

# 卵巣ステージが豚子宮筋の自発収縮活性と薬物反応性に及ぼす影響

誌名	日本養豚学会誌 = The Japanese journal of swine science
ISSN	0913882X
著者	北澤, 多喜雄 宮崎, 怜子 磯江, 源太郎 曹, 金山 種池, 哲朗
巻/号	42巻4号
掲載ページ	p. 165-177
発行年月	2005年12月

# 卵巢ステージが豚子宮筋の自発収縮活性と 薬物反応性におよぼす影響

北澤多喜雄・宮崎怜子・磯江源太郎・曹 金山・種池哲朗

酪農学園大学, 獣医学部, 薬理学教室, 北海道江別市文京台緑町 582, 〒069-8501

(2005年3月19日受付, 2005年10月18日受理)

**要約** 子宮の運動および薬物反応性が, 卵巢ステージで変化する性ステロイドホルモンにより調節を受けていることは実験小動物を用いた解析から明らかになっているが, 豚において卵巢ステージによる子宮筋薬物反応性の変化を *in vitro* の摘出標本レベルで解析した報告は見当たらない。

本研究では, 卵巢の肉眼的所見から, 卵胞期, 黄体初期, 黄体開花期に分類した経産豚の子宮筋(縦走筋, 輪走筋)を用い, 卵巢ステージにより子宮筋の自発収縮活性と薬物反応性が影響を受けるか否かを検討した。

供試した摘出子宮輪走筋標本は, いずれの卵巢ステージでも自発収縮活性を有していたが, 縦走筋では, 自発収縮を示す標本の割合は, 黄体期で低下した。自発収縮が発現した標本で収縮の波形下面積(活性)を比較すると, 輪走筋では卵巢ステージによる変化は認められなかった。縦走筋においても収縮活性は黄体初期に一過性に増加するものの全体としては卵胞期から黄体期に移行してもあまり変わらなかった。子宮筋収縮作用のある carbachol, prostaglandin F<sub>2α</sub> 受容体作動薬 fluprostenol および oxytocin は, 子宮筋の収縮活性を筋層依存性(縦走筋>輪走筋)に増大させたが, その反応性(50%効果濃度)には卵胞期と黄体初期, 黄体開花期間で差は認められなかった。しかし, 最大収縮は卵胞期の方が黄体期よりも有意に大きくなっていった。一方, 子宮筋弛緩作用のある isoproterenol および prostaglandin D<sub>2</sub> 受容体作動薬 BW245C による自発収縮抑制反応は, 卵巢ステージによっても殆ど影響されないか, 黄体初期に一過性の増大が認められたのみであった。

以上の成績から, 子宮筋(特に縦走筋)の自発収縮活性は卵巢ステージにより影響を受けること, 収縮性薬物に対する反応は卵胞期に比べ黄体期で低下すること, 弛緩性薬物の反応は種々のステージでも殆ど変化しないことが明らかになった。

## 結 言

子宮運動は筋の自動性, 自律神経, 性ステロイドホルモンおよび局所ホルモン(prostaglandins,

histamine, 5-hydroxytryptamine) により調節されているが, これら因子の子宮運動への寄与の程度は動物種により異なっている。また, 子宮の形状にも動物種差があるために, ヒト子宮運動の

An *in Vitro* Study on Spontaneous Contractility and Drug Responsiveness of Porcine Myometrium During Three Ovarian Stages

T. KITAZAWA, R. MIYAZAKI, G. ISOE, J. CAO and T. TANEIKE

Department of Pharmacology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu Hokkaido 069-8501, Japan

理解にはヒト子宮を用いた実験が、家畜子宮運動の理解には家畜の子宮を用いた実験が必要となってくる。著者らは、これまで未經産豚において、発情前期子宮筋の自律神経支配および薬物反応性について解析し、自律神経支配と薬物感受性は縦走筋、輪走筋および子宮部位により異なることを明らかにしてきた<sup>1-6)</sup>。これらの差は、両子宮筋層の生理的役割の差（縦走筋：子宮角の長軸方向の収縮に寄与し交配時の精液輸送や分娩時の胎子輸送に関与。輪走筋：子宮の横軸方向の収縮に寄与し妊娠時の胎子の保持に関与）を反映していると考えられるが、詳細な役割分担の解明には更なる検討が必要である。

豚は多発情動物であり、発情周期の長さは平均21日と言われている。発情周期を卵巣の外観（ステージ）から判別すると卵胞期、黄体初期、黄体開花期および黄体退行期に分けることができるが、各卵巣ステージで変化するステロイドホルモンに着目してみると、これまで実験に用いていた発情前期は、estrogen 優位な卵胞期にあたり、排卵後に黄体が形成されると progesterone 優位な黄体期へ推移する。卵巣ステージおよび性ステロイドホルモンによって子宮筋の運動性が変化することは、これまで多くの動物種で報告されている<sup>7-10)</sup>。一方、薬物反応性についても estrogen 処置が子宮筋の acetylcholine 感受性を増加（ラット）<sup>11)</sup> または低下（モルモット）<sup>12)</sup> させること、ラット子宮で 5-hydroxytryptamine, prostaglandin F<sub>2α</sub> および oxytocin の収縮反応性を発情期と発情休止期で比較すると最大反応には差が認められないが、反応性（50% 効果濃度, EC<sub>50</sub>）には有意な変化が起きることが知られている<sup>13)</sup>。これらの変化は、性ステロイドホルモンが神経支配様式、受容体やイオンチャネルなどの機能蛋白質の発現を調節しているためだと考えられている<sup>14-17)</sup>。

以上のことから、豚子宮においても卵巣のステージによって自発収縮性や薬物反応性が変化する事が予想される。LANGENDIJK ら<sup>18)</sup> は、豚の子宮内圧を発情期の前後で経時的に測定し、発情に伴い子宮の収縮性が増加することを in vivo で報告しているが、自発収縮性の変化および子宮薬物反応性の変化を in vitro で解析した報告は見

当たらない。子宮運動において生理的役割が異なる縦走筋と輪走筋を摘出分離して行う in vitro の実験は、種々の卵巣ステージでの豚の子宮運動性および薬物反応性の変化を考える上で重要な基礎的知見を与える。それ故、本研究では、と畜場より得た経産豚卵巣の肉眼的所見から卵巣ステージを卵胞期、黄体初期、黄体開花期に分別し、これらの時期で子宮筋の自発収縮活性、子宮収縮薬（carbachol, fluprostenol）および子宮弛緩薬（isoproterenol, BW245C）の反応性が変化する可否かを検討した。

## 材料および方法

### 1. 子宮平滑筋標本の作製

本実験には、北海道早来食肉センター（北海道、早来町）においてと殺された非妊娠経産豚（LW, 62頭）の子宮を用いた。豚卵巣のステージは、卵巣の肉眼的所見から卵胞期（follicular phase, FP：明瞭な直径5-8mmの卵胞と硬く小さくなった黄体が出現している）、黄体初期（early luteal phase, ELP：排卵が起き卵胞腔に赤い出血性黄体が出現している）、および黄体開花期（functional luteal phase, FLP：黄体が成熟して、黄体から血液が吸収され色調が明るくなり表面に突出）に分類した。と畜場より得た標本は、40頭（65%）がFP、12頭（19%）がELP、10頭（16%）がFLPと判定された。なお、今回、入手した標本の中には黄体退行期のものは認められなかった。

卵巣ステージを判定した後、子宮角先端部、約5cmの部分から3cmほどの子宮組織を切り出し、既に報告した方法<sup>1,3,5)</sup>に従い、縦走筋標本と輪走筋標本を作製した。

### 2. 収縮活性の記録法

作製した輪走筋、縦走筋標本の両端を絹糸で結紮し、混合ガス（95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>）で平衡化した37°C Krebs液中（mM）（NaCl, 118.4; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25 および glucose, 11.5, pH=7.4）に懸垂し、その収縮活性を張力測定用トランスデューサー（SB-11T; 日本光電）で等尺性に測定した。トランスデューサーからの信号は、張力測定用アンプで増幅し、レコーダー上に収縮力（g）として描記する

とともに、基礎医学研究用システム (LEG-1000; 日本光電) にも記録した。実験は、栄養液槽に標本を懸垂した後 90 分間平衡化させ、自発収縮が安定して発現するのを確認してから開始した。発現した自発収縮は、頻度、振幅および波形下面積 (area under the curve, AUC) で解析し、卵巣ステージ間で比較した。なお、自発収縮の振幅は、発生張力 (g) を標本の湿重量で割り 1g の標本に誘起される収縮力 (g/g tissue wet weight) として示した。90 分間の平衡化時間内においても自発収縮が発現しない標本は、以下の薬物反応性の解析には使用しなかった。

自発収縮が規則的に発現している標本に、収縮性および弛緩性薬物を低濃度から 5 分間隔で累積投与し、収縮活性の変化を薬物適用直前の自発収縮 5 分間の AUC を 100% とした時の相対値で示した。この値を縦軸に、横軸に薬物濃度 (mol/l) を常用対数でとり、濃度反応曲線を作成した。得られた濃度反応曲線から、最大収縮反応 (自発収縮の AUC に対する相対値) または最大収縮抑制反応、および  $-\log EC_{50}$  (最大反応の 50% の効果を引き起こす濃度  $EC_{50}$  の逆数の対数) を Origin7J (Origin Lab) を用い算出した。

### 3. 使用薬物

本実験には、atropine sulfate (Sigma), 5-(6-carboxyhexyl)-1-(3-cyclohexyl-3-hydroxypropyl) hydantoin (BW245C, Sigma), carbamylcholine chloride (carbachol, Sigma), fluprostenol (Cayman Chemical), (-)-isoproterenol hydrochloride (Sigma) および oxytocin (ペプチド研究所) を用いた。なお、fluprostenol は 99.5% エタノール溶液に、その他の薬物は脱イオン水に溶解し、Krebs 液で希釈し実験に用いた。浴槽中のエタノールの最高濃度は 0.05% であり、自発収縮活性には影響を与えなかった。

### 4. 統計処理法

本論文中の数値は、実験例数の平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E.M) を示している (3 例以上の場合)。なお、例数が 2 例の場合は平均値、1 例の場合はその値のみを示した。各卵巣ステージにおける平均値の差の検定は Student's *t* 検定を用いて行い、危険率が 5% 以下を有意差有りとして判定した。

## 結 果

### 1. 豚子宮筋自発収縮活性の変化

豚子宮から作製した輪走筋では、90 分間の平衡時間の間にいずれの標本でも自発収縮が発現した。一方、縦走筋では自発収縮が発現しない標本も認められ、その割合は FP と比べ FLP で増加した (FP: 12/40 標本 (30%), ELP: 4/12 標本 (33%), FLP: 6/10 標本 (60%))。図 1 には、各卵巣ステージで認められた自発収縮の典型例を示した。自発収縮が認められた標本についてその自発収縮の特徴を収縮頻度、収縮張力および収縮曲線の AUC を測定して比較検討した。

収縮頻度は、輪走筋では FP で  $7.2 \pm 1.0$  回/5 min ( $n=12$ ) であったものが、ELP では  $9.5 \pm 1.3$  回/5min ( $n=8$ ) に、FLP では  $22.5 \pm 6$  回/5min ( $n=4$ ) に増加していた。一方、縦走筋において自発収縮頻度は、FP では  $2.3 \pm 0.2$  回/5min ( $n=12$ )、ELP では  $2.1 \pm 0.4$  回/5min ( $n=8$ )、FLP では  $3 \pm 1.0$  回/5min ( $n=4$ ) であり卵巣ステージによる変化は認められなかった。自発収縮の振幅 (収縮張力) では、輪走筋において FP ( $270 \pm 46$  g/g tissue weight,  $n=13$ ) から黄体期 (luteal phase, LP) に向かうにつれ、頻度の上昇とは逆に低下する傾向を示した (ELP:  $199 \pm 60$  g/g tissue weight,  $n=5$ , FLP:  $216 \pm 61$  g/g tissue weight,  $n=4$ )。一方、縦走筋では FP,  $335 \pm 50$  g/g tissue weight ( $n=13$ )、ELP,  $543 \pm 79$  g/g tissue weight ( $n=5$ )、FLP,  $293 \pm 174$  g/g tissue weight ( $n=4$ ) と、自発収縮の振幅は ELP で増加し、FLP では FP のレベルまで低下した。自発収縮活性を示す 5 分間の AUC は、輪走筋では、FP を 100% とすると ELP では  $119 \pm 13\%$  ( $n=4$ )、FLP で  $88 \pm 22\%$  ( $n=3$ ) であり、各卵巣ステージ間に有意な差は認められなかった。しかし、縦走筋では、FP に比べて ELP で一過性の自発収縮 AUC の増加 ( $140 \pm 28\%$ ,  $n=4$ ) が見られた後、FLP では FP のレベルまで低下した ( $107 \pm 35\%$ ,  $n=3$ )。

### 2. 薬物反応性の変化

#### 1) 収縮性および弛緩性神経伝達物質

副交感神経節後線維の伝達物質、acetylcholine の類似体である carbachol は、いずれの卵巣

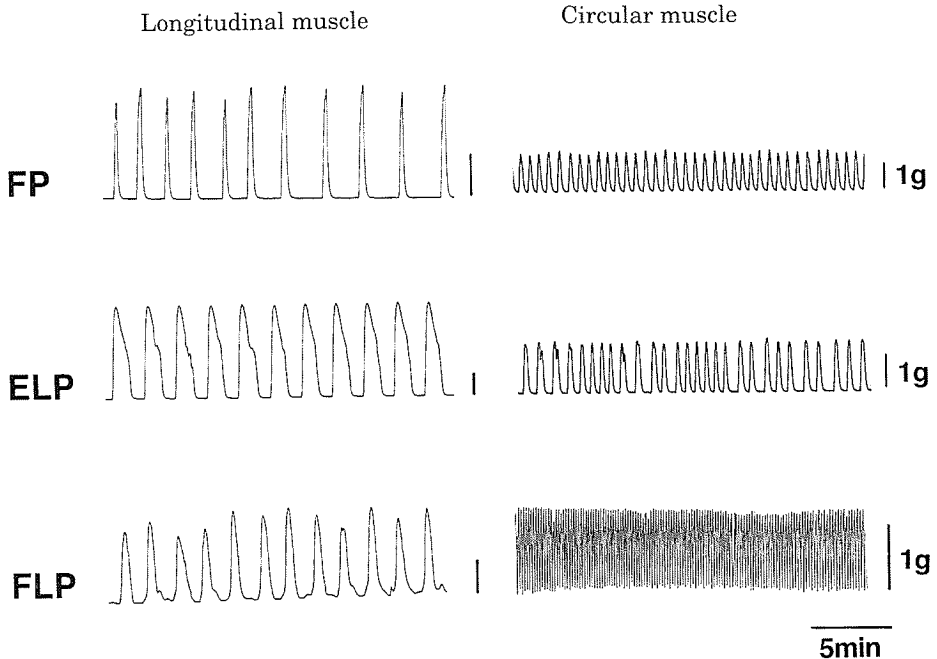


図 1. 卵胞期 (FP), 黄体初期 (ELP) および黄体開花期 (FLP) の子宮縦走筋, 輪走筋標本で観察された自発収縮の典型例

Fig. 1. Representative spontaneous contraction of the longitudinal and circular muscles of uteri isolated from pigs in three different ovarian stages (follicular phase ; FP, early luteal phase ; ELP, functional luteal phase ; FLP).

ステージにおいても縦走筋, 輪走筋に濃度依存性の収縮を誘起した (図 2)。この収縮作用は atropine により抑制されたので, ムスカリン受容体が関与する反応であることが確認できた。縦走筋において carbachol の  $-\log EC_{50}$  は, FP では  $7.13 \pm 0.1$  ( $n=7$ ), ELP では  $7.43 \pm 0.29$  ( $n=5$ ), FLP では  $7.21$  ( $n=2$ ) であり, 卵巣ステージ間で有意な差を認めなかったが, 最大収縮反応 (自発収縮の AUC に対する相対値) は, ELP ( $227.3 \pm 35.2\%$ ,  $n=5$ ), FLP ( $139.0\%$ ,  $n=2$ ) においては, FP ( $590.2 \pm 131.4\%$ ,  $n=7$ ) に比べ著明に低下していた。縦走筋では, 普遍化に用いた自発収縮 AUC の大きさが卵巣ステージにより異なることを既に明らかにしているので (FP=100%, ELP=140%, FLP=107%), この値を基に収縮反応の補正を行うと, 最大収縮反応は FP では 590.2%, ELP では 318%, FLP では 149% となり ELP, FLP にお

ける収縮反応の低下が確認できた。一方, 輪走筋の carbachol 反応性は, 卵巣ステージにより若干異なっていた。即ち,  $-\log EC_{50}$  は FP ( $6.92 \pm 0.05$ ,  $n=8$ ) に ELP ( $7.59 \pm 0.17$ ,  $n=6$ ), FLP ( $7.56 \pm 0.19$ ,  $n=3$ ) よりも低い値を示したが, 最大収縮反応は逆に FP ( $288.6 \pm 36.8\%$ ,  $n=8$ ) で高い値を示し, ELP ( $166.1 \pm 10.3\%$ ,  $n=6$ ), FLP ( $184.2 \pm 2.2\%$ ,  $n=3$ ) では低下する傾向であった (図 2, 表 1)。

一方, 交感神経節後線維の伝達物質である noradrenaline が作用する  $\beta$ -adrenaline 受容体作動薬 isoproterenol は, 自発収縮活性を抑制したが, この作用はいずれの卵巣ステージにおいて輪走筋よりも縦走筋の方で著明に出現した (図 3)。縦走筋の濃度反応曲線から得られた  $-\log EC_{50}$  および最大抑制率は, FP では  $9.54 \pm 0.22$ ,  $90.4 \pm 3\%$  ( $n=7$ ), ELP では  $9.83 \pm 0.25$ ,  $83.3 \pm 10\%$  ( $n$

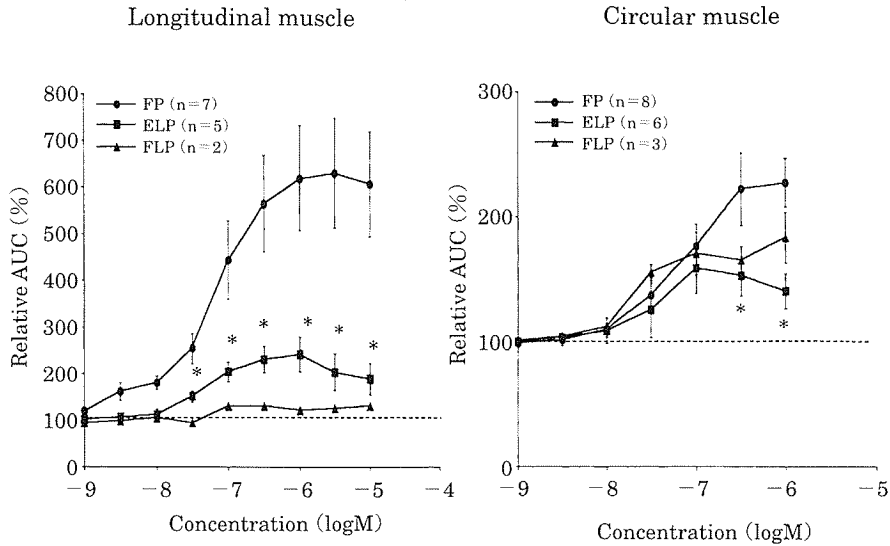


図 2. Carbachol 誘発性収縮の卵巣ステージによる変化  
各曲線は、卵胞期 (●), 黄体初期 (■), 黄体開花期 (▲) の豚子宮から作製した縦走筋, 輪走筋標本における carbachol の濃度反応関係を示す。\* は卵胞期と比較して有意差があることを示している (P < 0.05)。

Fig. 2. Ovarian stage-related changes of responsiveness to carbachol in the porcine uterus. Each curve represents the concentration-response relationship of carbachol in uterine longitudinal and circular muscles of follicular phase (FP; ●), early luteal phase (ELP; ■) and functional luteal phase (FLP; ▲). \*, significantly different from the corresponding value of FP.

=6), FLP では 9.83, 91.4% (n=1) であり, 卵巣ステージ間 (FP vs. ELP) で著明な差は認められなかった。一方, 輪走筋での isoproterenol 反応性 (-logEC<sub>50</sub> および最大抑制率) は, FP では 8.29±0.14, 81.9±3.27% (n=8), ELP では 8.27±0.19, 75.2±6.1% (n=5), FLP では 8.63±0.37, 75.4±18.5% (n=3) であり, 卵巣ステージ間で有意差はなかった (図 3, 表 1)。

2) 収縮性および弛緩性プロスタノイド

豚子宮には種々のプロスタノイド受容体が存在し, 子宮運動を興奮性または抑制的に調節していることが明らかにされている<sup>1)</sup>。そこで収縮性および弛緩性プロスタノイド受容体作動薬の作用を種々の卵巣ステージの子宮筋で比較検討した。

図 4 に示したように, prostaglandin F<sub>2α</sub> 受容体の作動薬 fluprostenol は, どの卵巣ステージにおいても縦走筋のみに濃度依存性の収縮反応を

引き起こした。収縮反応の -logEC<sub>50</sub> には, 卵巣ステージによる差は認められなかったが (FP : 8.49±0.45, n=4, ELP : 8.46±0.16, n=5, FLP は収縮反応が小さく算出不可能。n=4), 最大反応は ELP, FLP で FP に比較し小さくなっていた (FP : 207.6±33.8%, n=4, ELP : 146.6±17.7%, n=5, FLP : 107.9±6.0%, n=4) (図 4, 表 1)。一方, 輪走筋では, fluprostenol による収縮反応はいずれのステージでも著明ではなかった。

Prostaglandin D<sub>2</sub> 受容体の作動薬である BW 245C の自発収縮抑制作用の変化を筋層, 卵巣ステージで比較した。BW245C の作用には著明な筋層差が認められ, どのステージにおいても -log EC<sub>50</sub> は, 輪走筋 > 縦走筋であった (図 5)。卵巣ステージにより抑制作用が変化するか否かに注目すると, 輪走筋では -logEC<sub>50</sub>, 最大抑制率のいずれにも差は認められなかった (-logEC<sub>50</sub> および抑制

表 1. 卵胞期と黄体期（初期および開花期）での豚子宮筋薬物反応性の比較

Table 1. Ovarian stage-related changes in responsiveness of contractile and relaxant drugs in the porcine uterus

収縮薬	Carbachol		Fluprostenol		Oxytocin	
	縦走筋	輪走筋	縦走筋	輪走筋	縦走筋	輪走筋
最大反応	↓	↓	↓	ND	↓	↓
-logEC <sub>50</sub>	→	↑	→	ND	→	→

収縮抑制薬	Isoproterenol		BW245C	
	縦走筋	輪走筋	縦走筋	輪走筋
最大反応	→	→	↓	→
-logEC <sub>50</sub>	→	→	→	→

豚子宮筋の薬物反応性を卵胞期と黄体期（初期および開花期）とで比較した。各矢印は卵胞期と比較して黄体期に薬物反応（最大反応及び -logEC<sub>50</sub>）が増加（↑）、減少（↓）または変わらなかった（→）ことを示す。Fluprostenol は、輪走筋では著明な収縮作用を発現しなかったため、比較を行うことが出来なかった（ND）。

Responsiveness (E<sub>max</sub>; maximum response, -logEC<sub>50</sub>) of each drug was compared between follicular and luteal phases. Each arrow (↑; increase, ↓; decrease, →, unchanged) indicated change of response parameters in the luteal phase. Since circular muscle preparations were insensitive to fluprostenol at both follicular and luteal phases, comparison was not performed (ND).

率, FP: 8.15±0.15, 92.66±2.3%, n=7, ELP: 8.25±0.09, 87.2±4.1%, n=5, FLP: 8.30±0.22, 76.0±6.9%, n=3)。一方、縦走筋では、-logEC<sub>50</sub>には差がなかったものの (FP: 7.46±0.16, n=7, ELP: 7.99±0.16, n=4, FLP: 7.49±0.24, n=4), 最大抑制率は ELP で一過性に増大した後, FLP では FP とほぼ同じレベルに戻っていた (FP: 45.3±11.4%, n=7, ELP: 86.0±5.9%, n=4, FLP: 52.3±12.9%, n=4) (図 5, 表 1)。

### 3) Oxytocin

Oxytocin の適用により豚子宮筋の収縮活性は、濃度依存性に増加したが、その増加率は卵巣ステージにより異なっていた。図 6 に示したように濃度反応曲線は、いずれの筋層においても ELP では FP と比べて下方にシフトし（最大収縮反応の低下）、FLP では 100 nM でも小さな収縮しか認められなかった。しかしながら、-logEC<sub>50</sub>には卵巣ステージによる著明な変化は認められなかった（縦走筋: FP=9.3±0.1, n=7, ELP=9.2

±0.2, n=4, 輪走筋: FP=9.1±0.1, n=6, ELP=9.1±0.1, n=5) (図 6, 表 1)。

## 考 察

本研究は、卵巣ステージと子宮の自発収縮性、薬物反応性との関係を豚において明らかにすることを目的として行った。豚の卵巣周期は、卵巣ステージの肉眼的観察から FP, ELP, FLP に分けることができた。それぞれの卵巣ステージにおいて自発収縮活性および薬物（収縮薬、弛緩薬）反応性を検討したところ、豚子宮の自発収縮活性は卵巣ステージにより変化すること（特に縦走筋）、さらに、収縮性薬物の反応性は FP で高く LP には低下するが、弛緩性薬物の反応性には卵巣ステージ間で著明な差がないことが明らかになった。この LP における収縮性物質、弛緩性物質に対する反応性の変化の差は、progesterone が優位な妊娠期の子宮運動静止状態の機序を一部説明しうるものであった。

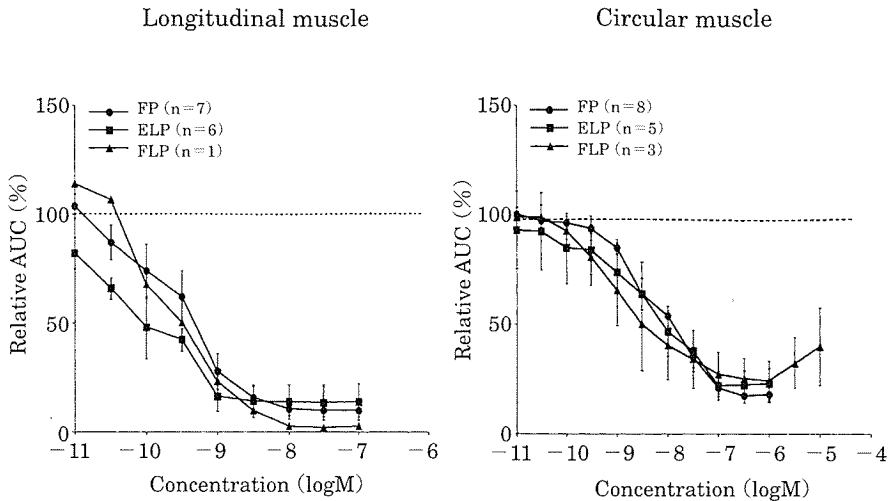


図 3. 各卵巣ステージにおける isoproterenol 誘発性収縮抑制作用の比較  
各曲線は、卵胞期 (●), 黄体初期 (■), 黄体開花期 (▲) の豚子宮から作製した縦走筋, 輪走筋標本における isoproterenol の濃度反応関係を示す。縦軸には isoproterenol 処置下の収縮活性を自発収縮の AUC を 100% とした時の相対値で, 横軸には isoproterenol の濃度 (logM) を示した。

Fig. 3. Comparison of inhibitory responses to isoproterenol in myometrium isolated from pigs in three different ovarian stages. Each curve represents the concentration-response relationship of isoproterenol in follicular phase (FP; ●), early luteal phase (ELP; ■) and functional luteal phase (FLP; ▲).

豚の子宮輪走筋標本を浴槽中に懸垂すると, 全ての標本で自発収縮が発現したが, 縦走筋においては自発収縮が発現しない標本もあり, その割合は FLP に増加した。同様な現象は妊娠豚子宮筋でも観察されている。即ち, 妊娠子宮では全ての輪走筋標本で自発収縮が観察されたが, 縦走筋では 40% 近くの標本が自発収縮を示さなかった<sup>17)</sup>。また, 豚子宮内圧を *in vivo* で測定した実験では, 発情期ではいずれの子宮でも自発収縮が認められるが, この時期の前後 3 日目においては 40% の豚子宮で自発収縮活性が発現しないこと, estrogen の子宮内膜投与処置により, 収縮活性が増加することが報告されている<sup>18)</sup>。一方, progesterone は, 種々の機序により子宮の収縮性を抑制することが知られている<sup>19)</sup>。これらのことから, FP に増加する estrogen により子宮の自発収縮活性は増加するが, LP には progesterone が優勢となるため子宮の収縮性が低下し, 自発収縮

活性を示さない標本の割合が増加したと推察される。自発収縮が発現した標本でその性質を比較すると, 輪走筋では収縮頻度 (FP < ELP < FLP) および収縮力 (FP > ELP > FLP) に卵巣ステージによる差が認められるものの収縮活性 (AUC) にはあまり差がなかった。一方, 縦走筋では, 収縮頻度には差がなかったものの, 収縮力は FP = FLP < ELP の順であり, この差が反映され収縮活性にも同様な卵巣ステージによる差 (FP = FLP < ELP) が生じていた。豚子宮内圧を測定した *in vivo* 実験では, 自発収縮頻度に発情ステージによる差は少ないものの, 収縮幅は発情期で高いことが報告されており<sup>18)</sup>, 今回の *in vitro* の成績とは一致していなかった。この原因としては, *in vivo* では子宮外からの神経性, 液性因子により自発収縮が影響を受ける可能性があること, 自発収縮の指標としているのが内圧変化であり, 分離した縦走筋, 輪走筋の収縮性の変化とは必ずしも



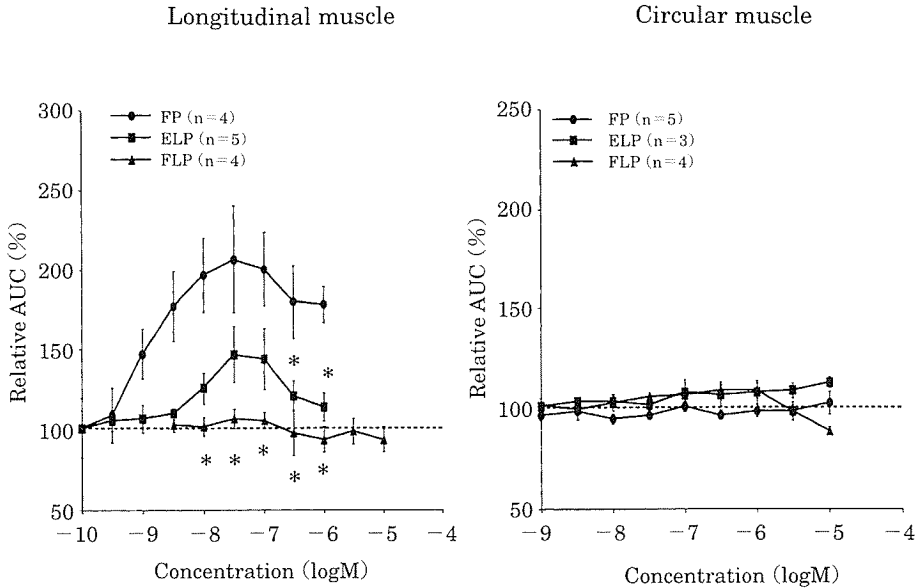


図 4. Fluprostenol 誘発性収縮の卵巣ステージによる変化  
各曲線は、卵胞期 (●), 黄体初期 (■), 黄体開花期 (▲) の豚子宮から作製した縦走筋, 輪走筋標本におけるの fluprostenol の濃度反応関係を示す。縦軸には fluprostenol 誘発性収縮を自発収縮の AUC を 100% とした時の相対値で, 横軸には fluprostenol の濃度 (logM) を示した。\* は卵胞期と比較して有意差があることを表している (P<0.05)。

Fig. 4. Ovarian stage-related changes of responsiveness to fluprostenol in porcine uterus. Each curve represents the concentration-response relationships of fluprostenol in uterine longitudinal and circular muscles of follicular phase (FP ; ●), early luteal phase (ELP ; ■) and functional luteal phase (FLP ; ▲). \*, significantly different from the corresponding value of FP.

一致しないことなどが考えられる。

Carbachol, fluprostenol および oxytocin は, それぞれ子宮平滑筋上のムスカリン受容体, prostaglandin F<sub>2α</sub> 受容体, oxytocin 受容体に作用し細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を増加させ収縮を誘起する。未経産豚の発情前期子宮筋を用いたこれまでの研究では, これら薬物の収縮反応は, 輪走筋よりも縦走筋で強いことが明らかになっている<sup>1,2,6</sup>)。本実験に用いた経産豚子宮においても, 同様な筋層による反応性の差 (縦走筋>輪走筋) が全ての卵巣ステージにおいて確認できた。3 種類の収縮薬の反応性 (最大収縮および 50% 効果濃度) を FP と LP 間で比較しどのように異なるのかまとめたのが表 1 である。LP (ELP, FLP) ではいずれの筋層においても最大収縮は低下したが, -logEC<sub>50</sub>

には殆ど変化が認められなかった。この成績は, 卵巣摘出ラット子宮で estrogen または progesterone の処置によっては carbachol および oxytocin 収縮の EC<sub>50</sub> は変化しないが, progesterone 処置で最大収縮高が低下したという報告<sup>17)</sup> と一致していた。このような最大収縮反応の低下は, progesterone 処置によりムスカリンまたは oxytocin 受容体の数が低下することが原因とされている<sup>17)</sup>。本実験では受容体蛋白質に関しての解析は行っていないが, 豚においても LP に progesterone の作用で両受容体の down regulation が起こり, 受容体数が低下し最大収縮反応が減少した可能性がある。一方, fluprostenol が作用する prostaglandin F<sub>2α</sub> 受容体の mRNA の発現は, 卵巣切除後 estrogen 処置で増加し, progesterone

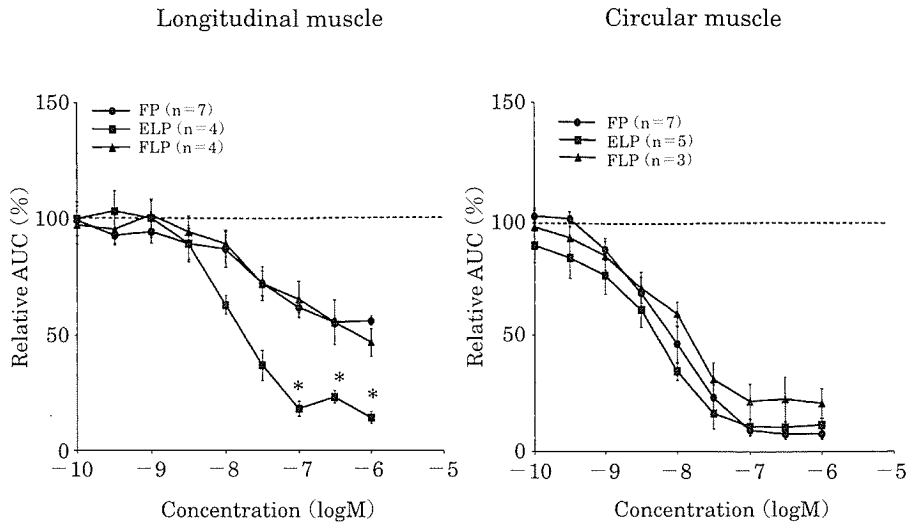


図 5. 各卵巢ステージにおける BW245C 誘発性収縮抑制作用の比較

各曲線は、卵胞期 (●), 黄体初期 (■), 黄体開花期 (▲) の豚子宮から作製した縦走筋, 輪走筋標本における BW245C の濃度反応関係を示す。縦軸には BW245C 処置下の収縮活性を自発収縮の AUC を 100% とした時の相対値で, 横軸には BW245C の濃度 (logM) を示した。\* は卵胞期と黄体初期の間に有意差があることを表している (P<0.05)。

Fig. 5. Comparison of inhibitory responses to BW245C in myometrial strips isolated from pigs in three different ovarian stages. Each curve represents the concentration-response relationship of BW245C in follicular phase (FP; ●), early luteal phase (ELP; ■) and functional luteal phase (FLP; ▲). \*, significantly different from the corresponding value of FP.

処置では変化しないことが報告されている<sup>20)</sup>。即ち, prostaglandin  $F_{2\alpha}$  受容体数は progesterone では変化しないが, estrogen により up regulation されると考えられる。この報告は, FP の豚子宮筋で fluprostenol 誘発性収縮が増加するという本実験の成績を支持する。輪走筋では, いずれの卵巢ステージでも収縮が誘起されなかったが, これは元々, 輪走筋の受容体量が少ないため, たとえ FP で受容体数が増えても収縮反応に反映されないのが原因と考えられる。

Isoproterenol は,  $\beta_2$ -adrenaline 受容体に作用して細胞内 cAMP 濃度を増加させ, 豚子宮筋の弛緩を誘起し自発収縮を抑制する薬物である<sup>3)</sup>。本実験で isoproterenol は, いずれの卵巢ステージにおいても, 縦走筋および輪走筋の自発収縮を濃度依存性に抑制した。この抑制作用は, 既に発情前期豚で明らかにされているように縦走筋で著

明であり, 原因として受容体の分布密度が異なることが (縦走筋>輪走筋) 挙げられている<sup>3)</sup>。Isoproterenol の子宮収縮抑制作用 ( $-\log EC_{50}$ , 最大抑制反応) には, 卵巢ステージによる著明な差は認められなかった (表 1)。ラットにおいて, progesterone が優位となる妊娠期には,  $\beta_2$ -adrenaline 受容体数およびこの受容体が関与した弛緩反応が増大することが知られている<sup>21,22)</sup>。これらの現象は, progesterone により  $\beta_2$ -adrenaline 受容体数が up regulation されるか, または  $\beta_2$ -adrenaline 受容体の平滑筋細胞での分布 (細胞質および細胞膜) が変化することが原因と考えられている<sup>23,24)</sup>。しかしながら, 本実験では血中 progesterone 濃度が高いと考えられる LP でも isoproterenol の反応性は変わらなかった。この成績は, 同様に progesterone 濃度が高いと考えられる妊娠期の豚子宮で isoproterenol の反応性が増加したとい

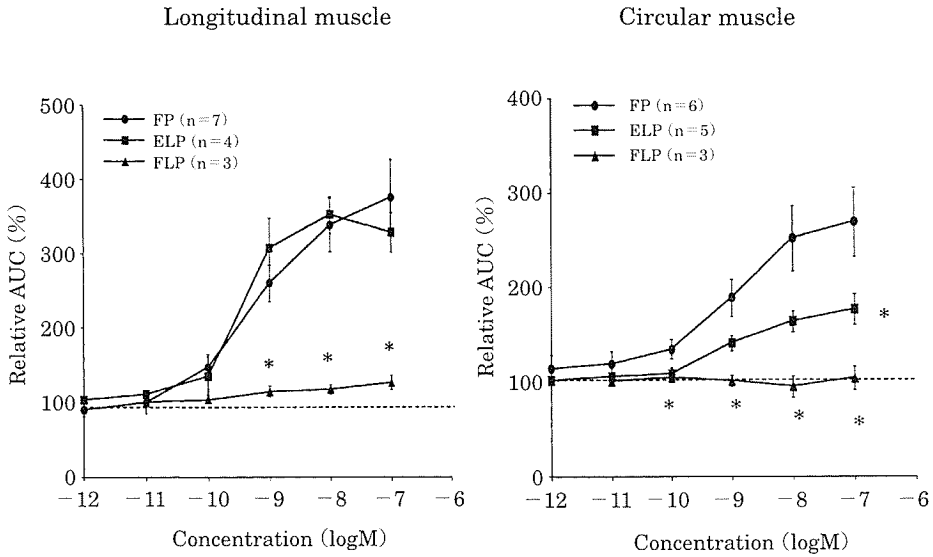


図 6. Oxytocin 誘発性収縮の卵巢ステージによる変化  
 各曲線は、卵胞期 (●), 黄体初期 (■), 黄体開花期 (▲) の豚子宮から作製した縦走筋, 輪走筋標本における oxytocin の濃度反応関係を示す。縦軸には oxytocin 誘発性収縮を自発収縮の AUC を 100% とした時の相対値で, 横軸には oxytocin の濃度 (logM) を示した。\* は卵胞期と比較して有意差があることを示している (P < 0.05)。

Fig. 6. Ovarian stage-related changes of responsiveness to oxytocin in porcine uterus. Each curve represents the concentration-response relationship of oxytocin in the uterine longitudinal and circular muscles of follicular phase (FP ; ●), early luteal phase (ELP ; ■) and functional luteal phase (FLP ; ▲). \*, significantly different from the corresponding value of FP.

う成績とは一致していなかった<sup>1)</sup>。この乖離が起きる原因は現在のところ不明であるが, 高い血中 progesterone 濃度の持続時間に LP と妊娠期では差があるために, isoproterenol が作用する  $\beta_2$ -adrenaline 受容体の発現調節機構にも差が生じた可能性が示唆される。今後, 各卵巢ステージにおける受容体数の変化を検討することが必要と思われる。Prostaglandin  $D_2$  受容体は, prostaglandin  $D_2$  により活性化する受容体で, 細胞内の cAMP を増加し平滑筋を弛緩させる。この受容体の子宮での発現は, ヒトと豚のみで報告されている<sup>1,25)</sup>。Prostaglandin  $D_2$  受容体の選択的作動薬 BW245C は, 既報<sup>1)</sup> に一致して豚子宮輪走筋の収縮を縦走筋よりも強く抑制した。今回, 卵巢ステージ間の比較において, 輪走筋では差 (-log EC<sub>50</sub>, 最大抑制反応) は認められなかったが, 縦

走筋では ELP で一過性の最大抑制の増加が起きていた。しかし, 縦走筋の -logEC<sub>50</sub> には卵巢ステージによる差は認められなかった。これらのことから, prostaglandin  $D_2$  受容体を介する収縮抑制反応にも卵巢ステージによる著明な差がないことが示唆された。

以上の成績から, 豚子宮筋の収縮性薬物に対する反応 (特に最大収縮) は LP で FP に比較して低下するが, 弛緩 (収縮抑制) 性薬物の反応には著明な卵巢ステージによる変化が認められないことが明らかになった。即ち, LP では, 収縮性受容体数は低下するが, 弛緩性受容体数は変化しないために, 子宮は外因性の収縮刺激 (収縮性活性物質) に対して反応しにくい状態になっていると考えられる。これら薬物反応性の変化には, 黄体から分泌される progesterone および卵胞から分泌

される estrogen が大きな役割を担っていると推察されるが、今後、各種受容体の数、親和性の卵巣ステージによる変化を検討していくことが必要と考えられる。

## 謝 辞

本研究の一部は、文部科学省ハイテクリサーチ科学研究費（酪農学園大学）の助成を受けて行われた。

## 参 考 文 献

- 1) CAO, J., M. SHAYIBUZHATI, T. TAJIMA, T. KITAZAWA and T. TANEIKE : In vitro pharmacological characterization of the prostanoid receptor population in the non-pregnant porcine myometrium. *Eur. J. Pharmacol.*, 442, 115-123, 2002.
- 2) KITAZAWA, T., T. KAJIWARA, A. KIUCHI, H. HATAKEYAMA and T. TANEIKE : Muscle layer and region-dependent distributions of oxytocin receptors in the porcine myometrium. *Peptides*, 22, 963-974, 2001.
- 3) KITAZAWA, T., K. NAKAGOSHI, H. TERAOKA and T. TANEIKE : 5HT<sub>7</sub> receptor and  $\beta_2$ -adrenoceptor share in the inhibition of porcine uterine contractility in a muscle layer-dependent manner. *Eur. J. Pharmacol.*, 433, 187-197, 2001.
- 4) KITAZAWA, T., H. HATAKEYAMA, J. CAO and T. TANEIKE : Pregnancy-associated changes in responsiveness of the porcine myometrium to bioactive substances. *Eur. J. Pharmacol.*, 469, 135-144, 2003.
- 5) TANEIKE, T., H. MIYAZAKI, H. NAKAMURA and A. OHGA : Autonomic innervation of the circular and longitudinal layers in swine myometrium. *Biol. Reprod.*, 45, 831-840, 1991.
- 6) TANEIKE, T., S. BANDO, K. TAKASAKI, M. OKUMURA, H. SATO, H. TERAOKA, T. KITAZAWA and A. OHGA : Muscle layer and regional differences in autonomic innervation and responsiveness to transmitter agents in swine myometrium. *J. Auton. Pharmacol.*, 14, 213-227, 1994.
- 7) FRANCHI, A.M., M. CHAUD, E.S. BORDA, M.F. GIMENO, M.A. LAZZARI and A.I. GIMENO : Spontaneous motility and prostaglandin generation in rat uterine horns isolated during the estrous cycle. *Prostaglandins*, 22, 637-642, 1981.
- 8) HIRSBRUNNER, G., B. KNUTTI, I. LIU, U. KUPFER, G. SCHOLTYSIK and A. STEINER : An in vitro study on spontaneous myometrial contractility in the cow during estrus and diestrus. *Anim. Reprod. Sci.*, 70, 171-180, 2002.
- 9) OSA, T. and T. FUJINO : Electrophysiological comparison between the longitudinal and circular muscles of the rat uterus during the estrous cycle and pregnancy. *Jpn. J. Physiol.*, 28, 197-209, 1978.
- 10) TROEDSSON, M.H., A.O. WISTROM, I.K. LIU, M. ING, J. PASCOE and M. THURMOND. Registration of myometrial activity using multiple site electromyography in cyclic mares. *J. Reprod. Fertil.*, 99, 299-306, 1993.
- 11) ABDALLA, F.M., E. MAROSTICA, Z.P. PICARELLI, L.C. ABREU, M.C. AVELLAR and C.S. PORTO : Effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptor expression in rat myometrium. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 213, 139-148, 2004.
- 12) MATUCCI, R., B. BIANCHI, L. MANTELLI, C. GHELARDINI, G.B. VANNELLI and M. MAGGI : Influence of oestrogens on muscarinic receptor density and contractile responses in the guinea-pig uterus. *J. Reprod. Fertil.*, 107, 153-160, 1996.
- 13) OROPEZA, M.V., H. PONCE MONTER, M. REYNOSO, ISLA and M.G. CAMPOS : The ovarian and cervical regions of the rat uterus display a different contractile response to serotonin and prostaglandinF<sub>2 $\alpha$</sub> . I. The estrous cycle. *Life. Sci.*, 66, 345-351, 2000.
- 14) BATRA, S. : Influence of chronic oestrogen treatment on the density of muscarinic cholinergic receptors and calcium channels in the rabbit uterus. *J. Endocrinol.*, 125, 185-189, 1990.
- 15) DONG, Y.L. and C. YALLAMPALLI : Pregnancy and exogenous steroid treat-

- ments modulate the expression of relaxant EP<sub>2</sub> and contractile FP receptors in the rat uterus. *Biol. Reprod.*, 62, 533-539, 2000.
- 16) HOUDEAU, E., B. ROSSANO and M.J. PRUD'HOMME : Regional and muscle layer variations in cholinergic nerve control of the rat myometrium during the estrous cycle. *Auton. Neurosci.*, 104, 1-9, 2003.
- 17) RUZYCKY, A.L. and D.J. CRANKSHAW : Role of inositol phospholipid hydrolysis in the initiation of agonist-induced contractions of rat uterus : effects of domination by 17 $\beta$ -estradiol and progesterone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 66, 10-17, 1988.
- 18) LANGENDIJK, P., E.G. BOUWMAN, N.M. SOEDE, M.A. TAVERNE and B. KEMP : Myometrial activity around estrus in sows : spontaneous activity and effects of estrogens, cloprostenol, seminal plasma and clenbuterol. *Theriogenology*. 57, 1563-1577, 2002.
- 19) PUTNAM, C.D., D.W. BRANN, R.C. KOLBECK and V.B. MAHESH : Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites : mediation by progesterone and gamma amino butyric acid A receptor systems. *Biol. Reprod.*, 45, 266-272, 1991.
- 20) ENGSTROM, T. : The regulation by ovarian steroids of prostaglandin synthesis and prostaglandin-induced contractility in non-pregnant rat myometrium. Modulating effects of isoproterenol. *J. Endocrinol.*, 169, 33-41, 2001.
- 21) COHEN-TANNOUDJI, J., V. VIVAT, J. HEILMANN, C. LEGRAND and J.P. MALTIER : Regulation by progesterone of the high-affinity state of myometrial  $\beta$ -adrenergic receptor and of adenylate cyclase activity in the pregnant rat. *J. Mol. Endocrinol.*, 6, 137-145, 1991.
- 22) ENGSTROM, T., P. BRATHOLM, H. VILHARDT and N.J. CHRISTENSEN : Effect of pregnancy on rat myometrial  $\beta_2$ -adrenoceptor mRNA and isoproterenol-induced relaxation of isolated uterine strips. *J. Endocrinol.*, 153, 393-399, 1997.
- 23) MALTIER, J.P., Y. BENGHAN-EYENE and C. LEGRAND : Regulation of myometrial  $\beta_2$ -adrenergic receptor by progesterone and estradiol-17 $\beta$  in late pregnant rats. *Biol. Reprod.*, 40, 531-540, 1989.
- 24) NIMMO, A.J., E.M. WHITAKER, J.F. MORRISON and J.R. CARSTAIRS : Multiple mechanisms of heterologous  $\beta$ -adrenoceptor regulation in rat uterus. *J. Endocrinol.*, 147, 303-309, 1995.
- 25) SENIOR, J., R. SANGHA, G.S. BAXTER, K. MARSHALL and J.K. CLAYTON : In vitro characterization of prostanoid FP-, DP-, IP- and TP- receptors on the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, 107, 215-221, 1992.

## An in Vitro Study on Spontaneous Contractility and Drug Responsiveness of Porcine Myometrium During Three Ovarian Stages

Takio KITAZAWA, Reiko MIYAZAKI, Gentaro ISOE, Jinshan CAO and Tetsuro TANEIKE

Department of Pharmacology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University,  
Ebetsu Hokkaido 069-8501, Japan

The aim of the present study was to clarify changes in spontaneous contractility and drug responsiveness of the porcine uterus during ovarian stages. Myometrial smooth muscle strips were collected from slaughtered pigs in follicular, early luteal and functional luteal phases. Longitudinal muscle (LM) and circular muscle (CM) were mounted in organ bath and their spontaneous contractility and drug responsiveness were examined in vitro.

During the equilibration periods (90 min), all CM strips showed spontaneous contraction regardless of the ovarian stages, but the number of LM strips contracting spontaneously decreased in the functional luteal phase. Spontaneous contractility was characterized using frequency, amplitude and area under the curve (AUC). In LM strips, amplitude and AUC, but not frequency, changed during the ovarian stages. On the other hand, amplitude and frequency, but not AUC of CM strips, changed during the ovarian stages. Carbachol, fluprostenol and oxytocin caused contraction of the myometrium. LM was more sensitive to these contractile agents than was CM at all ovarian stages. Comparing the contractile responses in follicular and luteal phases, the magnitude of maximum contraction but not the  $EC_{50}$  value decreased in the functional luteal phase. Isoproterenol (LM > CM) and BW245C (CM > LM) inhibited spontaneous myometrial contraction in a muscle layer-dependent manner.  $EC_{50}$  values and maximum inhibition of both drugs were not different in the follicular and luteal phases.

In conclusion, a significant difference in spontaneous contractility during the ovarian stages was found in LM but not in CM. Responses to contractile drugs decreased from the follicular phase to luteal phase, but those to inhibitory drugs did not change in these two phases, suggesting that porcine uterine smooth muscle has low susceptibility to uterotonic agents in the luteal phase probably due to progesterone.

*Jpn. J. Swine Science*, 42, 4 : 165-177

**Key words** : porcine uterus, ovarian cycle, spontaneous contraction, drug responsiveness, progesterone