

## シンポジウム 1 胎児の発達と母児相関

## 羊胎仔成熟過程における視床下部—下垂体—副腎系の役割

## —母体副腎系との相関の視点から—

東京大学医学部産科婦人科学教室

海野 信也

Roles of the Fetal Hypothalamo-pituitary-adrenal Axis  
in the Late Gestation Ovine Fetus

Nobuya UNNO

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo

**Key words:** Adrenals • PVN • H-P-A axis • Sheep • Cardiovascular

## 緒言—研究の背景

羊は妊娠・胎児生理学の分野で最も研究が進んでいる種の一つである。本研究では妊娠羊慢性実験モデルを用い、胎仔視床下部—下垂体—副腎(H-P-A)系の活性化の機序の解明およびH-P-A系の胎仔臓器成熟過程との関連を詳細かつ連続的な観測が可能な循環系をモデルとして検討することを目的とした。

## 1. 羊胎仔循環系の個体発生

羊胎仔では在胎末期、動脈圧の増加と心拍数の減少が起きることが知られている<sup>1)~3)</sup>。しかし、数日間以上にわたる連続記録は行われていないので動脈圧あるいは心拍数の変化率に胎齢の進行に伴う変化の有無はわかっていない。また、胎仔動脈圧、心拍数には24時間リズムが存在することが報告されている<sup>4)~6)</sup>が、その胎齢の進行に伴う変化はわかっていない。

## 2. 羊胎仔 H-P-A 系の個体発生

羊では在胎125日(満期148日)以降の胎仔 H-P-A 系の活性化とそれに伴う血中 cortisol(F)濃度の急激な上昇が起こり、胎仔臓器の成熟と分娩の発来の双方を制御していると考えられている。視床下部室傍核(paraventricular nucleus, 以下 PVN)で産生される corticotropin releasing hormone(CRH)と arginine vasopressin(AVP)は下垂体前葉における ACTH の産生と分泌の主要な

制御因子である。PVN にはその辺縁部に存在する magnocellular neuron と中心部に存在する parvocellular neuron の 2 種の神経細胞がある<sup>7)</sup>(図 1)。羊では PVN における CRH は parvocellular neurons でのみ産生される<sup>8)</sup>のに対し、AVP

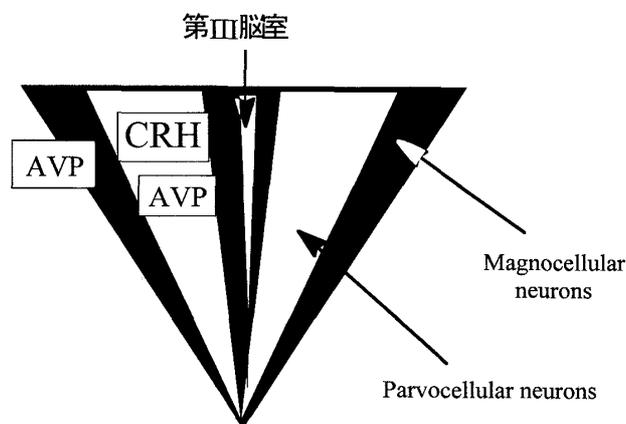
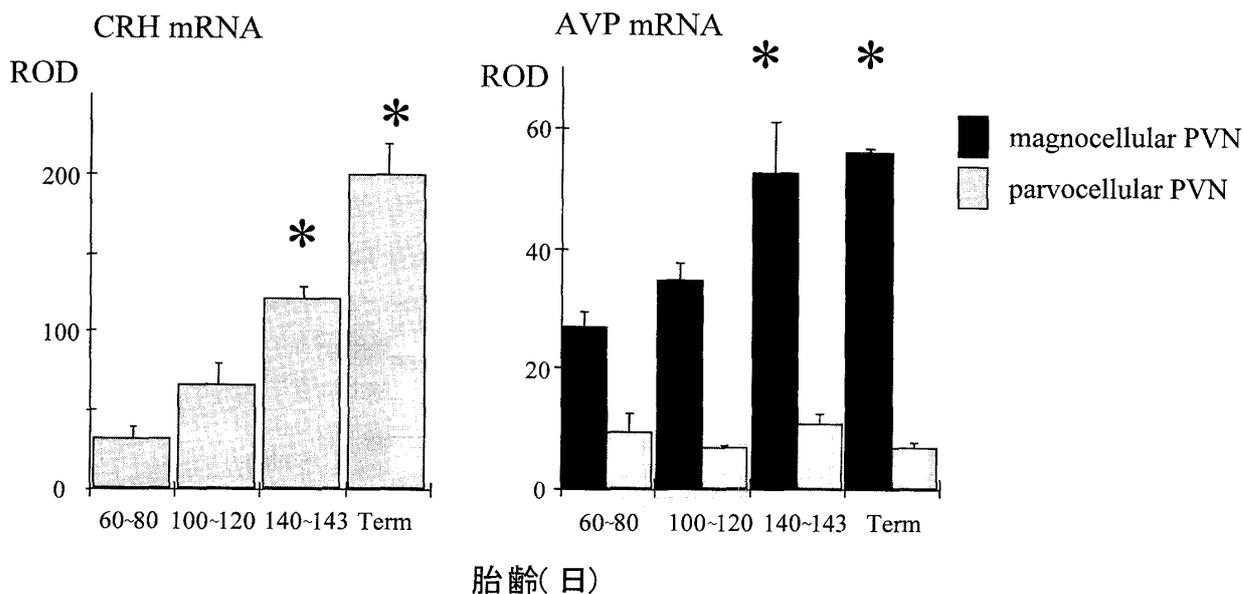


図 1 羊胎仔視床下部室傍核中心部前額断模式図 magnocellular neuron は辺縁部に局在し, parvocellular neuron は中心部に局在している。magnocellular neuron では AVP のみが産生されるのに対し, CRH では量は少ないが CRH と AVP の両者が産生される。magnocellular neuron で産生された AVP は視索上核(SON)で産生される AVP とともに下垂体後葉に分泌され, 抗利尿ホルモンとして機能する。神経分泌線維の走行から, parvocellular neuron で産生される CRH と AVP は正中隆起を経て下垂体前葉に至り ACTH の産生と分泌を制御することがわかっている。



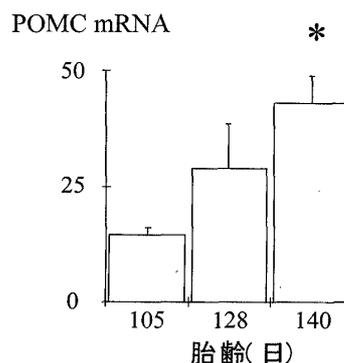
Matthews & Challis (1995)より改変

図2 羊胎仔視床下部室傍核のCRH mRNA, AVP mRNAの胎齢に伴う変化<sup>7)</sup>  
\* :  $p < 0.05$  from 60~80日

は magno-および parvocellular neurons の両者で産生される<sup>9)</sup>。下垂体 corticotrophs に作用するのは parvocellular neurons からの CRH と AVP のみである<sup>10)</sup>と考えられている。在胎末期 PVN の CRH mRNA の発現は次第に増加するが parvocellular neurons における AVP mRNA の発現は変化を示さない(図2)<sup>7)</sup>。下垂体では POMC mRNA の発現が胎齢に伴って増加する(図3)<sup>11)</sup>。このような視床下部および下垂体での活性化とともに胎仔血中 ACTH 濃度および F 濃度は著明な増加を示す(図4)<sup>12)</sup>。在胎末期に著明に増加した F が胎盤における  $17\alpha$ -hydroxylase の活性化を促し, progesterone から estrogen への変換を通して陣痛発来をもたらすと考えられている。このような羊胎仔における H-P-A 系の活性化がどのような機序によっているかはよくわかっていない。

### 3. 羊胎仔 H-P-A 系活性化の機序

羊胎仔では PVN を破壊することによって在胎末期の血中 ACTH および F の増加と陣痛の発来が抑制される<sup>13)</sup>ことが知られている。したがって PVN が在胎末期の H-P-A 系活性化に重要な役割を果たしていると考えられるが, その PVN の



Myers & Nathanielsz (1993)より改変

図3 羊胎仔下垂体前葉 POMC mRNA の胎齢に伴う変化<sup>11)</sup>

\* :  $p < 0.05$  from 105日

活性化の機序はわかっていない。また成体では存在している cortisol による PVN に対する negative feedback 制御<sup>14)</sup>が羊胎仔ではいつ機能し始めるのかも検討されていない。

胎仔 H-P-A 系活性化の制御物質として胎盤で産生され在胎末期に高濃度を示す prostaglandin (PG)E<sub>2</sub><sup>15)</sup>の関与が示唆されている<sup>16)</sup>。PG 合成の律速酵素である cyclooxygenase (COX) には 2 種の isoform の存在 (COX-1, COX-2) が知られてい

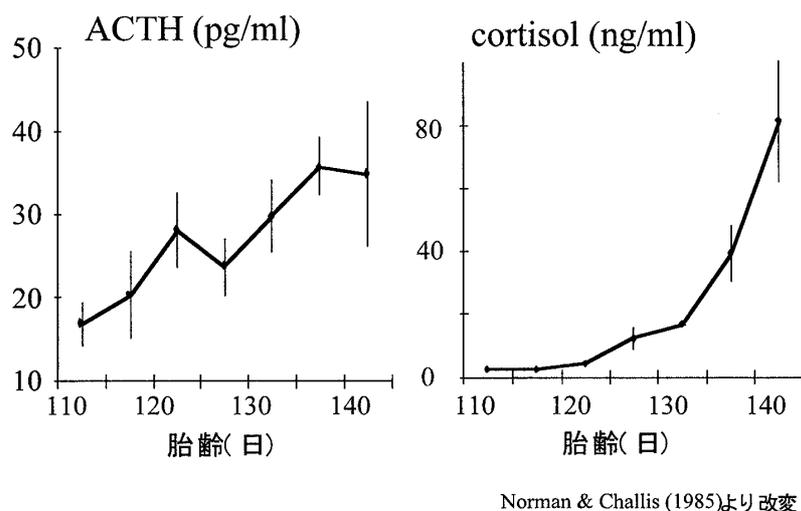


図4 羊胎仔血中 ACTH・cortisol 濃度の胎齢に伴う変化<sup>12)</sup>

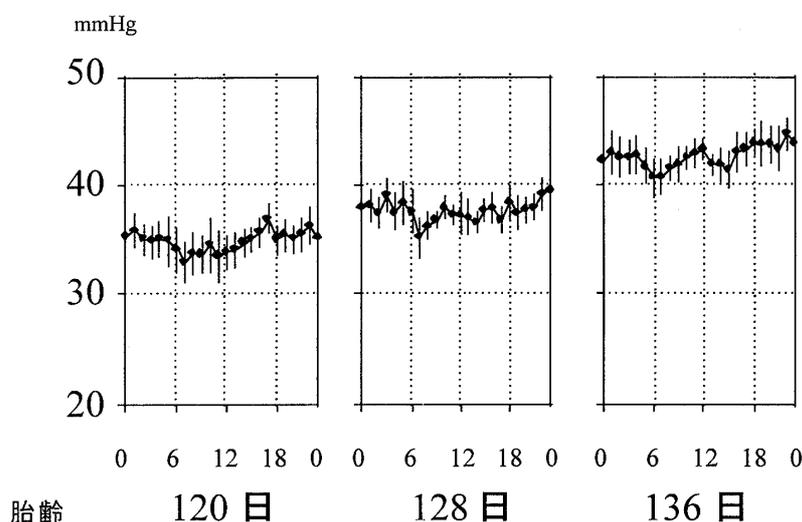


図5 羊胎仔毎時平均動脈圧の変動。胎齢120日, 128日, 136日の比較  
mean±SEM, n=7

る<sup>17)</sup>。妊娠末期の羊胎盤では COX-1には変化が認められないのに対し COX-2 mRNA は増加する<sup>18)</sup>。したがって妊娠末期の胎仔血中 PGE<sub>2</sub>が COX-2によって制御されている可能性があるが、まだ検討されていない。また COX-2と胎仔 H-P-A系活性化との関係についての検討も行われていない。

#### 4. cortisol の羊胎仔循環系に及ぼす影響

羊胎仔への F 投与は動脈圧の上昇を引き起こし、その上昇は48時間持続することがわかっている<sup>19)~21)</sup>。また胎仔副腎摘出は胎仔動脈圧・心拍数に短期的な影響を与えないと報告されている<sup>22)</sup>。

しかし、副腎摘出および F 投与の胎仔循環系の発達に対する長期的影響については検討されていない。また妊娠末期のヒトで母体由来の glucocorticoids が胎児心拍数の24時間リズムの関与している可能性が示唆されている<sup>23)</sup>が胎仔副腎摘出および血中 F 濃度の変化が胎仔循環系の24時間リズムにどのような影響を与えるかはわかっていない。

#### 5. 本研究の構成

- 1) 妊娠後半期羊胎仔の動脈圧・心拍数の変化
- 2) 羊胎仔における副腎摘出および cortisol 補充の動脈圧・心拍数に対する長期効果

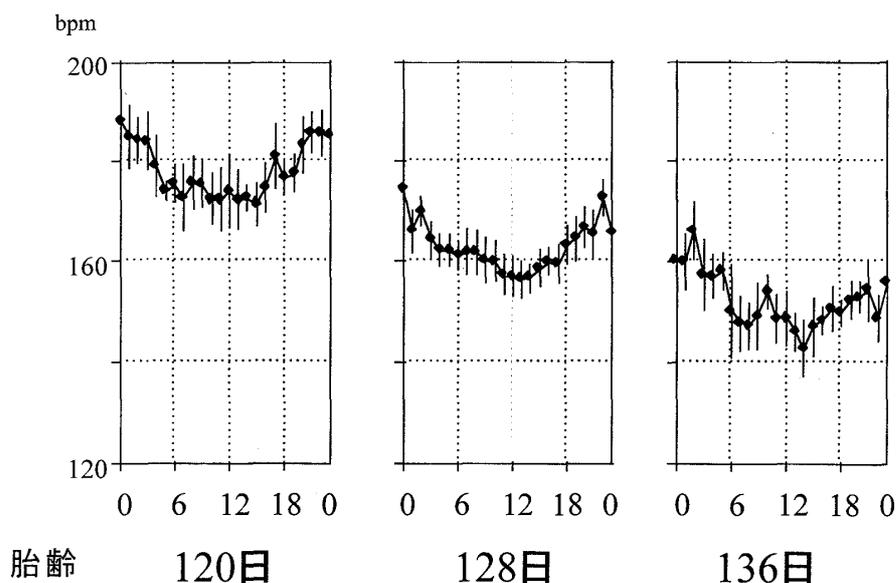


図6 羊胎仔毎時平均心拍数の変動。胎齢120日, 128日, 136日の比較  
mean±SEM, n=7

3) 胎齢110日の羊胎仔に対する副腎摘出と cortisol 補充が胎仔視床下部 PVN における CRH・AVP mRNA 発現に及ぼす影響

4) 陣痛発来時, 選択的 COX-2阻害剤 nimesulide 母体投与の羊胎仔視床下部—副腎系に及ぼす影響

#### 研究対象・方法・結果・考察

##### 実験1 妊娠後半期羊胎仔の動脈圧・心拍数の変化

###### 対象と方法

以下のすべての研究は, Cornell 大学獣医学部 Laboratory for Pregnancy and Newborn Research において妊娠期間の確定している単胎妊娠羊を用いて行われた。すべての実験は Cornell University Animal Care and Use Committee の承認の後に実施した。実験設備は American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care の承認を受けた。

妊娠羊 7 頭を手術 7 日前より明期 7:00~21:00, 暗期 21:00~7:00 の実験室で metabolic cage 内で飼育した。妊娠 113~114 日に halothane 全身麻酔下で手術を行い, 母獣および胎仔頸動脈, 羊水腔にカテーテルを留置した。子宮筋には筋電電極を設置し慢性実験モデルを作成した<sup>24)</sup>。

術後最低 5 日間の回復期間をおき, 胎齢 120 日より陣痛発来が子宮筋電パターンによって確認されるまで胎仔動脈圧, 心拍数の連続記録を行った。data は 1 秒ごとの平均値として digitalize した後 hard disk に記録した。胎齢 120 日から 138 日までの 1 時間ごとの平均動脈圧, 心拍数を計算した。

data は以下すべて平均値±標準誤差として示した。動脈圧および心拍数の胎齢の進行に伴う baseline の変化および 24 時間リズムの変化を検討するため, 観察期間を 6 日ごとの 3 期間 (Period I: 胎齢 120 日 0:00 より 125 日 23:00 まで, Period II: 胎齢 126 日 12:00 より 132 日 11:00 まで, Period III: 胎齢 133 日 0:00 より 138 日 23:00 まで) に分けた。各胎仔において baseline を観察期間の平均値として, baseline の変化率を線形回帰分析による勾配として計算した。24 時間リズムの有無の解析は cosinor 解析を用いた<sup>25)</sup>。各時期間を分散分析 (ANOVA) にて比較した。post hoc 比較には Student-Neuman-Keuls test を用いた。以下のすべての解析において  $p < 0.05$  をもって推計学的に有意とした。

###### 結果

1. 胎仔動脈圧は明らかな日内変動を示しつつ単調に増加した。動脈圧 baseline は Period I から

Period III まで有意の増加を示した。baseline 変化率は Period III において Period I より有意の増加を示した。日内変動の推移を図5に示した。cosinor 解析の結果各時期において各胎仔動脈圧に有意の24時間リズムが存在していた。変動の amplitude および peak time には3時期間で有意の差を認めなかった。

2. 胎仔心拍数は明らかな日内変動を示しつつ単調に減少した。心拍数 baseline は Period I から Period III までの有意の減少を示した。baseline 変化率は各時期間で変化を認めなかった。日内変動の推移を図6に示した。cosinor 解析の結果、各時期において各胎仔心拍数に有意の24時間リズムが存在していた。変動の amplitude および peak time には3時期間で差を認めなかった。

#### 考察

羊胎仔において胎齢の進行に伴う動脈圧、心拍数の変化を初めて19日間連続的に観測した結果、1) 胎仔動脈圧増加率は胎齢133~138日に有意に加速すること、2) 心拍数減少率には変化がないこと、3) 胎仔動脈圧、心拍数の24時間リズムは胎齢120日に既に存在し、以降19日間その振幅、位相に変化を示さないことが明らかになった。胎仔動脈圧増加の加速時期は胎仔血中 F 濃度の生理的増加時期と一致しており、胎仔動脈圧の生理的変化が F によって影響を受けている可能性が考えられた。

#### 実験2 羊胎仔における副腎摘出および cortisol 補充の動脈圧・心拍数に対する長期効果

##### 対象と方法

妊娠羊慢性実験モデル13頭を用いて実験を行った。手術は halothane 全身麻酔下で妊娠110日に施行した。母獣頸動静脈、胎仔大腿動静脈、羊水腔にカテーテルを留置した。8頭の胎仔では側腹切開後、経後腹膜的に副腎を両側で摘出した (ADX 群)。5頭の胎仔では sham 手術を施行した (CONT 群)。胎齢116日より胎仔動脈圧、心拍数の連続記録を実験1と同様に行った。ADX 群のうち4頭では胎齢117日より胎仔静脈カテーテルより F を  $4\mu\text{g}/\text{min}$  の速度で持続的に投与した

(ADX+F 群)。胎齢124日に剖検を行った。胎仔血を連日採取し、RIA 法にて血漿 F 濃度を測定した。data の解析は実験1と基本的に同様に行った。CONT 群と ADX 群の差は Student t-test にて検討した。ADX+F 群では血漿 F 濃度、動脈圧、心拍数の変化を各胎仔一日ごとの値に対して one-way repeated measures ANOVA を用いて検討した。

#### 結果

1. 胎仔血漿 F 濃度は CONT 群および ADX 群において assay の感度 ( $4.9\text{ng}/\text{ml}$ ) 未満だった。ADX+F 群では F 投与開始後有意に増加し  $15\sim 25\text{ng}/\text{ml}$  前後で推移した。

2. 胎仔動脈圧 baseline は CONT 群で単調に増加したが ADX 群では増加を示さなかった。動脈圧変化率は ADX 群で CONT 群より有意の低値を示した。

3. 胎仔心拍数 baseline は CONT 群、ADX 群も単調に減少し、変化率に2群間の差を認めなかった。

4. 胎仔動脈圧、心拍数の両者に有意の24時間リズムが存在していた。amplitude および peak time に CONT 群と ADX 群で差を認めなかった。

5. F 投与によって胎仔動脈圧の迅速な上昇が認められ、それは観察期間中持続した。胎仔心拍数は F 投与中緩徐に増加した。

6. 胎仔動脈圧、心拍数の24時間リズムは F 投与後も同様に存在し、他の2群と差を認めなかった。

#### 考察

胎仔副腎摘出は胎仔動脈圧の生理的上昇を抑制した。副腎摘出胎仔に対する F 投与は胎仔動脈圧を有意に持続的に上昇させた。実験1における胎齢133~138日の動脈圧増加率の加速を考慮すると、胎仔副腎および胎仔血中 F が羊胎仔動脈圧の胎齢に伴う生理的上昇に関与していることが強く示唆される。心拍数に関しては F 投与で緩徐な増加が観察されたものの実験1において在胎末期の生理的血中 F 濃度増加が心拍数に影響を与えていないこと、実験2において副腎摘出も影響しな

いことを考慮すると、心拍数の生理的減少にはFの作用は大きくないことが推察された。

24時間リズムについては動脈圧、心拍数の両者について、生理的F濃度増加を含めた胎齢の進行、副腎摘出、F投与いずれもが全くその振幅、位相に影響を与えず、循環系24時間リズムがF濃度の変化に影響を受けないことが示された。母体からのFが胎仔循環系24時間リズムに影響する可能性については、F濃度の大幅な変化によっても24時間リズムが影響を受けないことから、母体由来の低濃度のFおよびその変動が直接影響している可能性は低いものと推察された。24時間リズムが生体にとって外界の変化に対処するための基本的な適応現象であることを考慮すると、胎仔においてもおそらく母体からの内分泌情報、体温を含めた子宮内環境の変化として認識されるであろう日内変動に的確に適応することができることが重要であると考えられる。在胎末期の羊胎仔ではH-P-A系が陣痛発来を調節する主要な制御因子となっており、F濃度変化に抵抗性であることは生理的に合目的的であると考えられた。

### 実験3 胎齢110日の羊胎仔に対する副腎摘出とcortisol補充が胎仔視床下部室傍核におけるCRH・AVP mRNA発現に及ぼす影響

#### 対象と方法

実験2と同一の羊を用いて実験を行った。胎齢124日に剖検を行い胎仔視床下部を摘出、ただちに液体窒素にて冷却したisopentane中で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。視床下部より前額断にて厚さ $20\mu\text{m}$ の連続凍結切片を作成し、in situ hybridization (ISH)用のスライドを作成した。各スライドは2切片ずつとしスライド10枚ごとに1枚CRH mRNA用とAVP mRNA用のスライドをPVN全領域が含まれるように選んだ。ISHは既に報告した方法を用いた<sup>26)</sup>。CRH mRNAの解析には報告されている羊CRH cDNA sequence<sup>27)</sup>により443~482と483~522の塩基配列に対する antisense oligonucleotide probeを使用した。AVP mRNAの解析には牛AVP cDNA<sup>28)</sup>の1835~1876と1877~1921の塩基配列に対する antisense

oligonucleotide probeを使用した。CRH mRNA発現の定量は autoradiography film の densitometry によって relative optical density として計測した。AVP mRNAの定量は emulsion autoradiogram を用いて、PVN 中心部の $0.12\text{mm}^2$ の楕円領域 (parvocellular 領域) とその外側同一面積 (magnocellular 領域) にわけて NIH image を用いた画像分析によって %expressed area として表した。3群間の比較は ANOVA によった。

#### 結果

1. CONT群ではPVN領域にCRH mRNAの発現を認めた。ADX群ではCRH群に比べて特にPVN中心部でCRH mRNAの発現の増加が認められた。ADX+F群ではCRH mRNAはほとんど認められなかった。densitometryの結果、ADX群ではPVNにおけるCRH mRNAの発現はCONT群( $5.0\pm 1.4$ )に比べて有意の増加( $19.8\pm 4.8$ )を示し、その増加はF投与によって著明に抑制される( $0.2\pm 0.2$ )ことが示された。

2. magnocellular領域ではAVP mRNAの発現に3群間で差を認めなかった (CONT群： $69.6\pm 1.6$ , ADX群： $75.1\pm 3.2$ , ADX+F群： $63.0\pm 9.3\%$ )が parvocellular領域ではCRH mRNAと同様のADX群での発現増加、F投与による抑制が認められた (CONT群： $14.3\pm 2.2$ , ADX群： $36.5\pm 3.1$ , ADX+F群： $9.3\pm 0.1\%$ )。

#### 考察

胎齢110日から124日の羊胎仔視床下部PVNのCRH mRNA, AVP mRNA発現は胎仔副腎および血中Fによってnegative feedback制御を受けていることが初めて明らかになった。在胎末期の胎仔H-P-A系の活性化はこのようなfeedback機構の存在にもかかわらず進行することになり、強力な刺激が上位の中枢あるいはそれ以外から加わっている可能性が示唆された。

### 実験4 陣痛発来時、選択的COX-2阻害剤nimesulide母体投与の羊胎仔視床下部一下垂体-副腎系に及ぼす影響

#### 対象と方法

妊娠羊8頭を対象として妊娠 $127\pm 3$ 日に手術を

行い慢性実験モデルを作成した。母獣および胎仔頸動静脈、羊水腔にカテーテルを留置、子宮筋に筋電極を設置した。子宮筋の活動性を連続的に記録し、陣痛の発来を高頻度(12~48/h)で短い(<1min)子宮筋電 burst の持続をもって確認した<sup>29)</sup>。陣痛発来確認後4頭では母獣に選択的COX-2阻害剤である nimesulide を30mg bolus の後、30mg/h で6時間経静脈的に投与した(NIM群)。4頭では vehicle を同様に投与した(CONT群)。投与開始前および開始後1時間ごとに胎仔より採血し、PGE<sub>2</sub>, ACTH, F 濃度をRIA法にて測定した。両群間の差およびNIM投与による効果を two-way ANOVA にて解析した。

### 結果

1. 胎仔血漿 PGE<sub>2</sub>濃度は投与開始前 NIM 群で  $1.86 \pm 0.10 \text{ ng/ml}$ , CONT 群で  $1.52 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$  で両群間に差を認めなかった。CONT 群ではその後有意の変化を示さなかったのに対して、NIM 群では1時間で  $0.78 \pm 0.09 \text{ ng/ml}$  に有意に減少し、このレベルで投与中持続した。

2. 胎仔血漿 ACTH 濃度は投与開始前 NIM 群で  $128 \pm 16 \text{ pg/ml}$ , CONT 群で  $101 \pm 21 \text{ pg/ml}$  で両群間に差を認めなかった。CONT 群ではその後有意の変化を示さなかったのに対し、NIM 群では1時間で  $72 \pm 8 \text{ pg/ml}$  へと前値に比べて有意に低下し、それは投与中持続した。

3. 胎仔血漿 F 濃度は投与前 NIM 群で  $222 \pm 43 \text{ ng/ml}$ , CONT 群で  $138 \pm 18 \text{ ng/ml}$  であり、両群間に差を認めなかった。CONT 群ではその後有意の変化を認めなかったのに対し、NIM 群では1時間で  $52 \pm 12 \text{ ng/ml}$  へと有意に低下し、この低下は4時間持続した。

### 考察

COX-2の選択的阻害剤である nimesulide<sup>30)</sup>の母体投与は胎仔血漿 PGE<sub>2</sub>濃度が最も高く<sup>31)</sup>、H-P-A系の活性化が最高潮に達している陣痛発来時において血漿 PGE<sub>2</sub>濃度を抑制し、胎仔血漿 ACTH, F 濃度を低下せしめた。この結果は COX-2を介する PG 産生系が羊胎仔 H-P-A系の活性化に参与していることを強く示唆している。nimesulide の作用としては胎盤での PGE<sub>2</sub>産生

抑制が第一に考えられるが、それ以外に視床下部、下垂体、副腎レベルで局所の PG 産生を抑制している可能性も否定できない。今後胎仔 H-P-A系における COX-2の局在についてさらに検討する必要がある。

### 結 論

1. 胎仔 H-P-A 系の活性化は胎仔動脈圧の胎齡の進行に伴う生理的上昇に生理的役割を有する。
2. 胎仔循環系24時間リズムは胎齡120日には存在しており、それは H-P-A 系の活性化による胎仔血中 F 濃度の変動の影響を受けない。
3. 胎仔 H-P-A 系の F による negative feedback 機構は胎齡110~124日までに機能を開始している。
4. COX-2が胎仔 H-P-A 系の活性化に生理的役割を果たしている可能性が示唆された。
5. 羊胎仔 H-P-A 系の在胎末期の活性化の機序については COX-2および PGE<sub>2</sub>を介する系が関与している可能性がある。

本発表の一部は43rd Annual Meeting of Society for Gynecologic Investigation(1996.3., Philadelphia), 23rd Annual Meeting of Fetal and Neonatal Physiological Society(1996.8., Arica), 44th Annual Meeting of Society for Gynecologic Investigation(1997.3., San Diego)で発表した。

### 共同研究者

東京大学医学部産科婦人科学教室：篠塚憲男, 岡井 崇, 上妻志郎, 仁科秀則, 武谷雄二

Cornell 大学獣医学部生理学教室・Laboratory for Pregnancy and Newborn Research : Peter W. Nathanielsz, Wen X. Wu, Dino A. Giussani, Susan L. Jenkins, Richard A. Wentworth, Chi H. Wong, Xiu Y. Ding, Cun Li, Winston K.H. Man A Hing, Thomas J. McDonald.

### 文 献

1. Daves GS. The control of fetal heart rate and its variability in lambs. In: Kunzel W, ed. Fetal Heart Rate Monitoring. Berlin : Springer-Verlag, 1985 ; 184-190
2. Boddy K, Daves GS, Fisher R, et al. Fetal respiratory movements, electrocortical and cardiovascular responses to hypoxaemia and hypercapnia in sheep. J Physiol 1974 ; 243 : 599
3. Kitanaka T, Alonso J, Gilbert RD, Siu BL, Clemons GK, Longo LD. Fetal responses to

- long-term hypoxemia in sheep. *Am J Physiol* 1989 ; 256 : R1348—R1354
4. *Brace RA, Moore TR.* Diurnal rhythms in fetal urine flow, vascular pressures, and heart rate in sheep. *Am J Physiol* 1991 ; 261 : R1015—R1021
  5. *Dalton KJ, Dawes GS, Patrick JE.* Diurnal, respiratory, and other rhythms of fetal heart rate in lambs. *Am J Obstet Gynecol* 1977 ; 127 : 414—424
  6. *Lawler FH, Brace RA.* Fetal and maternal arterial pressures and heart rates: histograms, correlations, and rhythms. *Am J Physiol* 1982 ; 243 : R433—R444
  7. *Matthews SG, Challis JRG.* Regulation of CRH and AVP mRNA in the developing ovine hypothalamus: effects of stress and glucocorticoids. *Am J Physiol* 1995 ; 268 : E1096—E1107
  8. *Matthews SG, Heavens RP, Sirinathsinghji DJS.* Cellular localization of corticotropin releasing factor mRNA in the ovine brain. *Mol Brain Res* 1991 ; 11 : 171—176
  9. *Matthews SG, Parrott RF, Sirinathsinghji DJS.* Distribution and cellular localization of vasopressin mRNA in the ovine brain, pituitary and pineal glands. *Neuropeptides* 1993 ; 25 : 11—17
  10. *Engler D, Pham T, Fullerton KJ, Ooi G, Funder JW, Clarke JJ.* Studies of the secretion of CRF and vasopressin into the hypophysial-portal circulation of the conscious sheep. *Neuroendocrinology* 1989 ; 49 : 367—381
  11. *Myers DA, Myers TR, Grober MS, Nathanielsz PW.* Levels of corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus and proopiomelanocortin mRNA in the anterior pituitary during late gestation in fetal sheep. *Endocrinology* 1993 ; 132 : 2109—2116
  12. *Norman LJ, Lye SJ, Wlodek ME, Challis JR.* Changes in pituitary responses to synthetic ovine corticotrophin releasing factor in fetal sheep. *Can J Physiol Pharmacol* 1985 ; 63 : 1398—1403
  13. *McDonald TJ, Nathanielsz PW.* Bilateral destruction of the fetal paraventricular nuclei prolongs gestation in sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1991 ; 165 : 764—770
  14. *Albeck DS, Hastings NB, McEwen BS.* Effects of adrenalectomy and type I and type II glucocorticoid receptor activation on AVP and CRH mRNA in the rat hypothalamus. *Mol Brain Res* 1994 ; 26 : 129—134
  15. *Olson DM, Lye SJ, Challis JRG.* Prostaglandin concentrations in ovine maternal and fetal tissues at late gestation. *Pediatr Res* 1986 ; 20 : 83—86
  16. *Young IR, Deayton JM, Hollingworth SA, Thorburn GD.* Continuous intrafetal infusion of prostaglandin E<sub>2</sub> prematurely activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and induces parturition in sheep. *Endocrinology* 1996 ; 137 : 2424—2431
  17. *Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR.* TISIO, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 12866—12872
  18. *Wimsatt J, Nathanielsz PW, Sirois J.* Induction of prostaglandin endoperoxide synthase isoform-2 in ovine cotyledonary tissues during late gestation. *Endocrinology* 1993 ; 133 : 1068—1073
  19. *Wood CE, Cheung CY, Brace RA.* Fetal heart rate, arterial blood pressure, and blood volume responses to cortisol infusion. *Am J Physiol* 1987 ; 253 : R904—R909
  20. *Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM.* Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol* 1992 ; 77 : 709—717
  21. *Dodic M, Wintour EM.* Effects of prolonged (48h) infusion of cortisol on blood pressure, renal function and fetal fluids in the immature ovine foetus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994 ; 21 : 971—980
  22. *Ray ND, Turner CS, Rawashdeh NM, Rose JC.* Ovine fetal adrenal gland and cardiovascular function. *Am J Physiol* 1988 ; 254 : R706—R710
  23. *Arduini D, Rizzo G, Parlati E, Giorlandino C, Valensise H, Dell'Acqua S, Romanini C.* Modifications of ultradian and circadian rhythms of fetal heart rate after fetal-maternal adrenal gland suppression: A double blind study. *Prenatal Diagnosis* 1986 ; 6 : 409—417
  24. *Robinson SR, Wong CH, Robertson SS, Nathanielsz PW, Smotherman WP.* Behavioral responses of the chronically instrumented sheep fetus to chemosensory stimuli presented in utero. *Behavioral Neuroscience* 1995 ; 109 : 551—562
  25. *Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F.* Methods for cosinor rhythmometry. *Chronobiologia* 1979 ; 6 : 305—323

26. Wu WX, Unno S, Giussani DA, Mecnas MA, McDonald TJ, Nathanielsz PW. Corticotropin-releasing hormone and its receptor distribution in fetal membranes and placenta of the rhesus monkey in late gestation and labor. *Endocrinology* 1995; 136: 4621—4628
27. Furutani Y, Morimoto Y, Shibahara S, Noda M, Takahashi H, Hirose T, Asai M, Inayama S, Hayashida H, Miyata T, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for ovine corticotropin-releasing factor precursor. *Nature* 1983; 301: 537—540
28. Ruppert S, Scherer G, Schutz G. Recent gene conversion involving vasopressin and oxytocin precursors genes suggested by nucleotide sequence. *Nature* 1984; 308: 554—557
29. Harding R, Poore ER, Bailey A, Thorburn GD, Jansen GAM, Nathanielsz PW. Electromyographic activity of the nonpregnant and pregnant sheep uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142: 448—457
30. Taniguchi Y, Ikesue A, Yokoyama K, Noda K, Deguchi H, Nakamura T, Toda A, Shimeno H. Selective inhibition by nimesulide, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug, with prostaglandin endoperoxide synthase-2 activity in vitro. *Pharm Sci* 1995; 1: 173—175
31. Jones SA, Adamson SL, Bishai I, Lees J, Engelberts D, Cocceani F. Eicosanoids in third ventricular cerebrospinal fluid of fetal and newborn sheep. *Am J Physiol* 1993; 264: R135—R142

### Synopsis

**Exp. 1:** To characterize ontogenic changes in baseline and 24-h rhythms of fetal arterial blood pressure (BP) and heart rate (FHR) in the late gestation fetal sheep, seven pregnant ewes were chronically instrumented, and hourly BP and FHR were recorded continuously from 120 days gestation (dGA) to 138 dGA. Averaged BP and FHR for 120–125 dGA (Period 1), 126–132 dGA (Period 2), and 133–138 dGA (Period 3) were compared. Regression analysis was applied, and slopes of regression lines were compared between Period 1 and Period 3. Cosinor analysis was applied to evaluate 24-h rhythms of BP and FHR. BP increased and FHR decreased steadily with gestational age. Slopes of the BP increases during Period 3 were significantly greater than those during Period 1, while no difference was found in the slopes of FHR decreases. Significant 24-h rhythms in BP and FHR were. No significant changes in the 24-h rhythms in BP and FHR were found.

**Exp. 2:** To examine effects of fetal adrenalectomy (ADX), with or without subsequent cortisol (F) supplementation, on the gestational age related changes in BP and FHR, thirteen pregnant ewes were instrumented at 110 dGA. Fetal adrenals were removed in eight animals (ADX); sham fetal adrenalectomy was performed on five animals (CONT). BP and FHR were measured continuously from day six. F ( $4 \mu\text{g}/\text{min}^{-1}$ ) was infused i.v. to four ADX fetuses from day seven for seven days (ADX + F). F infusion increased fetal plasma F from  $<4.9 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  to around  $20 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  in ADX + F fetuses. A significant increase in BP and a decrease in FHR with gestation were observed in CONT fetuses. In ADX fetuses, BP remained unchanged, while FHR decreased. Significant increases in both BP and FHR sustained for up to six days were observed in ADX + F fetuses.

**Exp. 3:** CRH and AVP produced in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus (PVN) have been implicated in the regulation of anterior pituitary ACTH secretion. In sheep, the activation of the fetal hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPAA) occurs around 120–125 dGA. We investigated the effects of adrenalectomy and F administration on PVN CRH and AVP mRNA. Fetal hypothalami were collected at 124 dGA in the animals studied in Exp. 2, and studied by *in-situ* hybridization and quantitative autoradiography for CRH and AVP mRNA. PVN CRH mRNA expression was augmented in ADX and suppressed in ADX + F. AVP mRNA in the parvocellular PVN showed a significant increase in ADX and suppression in ADX + F fetuses while AVP mRNA in the magnocellular PVN remained unchanged.

**Exp. 4:** Effects of inhibition of PG synthesis on the fetal HPAA during parturition have not been characterized. Two isoforms of cyclooxygenase exist, COX-1, a constitutive form, and COX-2, an inducible form. We examined COX-2 regulation of fetal HPAA activation during spontaneous term labor using nimesulide (NIM), a putative selective inhibitor of COX-2. Four pregnant ewes were instrumented. After onset of labor NIM was infused to the ewe i.v.. Following NIM infusion, fetal plasma PGE<sub>2</sub>, ACTH and F showed significant decreases.

**Conclusions:** In fetal sheep at late gestation:

- 1) The ontogenic increase in BP is significantly accelerated at around 130–135 dGA, while the FHR decrease rate remains unaltered;
- 2) Twenty four-h rhythms in BP and FHR exist from 120 dGA to 138 dGA, which remains unchanged throughout the period;
- 3) The physiological increase in BP is dependent on the fetal adrenal;
- 4) F supplementation in ADX fetuses can maintain an increase in BP and FHR;
- 5) ADX augments CRH and AVP mRNA expression in the parvocellular PVN;
- 6) Increased parvocellular CRH and AVP mRNA expressions after ADX are suppressible by F;
- 7) CRH and AVP mRNA abundance in the parvocellular PVN are under glucocorticoid feedback control;
- 8) COX-2 plays physiologic roles in activation of the ovine fetal HPAA during labor.