

称号及び氏名	博士（獣医学）	木伏 雅彦
学位授与の日付	平成30年9月25日	
論文名	ウシの妊娠過程および雄子ウシ発育過程における血中精巣ホルモン濃度の動態解析とその応用に関する研究	
論文審査委員	主査	川手 憲俊
	副査	玉田 尋通
	副査	杉浦 喜久弥
	副査	渡来 仁

## 論文要旨

### 緒言

テストステロンは精巣のライディッチ細胞から分泌されるステロイドホルモンであり、精子形成や副生殖腺の発達に関与する。一方、同じライディッチ細胞から分泌されるインスリン様ペプチド3 (INSL3) は1993年にブタの精巣から分離同定されたペプチドホルモンであり、各種の哺乳動物の精巣でも確認されている。INSL3はテストステロンと共働して胎子期の精巣を陰嚢に下降させる役割を持つことが示唆されている。妊娠過程における母体血中のテストステロン濃度の動態はウシで報告されている。一方、血中INSL3の動態については海外肉用種牛でのみ報告がみられる。しかし、妊娠時の母ウシの血中テストステロンおよびINSL3濃度の変化を解析して、胎子雌雄判別への応用を検討した報告はみあたらない。また、雄の血中INSL3濃度は性成熟過程において増加することが報告されているが、雄ウシの発育過程における精巣発育と精巣ホルモンの血中濃度との関連については不明な点が多い。精巣発育には精巣ホルモンに加えて、栄養・代謝に関連するインスリン様成長因子-I (IGF-I) も重要な役割を果たす可能性が示唆されている。

本研究では精巣ホルモン測定をウシの繁殖機能判定に応用展開することを目

的として、黒毛和種牛とホルスタイン種牛の妊娠過程における血中 INSL3 およびテストステロン濃度の動態を解明するとともに胎子雌雄判別への応用について検討した。また黒毛和種雄子ウシの出生から性成熟前までの精巣容積と精巣ホルモン・代謝ホルモン濃度の関連を解析し、さらに黒毛和種雄子ウシの精巣容積と精巣ホルモン・代謝ホルモン濃度に及ぼす GnRH ワクチン剤の効果を検討した。

## 第 1 章 妊娠期における母ウシの血中テストステロンおよびインスリン様ペプチド 3 濃度による胎子の雌雄推定

畜産経営において出生子ウシの性別を早期に知ることは後継牛の確保や交配計画を行う上で重要である。ウシ胎子の雌雄判別方法としては超音波診断装置を用いた画像診断法が挙げられるが判定する期間が妊娠初期に限られる。妊娠中期以降に性判別を行う方法として妊娠牛の末梢血中の精巣ホルモン濃度を測定する方法が考えられるが、妊娠時の母体血中ホルモン濃度の変化を解析して、胎子雌雄判別への応用を検討した報告はみあたらない。本研究では、ホルスタイン種および黒毛和種において妊娠初期から後期までの母ウシの末梢血中テストステロンおよび INSL3 濃度を明らかにすることで胎子期の両ホルモン濃度の動態を解析し、雌雄胎子の受胎牛で比較して雌雄判別への応用を検討することを目的とした。

### 第 1 節 妊娠期におけるホルスタイン種母ウシの血中テストステロンおよび INSL3 濃度の動態と雌雄判別への応用

ホルスタイン種の妊娠 2~8 ヶ月（妊娠初期（2・3 ヶ月）、中期（4~6 ヶ月）、後期（7・8 ヶ月））まで毎月採血を行い、血漿テストステロンおよび INSL3 濃度について雌雄胎子の受胎牛で比較した。雌雄判別のために、雌雄胎子間で有意差がみられた妊娠月数において ROC 曲線分析を用いてホルモン濃度の基準値を設け、胎子の雌雄判別の適中精度（%）を算出した。妊娠牛の血漿テストステロン濃度の経時変化（上昇）および胎子雌雄差（雄>雌）は有意であった。各妊娠月数におけるテストステロン濃度の胎子雌雄差については、4、5、7、8 ヶ月において、雄胎子受胎牛は雌胎子受胎牛に比べて高値を示した。テストステロン濃度による胎子雌雄判別の適中精度は妊娠 5 ヶ月（77~79%）と 7 ヶ月（79~80%）で高かった。血漿 INSL3 濃度の胎子雌雄差（雄>雌）は有意であった。妊娠 6 ヶ月において雄胎子受胎牛の INSL3 濃度は雌胎子受胎牛に比べて高値を示した。INSL3 濃度による胎子雌雄判別では妊娠 6 ヶ月における適中精度が高かった（71%）。複数月のテストステロンと INSL3 濃度を組み合わせることで適中精度は 90% 近くに上昇した。

### 第 2 節 妊娠期における黒毛和種母ウシの血中テストステロンおよび INSL3 濃度の動態

黒毛和種牛を用い第 1 節と同様の処置を行った。妊娠牛の血漿テストステロン濃度の経時変化（上昇）および胎子雌雄差（雄>雌）は有意であった。妊娠 4、

5、6、8 ヶ月の雄胎子受胎牛のテストステロン濃度は雌胎子受胎牛に比べて高値を示した。テストステロン濃度による胎子雌雄判別の適中精度は妊娠 5 ヶ月 (77~82%)、6 ヶ月 (75~76%) および 8 ヶ月 (75~89%) で高かった。血漿 INSL3 濃度の胎子雌雄差 (雄>雌) は有意であった。妊娠 4~8 ヶ月の雄胎子受胎牛の INSL3 濃度は雌胎子受胎牛に比べて高値を示した。INSL3 濃度による胎子雌雄判別の適中精度は妊娠 8 ヶ月で最も高かった (67~79%)。複数月のテストステロンと INSL3 濃度を組み合わせることで適中精度は 90% 近くに上昇した。

上記の第 1 節および第 2 節より、両品種ともに妊娠 5 ヶ月の血中テストステロン濃度による雌雄判別の適中精度は約 80% であることがわかった。複数月のテストステロンと INSL3 濃度を組み合わせると、適中精度が 90% 近くに上昇することが示唆された。

## 第 2 章 黒毛和種雄子ウシの血中 INSL3、テストステロンおよび IGF-I 濃度と精巣容積との関連性解析

種雄牛の選抜において造精機能は重要な指標となる。造精機能は月齢、体重および精巣重量や陰囊周囲長と関係があり、精巣の発育に関しては代謝ホルモン、性腺刺激ホルモン、精巣ホルモンの影響が示唆されている。本研究では、黒毛和種雄子ウシの出生から性成熟前までの血漿 INSL3、テストステロンおよび IGF-I 濃度と精巣容積の関連性を解析した。

黒毛和種雄子ウシの血液を 0~7 ヶ月齢の間毎月採血した。陰囊周囲長は 1~7 ヶ月齢の間毎月測定した。7 ヶ月齢で外科的去勢術を実施した。子ウシの体重と陰囊周囲長はいずれも経時的に増加した。血中 INSL3 濃度は生後から 7 ヶ月齢まで上昇した。テストステロン濃度は 5 ヶ月齢以降にのみ明確な上昇を示した。IGF-I 濃度は生後から 2 ヶ月間は一過性の上昇がみられ、3 ヶ月齢で減少した後 4 ヶ月齢以降再び上昇した。これらのホルモン濃度と陰囊周囲長には有意な正の相関があり、INSL3 ( $r=0.647$ ) はテストステロン ( $r=0.597$ ) および IGF-I ( $r=0.400$ ) より高い相関があった。7 ヶ月齢で精巣が 60 g 以上の子ウシはそれ以下の子ウシに比べて、3~7 ヶ月齢の INSL3 濃度が高く、陰囊周囲長が長かった。

黒毛和種雄子ウシの血中 INSL3、テストステロン、IGF-I 濃度は精巣の発育と関連した。特に血中 INSL3 濃度は子ウシ精巣容積の機能的指標となると考えられた。また幼齢期の子ウシの陰囊周囲長と血中 INSL3 濃度から性成熟前の精巣の軽重を推測できる可能性が示された。

## 第 3 章 黒毛和種雄子ウシの血中精巣ホルモン濃度と精巣容積に及ぼす GnRH ワクチン剤の効果

ウシの去勢は外科的手術によることが多いが、手術を要しない去勢法として、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ワクチン剤を投与し、抗 GnRH 抗体を産生させて精巣ホルモンの分泌を抑制する免疫学的方法があり、近年国内外の雄ブタで実施されている。ウシにおいても GnRH ワクチン剤の去勢効果が海外

で報告されているが、黒毛和種牛における GnRH ワクチン剤の精巣機能の抑制効果について検討した報告はみあたらない。本研究では、黒毛和種雄子ウシにおける GnRH ワクチン剤投与が増体、精巣容積および血中精巣ホルモン・代謝ホルモン濃度に及ぼす影響を検討した。

生後 3 ヶ月の黒毛和種雄子ウシを用い、3 ヶ月から 7 ヶ月齢の間毎月、体重、陰囊周囲長の計測と採血を行った（対照群）。GnRH ワクチン投与群の雄子ウシは 3 ヶ月と 4 ヶ月齢でワクチン剤を投与した。投与群の陰囊周囲長は 5 ヶ月から 7 ヶ月齢で対照群に比較して低値を示した。投与群の血漿テストステロンおよび INSL3 濃度は 5 および 6 ヶ月齢で対照群に比べて低値を示したが、7 ヶ月齢では対照群との間に有意差はみられなかった。GnRH ワクチン投与による 7 ヶ月齢の陰囊周囲長、5 ヶ月齢のテストステロンおよび INSL3 濃度の減少率（ワクチン群値／対照群値）はそれぞれ 90.7%、3.4%および 48.7%であった。投与群の血漿 IGF-I 濃度は 6 および 7 ヶ月齢で対照群に比べて有意に低値を示した。

黒毛和種雄子ウシへの GnRH ワクチン投与は精巣容積を減少させ、テストステロンと INSL3 の分泌を一過性に抑制した。またワクチン投与による両精巣ホルモンの分泌低下後に血中 IGF-I 濃度も減少した。それらの減少率から GnRH ワクチン投与の精巣発育抑制を表す機能的指標として血中テストステロン濃度が鋭敏と考えられた。

#### 総括

1. 妊娠中期または後期のホルスタイン種および黒毛和種牛において雄胎子を受胎した母ウシの血中テストステロンおよび INSL3 濃度は雌を受胎した母牛に比べて高くなることが判明した。
2. 両品種の妊娠 5 ヶ月の血中テストステロン濃度による雌雄判別の適中精度は約 80%であり、複数月のテストステロンと INSL3 濃度を組み合わせると、適中精度が 90%近くに上昇することから、妊娠牛血中の両精巣ホルモン測定はウシ胎子の雌雄判別に有効であると考えられた。
3. 黒毛和種雄子ウシの血中 INSL3 濃度は精巣容積の機能的指標となりうること、また幼齢期の血中 INSL3 濃度から性成熟前の精巣の軽重を推測できる可能性が示された。
4. 黒毛和種雄子ウシへの GnRH ワクチン投与は精巣ホルモン分泌を一過性に抑制し、精巣容積を減少させることが判明した。また同剤による精巣発育抑制を表す機能的指標として血中テストステロン濃度が鋭敏と考えられた。

#### 審査結果の要旨

哺乳動物では精巣ライディッヒ細胞から分泌されるテストステロンとインスリン様

ペプチド3 (INSL3) は、胎子期に精巣を腹腔から陰嚢へ下降させる役割を持つとともに、出生後の発育過程では精巣や副生殖腺の発達に関与することが示唆されている。精巣発育にはそれらの精巣ホルモンに加えて、栄養・代謝に関連するインスリン様成長因子-I (IGF-I) も重要な役割を果たす可能性が示唆されている。ウシの妊娠過程や子ウシ発育過程における血中精巣ホルモン濃度の動態を調べた報告はいくつかみられるが、精巣ホルモン濃度を胎子雌雄判別や雄子ウシの精巣機能判定に応用した報告はみあたらない。また近年、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ワクチン剤による精巣機能の抑制が試みられているが、ウシにおいて、テストステロンと INSL3 の両ホルモン分泌に及ぼす GnRH ワクチン剤の影響を評価した報告はみられない。本研究では精巣ホルモン測定をウシの繁殖機能判定に応用展開することを目的として、母体血中精巣ホルモン測定による胎子雌雄判別や雄子ウシ血中ホルモン測定による精巣機能判定への応用、ならびに GnRH ワクチン剤投与が精巣ホルモン分泌に及ぼす影響を検討している。

第1章では、ホルスタイン種および黒毛和種において妊娠初期から後期までの母ウシの末梢血中テストステロンおよび INSL3 濃度を解析し、雌雄胎子の受胎牛で比較して雌雄判別への応用を検討した。その結果、妊娠中期または後期のホルスタイン種および黒毛和種牛において雄胎子を受胎した母ウシの血中テストステロンおよび INSL3 濃度は雌を受胎した母牛に比べて高くなることが判明した。両品種の妊娠5ヵ月の血中テストステロン濃度による雌雄判別の適中精度は約80%であり、複数月のテストステロンと INSL3 濃度を組み合わせると、適中精度が90%近くに上昇することから、妊娠牛における血中両精巣ホルモン測定はウシ胎子の雌雄判別に有効であることを示唆した。

第2章では、黒毛和種雄子ウシの出生から性成熟前までの血漿 INSL3、テストステロンおよび IGF-I 濃度と精巣容積の関連性を調べた。その結果、黒毛和種雄子ウシの血中 INSL3 濃度は精巣容積を反映する機能的指標となりうること、また幼齢期の血中 INSL3 濃度から性成熟前の精巣の軽重を推測できる可能性を示した。

第3章では、黒毛和種雄子ウシにおける GnRH ワクチン剤投与が増体、精巣容積および血中精巣ホルモン・代謝ホルモン濃度に及ぼす影響を検討した。その結果、黒毛和種雄子ウシへの GnRH ワクチン投与は精巣ホルモン分泌を一過性に抑制し、精巣容積を減少させた。また同剤による精巣発育抑制効果を表す機能的指標として血中テストステロン濃度が鋭敏であることを示した。

以上の研究により、妊娠中期以降のウシの母体血中精巣ホルモン測定は胎子の雌雄判別に有用であることが示唆された。さらに雄子ウシの血中 INSL3 濃度は性成熟前の精巣容積の機能的指標となり、また血中テストステロン濃度は精巣機能抑制効果の鋭敏な指標となりうることを示した。これらの研究成果は、ウシの精巣内分泌機能検査が繁殖機能の新たな判定法および人為調節法の開発に寄与することを示していることから、獣医繁殖学領域における生殖内分泌学の応用発展に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。