) receptor in the non-pregnant porcine myometrium and its role in regulation of spontaneous contractile activity. *Eur. J. Pharmacol.*, 485: 317-327.
7. Cao, J., Yoshida, M., Kitazawa, T., Taneike, T. 2005. Uterine region-dependent differences in responsiveness to prostaglandins in the non-pregnant porcine myometrium. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 75: 105-122.
8. Chan, W.Y. 1983. Uterine and placental prostaglandins and their modulation of oxytocin sensitivity and contractility in the parturient uterus. *Biol. Reprod.*, 29: 680-688.
9. Crankshaw, D.J. 2001. Pharmacological techniques for the in vitro study of the uterus. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 45: 123-140.
10. Doods, H.N., Willim, K.D., Boddeke, H.W.G.M., Entzeroth, M. 1993. Characterization of muscarinic receptors in guinea-pig uterus. *Eur. J. Pharmacol.*, 250: 223-230.
11. Dyal, R., Crankshaw, D.J. 1988. The effects of some synthetic prostanoids on the contractility of the human lower uterine segment in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158: 281-285.
12. Eglen, R.M., Hegde, S.S., Watson, N. 1996. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.*, 48: 531-565.
13. El Alj, A., Breuiller, M., Jolivet, A., Ferre, F., Germain, G. 1989. Beta 2-adrenoceptor response in the rat uterus at the end of gestation and after induction of labor with RU 486. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 67: 1051-1057.
14. Fuchs, A-R., Fuchs, F., Husslein, P., Soloff, M.S. 1984. Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 150: 734-741.
15. Garfield, R.E. 1986. Structural studies of innervation on nonpregnant rat uterus. *Am. J. Physiol.*, 251: C41-54.
16. Garfield, R.E., Bytautiene, E., Vedernikov, Y.P., Marshall, J.S., Romero, R. 2000. Modulation of rat uterine contractility by mast cells and their mediators. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 183: 118-125.
17. Heluy, V., Germain, G., Fournier, T., Ferre, F., Breuiller-Fouche, M. 1995. Endothelin ETA receptors mediate human uterine smooth muscle contraction. *Eur. J. Pharmacol.*, 285: 85-94.
18. Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., Humphrey, P.P. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-

- hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.*, 46: 157-203.
19. Isaka, M., Takaoka, K., Yamada, Y., Abe, Y., Kitazawa, T., Taneike, T. 2000. Characterization of functional endothelin receptors in the porcine myometrium. *Peptides*, 21: 543-551.
20. Kiriya, M., Ushikubi, F., Kobayashi, T., Hirata, M., Sugimoto, Y., Narumiya, S. 1997. Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br. J. Pharmacol.*, 122: 217-221.
21. Kitazawa, T., Kajiura, T., Kiuchi, A., Hatakeyama, H., Taneike, T. 2001a. Muscle layer- and region-dependent distributions of oxytocin receptors in the porcine myometrium. *Peptides*, 22: 963-974.
22. Kitazawa, T., Kubo, O., Satoh, M., Taneike, T. 1998. Involvement of 5-hydroxytryptamine₇ receptors in inhibition of porcine myometrial contractility by 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.*, 123: 173-182.
23. Kitazawa, T., Nakagoshi, K., Teraoka, H., Taneike, T. 2001b. 5-Hydroxytryptamine₇ and β_2 -adrenaline receptors share in the inhibition of porcine uterine contractility in a smooth muscle layer-dependent manner. *Eur. J. Pharmacol.*, 433: 187-197.
24. Kitazawa, T., Shishido, H., Sato, T., Taneike, T. 1997. Histamine mediates the muscle layer-specific responses in the isolated swine myometrium. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 20: 187-197.
25. Kitazawa, T., Uchiyama, F., Hirose, K., Taneike, T. 1999. Characterization of the muscarinic receptor subtype that mediates the contractile response of acetylcholine in the swine myometrium. *Eur. J. Pharmacol.*, 367: 325-334.
26. Kitazawa, T., Yamada, Y., Iwano, H., Yokota, H., Yuasa, A., Taneike, T. 2000. Smooth muscle layer-dependent distribution of 5-HT₇ receptor in the porcine myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, 13: 79-89.
27. Kohen, R., Metcalf, M.A., Khan, N., Druck, T., Huebner, K., Lachowicz, J.E., Meltzer, H.Y., Sibley, D.R., Roth, B.L., Hamblin, M.W. 1996. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J. Neurochem.*, 66: 47-56.
28. Kumagai, H., Ebashi, S., Takeda, F. 1952. A newer method of biological standardization of the oxytocic principle of the posterior pituitary. *Jpn. J. Pharmacol.*, 2: 65-81.
29. Lazareno, S., Birdsall, N. J. M. 1993. Pharmacological characterization of acetylcholine-stimulated [³²S]-GTP γ S binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors: antagonist studies. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 1120-1127.
30. Nakamura, T., Kitazawa, T., Cao, J., Iwamoto, T., Teraoka, H., Kadota, K., Taneike, T. 2008. Excitatory and inhibitory 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors expressed in the isolated porcine uterine muscles. *Eur. J. Pharmacol.*, 600: 123-129.
31. Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79: 1193-1226.
32. Romero, R., Munoz, H., Gomez, R., Parra, M., Polacano, M., Valverde, V., Hasburn, J., Garrido, J., Ghezzi, F., Mazar, M., Tolosa, J.E., Mitchell, M. D. 1996. Increase in prostaglandin bioavailability precedes the onset of human parturition. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 54: 187-191.
33. Ruat, M., Traiffort, E., Leurs, R., Tradivel-Lacombe, J., Diaz, J., Arrange, J.-M., Schwartz, J.-C. 1993. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 8547-8551.
34. Rudolph, M.I., Reinicke, K., Cruz, M.A., Gallardo, V., Gonzalez, C., Bardisa, L. 1993. Distribution of mast cells and the effect of their mediators on contractility in human myometrium. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 100: 1125-1130.
35. Rudolph, M. I., de los Angeles García, M., Sepulveda, M., Brandan, E., Reinicke, K., Nicovani, S., Villan, L. 1997. Ethodin: pharmacological evidence of the interaction between smooth muscle and mast cells in the myometrium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282: 256-261.
36. Sakamoto, S., Obayashi, S., Aso, T., Sato, J., Hamasaki, H., Azuma, H. 1997. The mechanism of myometrial contractions induced by

- endothelin-1 in rat. *Mol. Human Reprod.*, 3: 1029-1035.
37. Senior, J., Marshall, K., Sangha, R., Baxter, G.S., Clayton, J.K. 1991. In vitro characterization of prostanoid EP-receptors in the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, 102: 747-753.
 38. Senior, J., Sangha, R., Baxter, G.S., Marshall, K., Clayton, J.K. 1992. In vitro characterization of prostanoid FP-, DP-, IP- and TP-receptors on the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 215-221.
 39. Shen, Y., Monsma, F.J. Jr, Metcalf, M.A., Jose, P. A., Hamblin, M.W., Sibley, D.R. 1993. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J. Biol. Chem.*, 268: 18200-18204.
 40. Suzawa, T., Iwiyaura, C., Inada, M., Maruyama, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ichikawa, A., Narumiya, S., Suda, T. 2000. The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3 and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology*, 141: 1554-1559.
 41. Tallarida, R.J. 1988. Pharmacologic methods for identification of receptors. *Life Sci.* 43: 2169-2176.
 42. Taneike, T., Miyazaki, H., Nakamura, H., Ohga, A. 1991. Autonomic innervation of the circular and longitudinal layers in swine myometrium. *Biol. Reprod.*, 45: 831-840.
 43. Taneike, T., Bando, S., Takasaki, K., Okumura, M., Sato, H., Teraoka, H., Kitazawa, T., Ohga, A. 1994. Muscle layer and regional differences in autonomic innervation and responsiveness to transmitter agents in swine myometrium. *J. Auton. Pharmacol.*, 14: 213-227.
 44. Taneike, T., Narita, T., Kitazawa, T., Bando, S., Teraoka, H., Ohga, A. 1995. Binding and functional characterization of alpha-2 adrenoceptors in isolated swine myometrium. *J. Auton. Pharmacol.*, 15: 93-105.
 45. Ushikubi, F., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Narumiya, S. 2000. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn. J. Pharmacol.*, 83: 279-285.
 46. Yamane, H., Sugimoto, Y., Tanaka, S., Ichikawa, A. 2000. Prostaglandin E₂ receptors, EP2 and EP4, differentially modulate TNF- α and IL-6 production induced by lipopolysaccharide in mouse peritoneal neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278: 224-228.

Summary

Autonomic innervation and responsiveness to bioactive substances in the uterus are different depending on animal species. To understand the characteristics of uterine functions in domestic animals such as pigs and cows, functional experiments using cognate uterine preparations are necessary. We used a porcine uterus obtained at a local abattoir, and its estrous cycle was identified macroscopically as proestrous based on the follicles and appearance of the corpora lutea. The porcine uterus was bicornual and was divided into three regions (cornu, corpus and cervix). Both longitudinal muscle (LM) and circular muscle (CM) strips could be prepared at each uterine region. Therefore, it was possible to investigate the muscle layer- and uterine region-related differences in autonomic innervation and responsiveness to bioactive substances using the porcine uterus. Both LM and CM strips indicated regular spontaneous contractile activity and the effects of neural stimulations and bioactive substances on the activity were evaluated.

Pharmacological analysis of the responses induced by transmural stimulation on the uterine preparations indicated muscle layer- and region-related different innervations, i.e., the cornual LM is predominantly adrenergic, the corpus LM is a mixture of adrenergic and cholinergic, and the cervical LM is mostly cholinergic, but the CM layers are principally cholinergic throughout the myometrium. Noradrenaline caused both contractile responses (α 2-adrenoceptor) and inhibitory responses (β 2-adrenoceptor) in the LM but caused only inhibitory responses in the CM. Acetylcholine caused only contractile responses in both muscle layers through activation of the M3-muscarinic receptor, and the evoked contraction was marked in the LM compared with that in the CM.

Prostaglandins and their selective receptor agonists, histamine, 5-hydroxytryptamine (5-HT), oxytocin and

endothelin, caused contractile responses or inhibitory responses of the corneal muscles depending on receptor subtypes expressed on the LM and CM. Among the prostanoid receptors, contractile FP, TP, EP1 and EP3 and inhibitory DP, IP and EP2 receptors were shown to be expressed in the porcine uterus. Although there were some exceptions, contractile receptors were predominantly present in the LM and inhibitory receptors were predominantly present in the CM. H1 and H2 histamine receptors were distributed heterogeneously (LM>CM) and mediated the contraction (H1) or relaxation (H2) induced by histamine. Contractile 5-HT_{2A}, oxytocin and ETA endothelin receptors were expressed markedly in the LM rather than the CM. On the other hand, 5-HT caused inhibition of uterine contractility through activation of the 5-HT₇ receptor, and this receptor was predominantly expressed in the CM. A comparison of the presence of these receptors in the LM and CM indicated that the contractile receptors are predominantly expressed in the LM and the inhibitory receptors are abundantly expressed in the CM as in the case of the distribution of prostanoid receptors, suggesting different functions of the LM layer (contraction to transport luminal contents) and CM layer (relaxation to retain the contents) in the porcine uterus.

The effects of some contractile and inhibitory substances were able to be examined in the uterine corpus and cervix to clarify region-related differences in the responsiveness. In the LM, contractile responses by α_2 , M3, FP and EP3 receptors tended to decrease from the cornu to cervix, but the inhibitory responses by DP and EP2 receptors tended to increase from the cornu to cervix. Similar region-dependent changes in the responsiveness to contractile and inhibitory substances were also observed in the CM. The results obtained by using three regions of the porcine uterus suggested that the uterine region-dependent difference in responsiveness to contractile/relaxant substances might produce an intraluminal pressure gradient that decreases from the cornu to cervix for smooth transportation of uterine contents.

In conclusion, the present study using a porcine uterus obtained from a local abattoir showed muscle layer (LM and CM)-related and region (cornu, corpus and cervix)-related differences in autonomic innervation and responsiveness of bioactive substances (noradrenaline, acetylcholine, prostanoids, histamine, 5-hydroxytryptamine, oxytocin and endothelin). These differences suggest different functional roles of muscle layers and uterine regions in the porcine uterus.