

鶏胚におけるミューラー管の発育を持続させるエストロジェンの作用時期

小柳 深*・梶田信也**

*九州東海大学農学部

**九州東海大学総合農学研究所, 熊本県阿蘇郡長陽村 869-1404

孵卵 5, 10 および 15 日目にエストラジオールベンゾエイト (EB) を 1 mg 投与した成熟鶏の卵管の発達程度を調査した。雌では、孵卵 5 および 10 日目に EB を投与したものは小さな左側卵管と対照鶏よりも発達した右側卵管とが認められた。孵卵 15 日目に EB を投与したものでは右側卵管重量は対照鶏と同様であったが、左側卵管は対照鶏の 74% まで増大した。雄では、孵卵 5 日目に EB を投与した 50% の個体にのみ未発達な左右両側の卵管が出現し、孵卵 10 および 15 日目に EB を投与したものには卵管は認められなかった。これらのことから雌鶏においては右側ミューラー管の発達を維持できるエストロジェンの作用時期は孵卵の 10 日目から 15 日目の間にあると考えられる。一方、雄鶏のミューラー管は雌の右側ミューラー管よりも孵卵の早い時期に発達を停止することおよび発育を停止したミューラー管はその後外因性エストロジェンによって発達しないものと推察された。

一方、孵卵中に EB を投与した雄鶏に孵化後 EB を投与することにより、漏斗部、膨大部、峡部、子宮部および腔部に形態的に区分可能な左右両側卵管の発達がみられた。したがって、孵卵中のミューラー管の発達が継続すれば、雄においても孵化後のエストロジェンの投与により、ミューラー管は機能的卵管として分化・発達する可能性が示唆された。

キーワード: エストロジェン, ミューラー管, 卵管, ニワトリ

緒 言

雌鶏の右側ミューラー管は孵卵のおよそ 8 日目に発育を停止し、雄鶏では左右のミューラー管は孵卵の 8 日～13 日目に退行することが知られている (Aitken, 1971; Woods *et al.*, 1975)。ミューラー管の分化・発達にはエストロジェンとミューラー管抑制ホルモン (AMH) が関与しており、エストロジェンは AMH の作用を阻害するものと考えられている (Burns, 1973; Hutson *et al.*, 1981, 1982; MacLaughlin *et al.*, 1983; Carre-Eusebe *et al.*, 1996)。梶田・小柳 (2001) および Masuda and Koyanagi (2002) は、孵卵 5 日目にエストロジェンを投与すると、雌雄の成熟鶏に左右両側の卵管が出現することを報告した。しかし、孵卵中のどの時期にエストロジェンが存在すると卵管を出現させるのか、その詳細については不明である。エストロジェン合成に関与する *aromatase P-450 mRNA* は孵卵 7 日目の鶏胚の左右卵巣に出現し (水野, 2001)、エストロジェンは孵卵 7.5 日目の雌雄鶏胚の血中に認められるようになり、雌鶏では

孵卵 17.5 日目まで急増することが報告されている (Woods and Brazzil, 1981)。また、AMH はバイオアッセイによって孵卵 8 日目以降の雌雄性腺に検出され、孵卵 10 日目にその活性は最大となることが報告されている (Carre-Eusebe *et al.*, 1996)。これらの報告は、鶏の卵管出現の有無には、ミューラー管に対するエストロジェンの作用時期が大きく関与していることを示唆している。

本研究は、鶏の卵管への分化・発達を可能にするエストロジェンのミューラー管に対する作用時期について検討したものである。

材料および方法

孵卵 5, 10 および 15 日目の白色レグホーン種の種卵の卵白内に 0.1 ml のゴマ油に懸濁した 1 mg のエストラジオールベンゾエイト (EB) を注入し孵卵を継続した。孵化後、成熟した鶏の性は Wolff and Ginglinger (1935), Haffen and Wolff (1977) および梶田・小柳 (1990) の方法にもとづき、第二次性徴と解剖後の性腺の形態から判別した。対照には無処理の個体を用いた。雌鶏については初産から 84 日間の産卵を記録した後、11 カ月齢で

屠殺し、卵巣重量、黄色卵胞数、破裂卵胞数および左右卵管重量を測定した。雄鶏については11カ月齢で屠殺し、卵管の有無を肉眼的に調べた。

さらに、孵卵5日目に同様にエストロジェン処理し、羽毛色により雌雄を判別した25日齢の褐色レグホーン種の雄鶏を供試し、25日齢から29日間0.1mlのプロピレングリコールに溶解したEBを1日当たり1mg投与した(EB-EB群)。対照には孵卵5日目に0.1mlのゴマ油を投与し、孵化後無処理の雄鶏(oil-intact群)および孵卵5日目にEBを投与し、孵化後無処理の雄鶏(EB-intact群)を用いた。これらの雄鶏を54日齢で屠殺し、体重、性腺重量および卵管重量を測定した。得られた値は、Tukeyの方法(Tukey, 1951)で有意差の有無を検討した($P < 0.05$)。

結 果

白色レグホーン種のEB処理した雌鶏の体重、卵巣重量は対照鶏と同様であった(表1)。孵卵5, 10および15日目EB処理鶏の黄色卵胞数は対照鶏との間に差は認められず、孵卵5および15日目EB処理鶏の破裂卵胞数は対照鶏よりも少なくなったが($P < 0.05$)、3つの投与区間に差は認められなかった。

孵卵5および10日目にEBを投与した雌鶏では左側卵管重量は対照の約45%に減少し($P < 0.05$)、15日目EB処理鶏は対照の74%となった。右側卵管重量は孵卵の5および10日目のもので対照の約6倍となったが($P < 0.05$)、15日目EB処理鶏の右側卵管重量は対照鶏

とほぼ同じ値を示した(表2)。

孵卵5, 10および15日目EB処理鶏のそれぞれ3/5羽、1/5羽および7/7羽に産卵が認められたが、初産日齢は対照よりも遅れる傾向を示し、産卵率も低下する傾向にあった(表2)。さらに、対照鶏には腹腔内排卵は確認されなかったがEB処理鶏のそれぞれ3/5羽、2/5羽および3/7羽に腹腔内排卵が認められた。

雄鶏については、孵卵5日目EB処理鶏の4/8羽にのみ左右の卵管が認められた(表3)。両側卵管は雌の対照群における左側卵管よりも明らかに細かった。また、片側卵管のみが発達したものはみられなかった。

EB-EB, EB-intactおよびoil-intact群の体重および左側精巣重量はほぼ同じであった(表4)。しかし、EB-EBおよびEB-intact群の右側精巣重量は、oil-intact群のそれぞれ43および64%に減少した($P < 0.05$)。また、EB-EB群には左右両側に良く発達した卵管が認められた。左右卵管の発達程度は同等であり、ともに漏斗部、膨大部、峽部、子宮部および腔部に区分できた。一方、EB-intact群ではわずかに発達した左右の卵管が認められたにすぎず、oil-intact群には卵管は全く認められなかった。

考 察

孵卵5, 10および15日目にEBを投与した成熟雌鶏の体重および卵巣重量は対照鶏とほぼ同等の値を示した。一方、雄鶏においても成熟時の体重および精巣重量は対照鶏と同等であったことから(梶田・小柳, 1990)、孵卵

表 1. 孵卵中にエストラジオールベンゾエイト(EB)を投与した11カ月齢の雌鶏の卵巣重量と卵胞数

Table 1. Ovary weight and No. of follicles in the female chicken of 11 months injected with estradiol benzoate (EB) during incubation

EB 投与日 Day of EB injection	供試羽数 No. of birds	体重 (kg) Body weight (kg)	卵巣重量 ¹⁾ Ovary weight ¹⁾	黄色卵胞数 No. of yellow follicles	破裂卵胞数 No. of ruptured follicles
5日目 5th day	5	1.9±0.3 ²⁾	2.11±1.44	3.8±3.0 ^b	2.0±1.0 ^b
10日目 10th day	5	2.1±0.1	3.02±0.85	10.0±4.7 ^a	3.4±1.1 ^{ab}
15日目 15th day	7	1.8±0.2	2.95±0.59	4.9±3.0 ^b	2.6±1.4 ^b
対照 Control	9	1.7±0.1	2.92±0.50	7.2±0.8 ^{ab}	4.4±0.7 ^a

¹⁾ 体重100g当たりの重量(g)

¹⁾ Weight per 100 g of body weight (g)

²⁾ 平均値±標準偏差

²⁾ Mean±SD

^{a, b} 同一カラムの異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)。

^{a, b} Means with the different superscripts within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

表 2. 孵卵中にエストラジオールベンゾエイト (EB) を投与した 11 カ月齢の雌鶏の卵管重量と産卵率
Table 2. Oviduct weight and egg production rate in the female chicken of 11 months injected with estradiol benzoate (EB) during incubation

EB 投与日 Day of EB injection	供試羽数 No. of birds	卵管重量 ¹⁾ Oviductal weight ¹⁾		産卵した羽数 No. of birds laid	初産日齢 Age at first egg production	産卵率 ²⁾ Egg production rate
		左側 Left	右側 Right			
5 日目 5th day	5	1.38±0.74 ^{3)b}	0.56±0.40 ^a	3	163.7±31.8	30.2±34.2 ^{ab}
10 日目 10th day	5	1.41±0.86 ^b	0.64±0.15 ^a	1	165	67.9
15 日目 15th day	7	2.26±0.66 ^{ab}	0.11±0.07 ^b	7	154.3±25.8	21.6±24.2 ^b
対照 Control	9	3.07±0.18 ^a	0.14±0.21 ^b	9	141.3±10.5	77.9±28.9 ^a

¹⁾ 体重 100 g 当たりの重量 (g)

¹⁾ Weight per 100 g of body weight (g)

²⁾ 初産から 84 日間の産卵率 (%/日/羽)

²⁾ Rate of egg production during the 84 days after first egg production (%/day/bird).

³⁾ 平均値±標準偏差

³⁾ Mean±SD

^{a,b} 同一カラムの異なる符号間に有意差あり (P<0.05).

^{a,b} Means with the different superscripts within the same column are significantly different (P<0.05).

表 3. 孵卵中にエストラジオールベンゾエイト (EB) を投与した 11 カ月齢の雄鶏における卵管の出現

Table 3. Appearance of oviduct in the male chicken of 11 months injected with estradiol benzoate (EB) during incubation

EB 投与日 Day of EB injection	羽数 No. of birds	両側の卵管が 認められた羽数 No. of birds with both oviducts
5 日目 5th day	8	4
10 日目 10th day	8	0
15 日目 15th day	8	0
対照 Control	7	0

の時期にかかわらずエストロジェンの投与は、少なくとも成熟後の体重および性腺重量には影響しないものと考えられる。

孵卵 5 日目に EB を投与した雌鶏では左側卵管が対照鶏に比較して未発達であり、右側卵管は増大しているのが認められ、初産日齢の遅延および産卵率の低下傾向がみられた。Masuda and Koyonagi (2002) は、孵卵 5 日

目に EB を投与した雌鶏で、本研究の結果と同様な傾向を認め、産卵率低下の原因として、左側卵管機能の未発達ならびに卵胞成長と卵輸送に関与する中枢神経機構の形成不全の可能性を示唆している。さらに、本研究では孵卵 10 日目に EB を投与した雌鶏の卵管の発達程度ならびに産卵状況は、孵卵 5 日目に EB を投与したものとはほぼ同様であった。しかし、孵卵 15 日目に EB を投与した雌鶏では左側卵管は対照鶏の 74% にまで発達し、すべての雌が産卵したが、多くの雌鶏には腹腔内排卵がみられ産卵率は低下した。したがって、孵卵中に投与したエストロジェンの卵管発達に及ぼす影響は投与日によって異なることが明らかになり、少なくとも孵卵 15 日目を以降の後期胚では外因性エストロジェンによる左側ミューラー管の孵化後の卵管への発育阻害の程度は小さいものと考えられる。

孵卵 5 日目および 10 日目に EB を投与した雌鶏には右側卵管が発達し、15 日目処理鶏には右側卵管の発達は認められなかったことから、右側ミューラー管の発達を維持させるエストロジェンの作用時期は孵卵の 10 日目から 15 日目の間にあると考えられる。一方、雄鶏では孵卵 5 日目 EB 処理鶏にのみ左右の卵管がみられたことから、エストロジェン投与による卵管出現の有無には雌雄で違いがあることが明らかとなった。パイオアッセイによる AMH 活性は孵卵 8 日目以降の雌雄性腺にみられ、精巣の方が卵巣よりも高いこと (Hutson *et al.*, 1981) な

表 4. エストラジオールベンゾエイト (EB) 投与による 25 日齢の雄鶏における卵管発達の誘起

Table 4. Induction of oviductal development in the male chicken at the 25 days by the injection of estradiol benzoate (EB)

EB 投与 EB injection		羽数 No. of birds	体重 Body weight	卵巣重量 ³⁾ Testis weight ³⁾		卵管重量 Oviductal weight ³⁾	
孵卵中 ¹⁾ During incubation	孵化後 ²⁾ after hatching			左側 Left	右側 Right	左側 Left	右側 Right
+	+	4	664.3±128.4 ⁴⁾	1.09±0.62	0.63±0.11 ^b	356.3±205.9 ^a	355.2±215.1 ^a
+	-	5	807.4±90.1	1.42±0.55	0.95±0.36 ^b	3.8±2.5 ^b	2.4±1.1 ^b
-	-	5	810.2±54.5	1.70±0.33	1.43±0.29 ^a	NO	NO

(ゴマ油)
(Sesame oil)

¹⁾ 孵卵 5 日目の卵白内に 1 回投与 (1 mg)

¹⁾ EB was injected into egg albumen at 5th day of incubation (1 mg).

²⁾ 25 日齢から 28 日間投与 (1 mg/日)

²⁾ EB was injected during 28 days after the age of 25 days (1 mg/day).

³⁾ 体重 10 g 当たりの重量 (mg)

³⁾ Weight per 10 g of body weight (mg)

⁴⁾ 平均値±標準偏差

⁴⁾ Mean±SD

NO: 卵管なし

NO represents no oviduct.

^{a,b} 同一カラムの異符号間に有意差あり (P<0.05).

^{a,b} Means with the different superscripts within the same column are significantly different (P<0.05).

らびに孵卵 8 日目から 17 日目の精巢の AMH mRNA レベルは卵巣よりも高いことが報告されている (Carre-Eusebe *et al.*, 1996). 一方, エストロジェンは AMH と AMH レセプターとの結合を阻害する可能性が考えられており (Hutson *et al.*, 1981), 血中エストロジェン濃度は雌胚において孵卵 7.5 日目から 17.5 日目まで急増するが, 雄胚では雌胚よりも常に低いことが報告されている (Woods and Brazzill, 1981). したがって, 孵卵 5 日目に EB を投与した雌雄の鶏に左右両側の卵管が出現したのは, 外因性エストロジェンがその後分泌される AMH を阻害した結果であると考えられる. また, 雄鶏において孵卵 10 日目以降のエストロジェン投与によって卵管の出現がみられなかった原因には, 内因性エストロジェン濃度が低いことおよび AMH の生理活性が雌よりも高いことが挙げられ, エストロジェンの投与前にミューラー管が退行していた可能性が考えられる. さらに, 孵卵 15 日目に EB を投与した雌鶏には右側卵管, 雄鶏には左右両側卵管がそれぞれ発達しなかったことから, 一度 AMH の作用を受けたミューラー管は, その後エストロジェンが存在しても発達しないものと推察される.

本研究においては, 孵卵 5 日目に EB 処理後無処理の

雄鶏にはわずかに発達した卵管がみられ, 同じ処理をした後 25 日齢より EB を投与した雄鶏には良く発達した左右の卵管がみられた. 発達した左右卵管重量の値は成熟雌鶏の左側卵管よりも大きく (柘田・小柳, 2001), これらの卵管は肉眼的に漏斗部, 膨大部, 峡部, 子宮部および陰部に区分が可能であった. 現在のところ, 出現した雄鶏の卵管が生理的機能をもつか否かについては不明であるが, Rahil and Narbaitz (1972) は, 孵卵初期にエストロジェンを投与後孵化した雄雛にエストロジェンとアンドロジェンを投与することによって出現した卵管を組織学的に観察し, これらの卵管は卵白合成能をもつことを報告している. したがって, 胚の時期にミューラー管が退行しなければ, 鶏の雌雄の両側ミューラー管は機能的卵管として分化・発達する可能性が示唆される.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 終始御指導を賜った元九州東海大学教授西山久吉博士に深謝します. なお, 本研究の一部は東海大学総合研究機構の補助を受けて行ったことを付記する.

引用文献

- Aitken RNC. The oviduct. In: *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl* (Bell DJ and Freeman BM eds.). Vol. 3. pp. 1237-1289. Academic Press. London, New York. 1971.
- Burns RK. Role of hormones in the differentiation of sex. In: *Sex and Internal Secretions* (William CY ed.). Vol. 1. pp. 76-158. Robert E. Krieger Publishing Company. Huntington, New York. 1973.
- Carre-Eusebe D, Clemente N, Rey R, Pieau C, Vigier B, Josso N and Picard J-Y. Cloning and expression of the chick anti-Müllerian hormone gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 4798-4804. 1996.
- Haffen K and Wolff E. Natural and experimental modification of ovarian development. In: *The Ovary* (Zuckerman L and Weir BJ eds.) Vol. 1. 2nd ed. pp. 393-446. Academic Press. New York, San Francisco, London. 1977.
- Hutson J, Ikawa H and Donahoe PK. The ontogeny of mullerian inhibiting substance in the gonads of the chicken. *Journal of Pediatric Surgery*, 16 : 822-827. 1981.
- Hutson JM, Ikawa H and Donahoe PK. Estrogen inhibition of mullerian inhibiting substance in the chick embryo. *Journal of Pediatric Surgery*, 17 : 953-959. 1982.
- MacLaughlin DT, Hutson JM and Donahoe PK. Specific estradiol binding in embryonic mullerian ducts: A potential modulator of regression in the male and female chick. *Endocrinology*, 113 : 141-145. 1983.
- 榎田信也・小柳 深. 孵卵中にエストロジェンを投与した種卵から孵化した雄鶏の性行動. *日本畜産学会報*, 61 : 661-662. 1990.
- 榎田信也・小柳 深. 孵卵中外因性エストロジェンによって卵精巢化した雄鶏性腺の孵化後における変化. *日本家禽学会誌*, 38 : 28-35. 2001.
- Masuda S and Koyanagi F. Effects of exogenous estrogen on the differentiation and development of the right oviduct in female chickens. *Journal of Poultry Science*, 39 : 1-7. 2002.
- 水野重樹. 鳥類のZW型性染色体による性決定, 性分化機構の研究の現状: 哺乳類の研究と比較して. *生化学*, 73 : 1411-1427. 2001.
- Rahil KS and Narbaitz R. Differentiation of male chick oviducts under hormonal stimulation. *General and Comparative Endocrinology*, 18 : 315-318. 1972.
- Tukey JW. Components in regression. *Biometrics*, 7 : 33-69. 1951.
- Wolff Et and Ginglinger A. Sur la transformation des poulets males en intersexues par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. *Archives d'anatomie, d'histologie et d'embryologie*, 20 : 219-278. 1935.
- Woods JE and Brazzill DM. Plasma 17 β -estradiol levels in the chick embryo. *General and Comparative Endocrinology*, 44 : 37-43. 1981.
- Woods JE, Simpson RM and Moore PL. Plasma testosterone levels in the chick embryo. *General and Comparative Endocrinology*, 27 : 543-547. 1975.

Effective Stage of Estrogen That Maintains Development of the Müllerian Duct in the Chicken Embryos

Fukashi Koyanagi¹⁾ and Shinya Masuda²⁾

¹⁾Faculty of Agriculture, Kyushu Tokai University

²⁾Agricultural Research Institute, Kyushu Tokai University, Choyo-mura, Aso gun, Kumamoto 869-1404, Japan

On fifth, tenth and fifteenth day of incubation, one mg of estradiol benzoate (EB) was injected into fertilized eggs to investigate its effects on the differentiation and development of the oviduct in matured chickens. The larger right and the smaller left oviducts comparing with control were found in the female chickens injected with EB on fifth and tenth day of incubation. Weight of the right oviduct of the chicken injected with EB on fifteenth day of incubation was similar as the control chicken, left oviduct found as 74 percent of the control chicken. The underdeveloped oviducts of right and left both sides appeared in fifty percent of the fifth day EB-treated males, although no oviduct appeared in the tenth and fifteenth day EB-treated males. From these results, it is conceivable that the critical stage of estrogen effect that is able to maintain the development of the right Müllerian duct is between tenth and fifteenth day of the incubation period in the female chickens. Furthermore, it is guessed that the development of Müllerian ducts of the male chicken was suspended in the early stage of the incubation period even more the development of right Müllerian duct of the female chicken, and that the Müllerian duct degraded once dose not develop by subsequent exogenous estrogen.

On the other side, the well-developed right and left oviducts were found in the EB-treated males during incubation by injection with EB after hatching once again. The infundibulum, magnum, isthmus, uterus and vagina were distinguishable in appearance in the oviducts. The results suggest that the Müllerian ducts differentiate and develop into the functional oviducts by the injection with estrogen even in the male chickens if the development of the Müllerian ducts continues during incubation.

(Japanese Poultry Science, 39 : J153-J158, 2002)

Key words : estrogen, Müllerian duct, oviduct, chicken