

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年8月27日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08058

研究課題名(和文) 精巣・代謝ホルモンと精子結合蛋白質解析による和牛の精液不良の原因解明と改善法開発

研究課題名(英文) Clarification of causes for aberrant semen of Japanese Black beef bulls by analyses of testicular and metabolic hormones and sperm binding proteins and development of its treatment

研究代表者

川手 憲俊 (Kawate, Noritoshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：80221901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：不良および正常精液を示す黒毛和種雄ウシの性成熟前後の血漿精巣ホルモン・代謝ホルモン濃度・血清生化学値・精漿精子結合蛋白質・陰嚢周囲長を比較した。その結果、性成熟前後の血漿インスリン様ペプチド3、インヒピンおよびインスリン様成長因子-1分泌低下は精液不良と関連することが示唆された。精液不良牛の陰嚢周囲長やテストステロン分泌の低下はわずかであった。新鮮精液不良には血清マグネシウムとASTの上昇が関与している可能性が、また精子奇形の増加には血清クレアチニン濃度の上昇が関与している可能性が推察された。精液不良牛の精漿の精子結合蛋白質(BSP1)とホルモン濃度は精液正常牛との顕著な差はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でえられた黒毛和種雄ウシの精液不良と血中精巣ホルモン・代謝ホルモン・血液生化学・精漿精子結合蛋白質との関連性に関する成果は、これまで不明であった肉用牛の精液不良の原因の一端を明らかにした。これらの研究成果は、雄ウシの生殖機能解明の学術的進展に貢献するとともに、種雄候補牛の選定や飼養管理技術に新たな情報を提供する。すなわち、性成熟前に血中インスリン様ペプチド3、インヒピンおよびインスリン様成長因子-1濃度を測定して、それらが低値のものは種雄候補牛から除外することで、精液不良の発生を低下させることができ、黒毛和種牛の生産性向上に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plasma testicular and metabolic hormones, serum biochemical parameters, seminal plasma sperm binding protein and scrotal circumference were compared between Japanese Black beef bulls with normal and abnormal semen surrounding puberty. As the results, reduced secretions of insulin-like peptide 3, inhibin and insulin-like growth factor-1 are associated with aberrant semen of the bulls surrounding puberty. On the other hand, decreases of scrotal circumference and testosterone secretion were minor in the bulls with abnormal semen. It is assumed that fresh semen abnormality may be related with higher serum magnesium and aspartate aminotransferase and that sperm morphological defect can be associated with increase of creatinine. There were no differences between bulls with abnormal and normal semen for sperm binding protein and hormonal concentrations.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：黒毛和種雄ウシ 黒毛和種雄ウシ 性成熟精液不良 精巣ホルモン 代謝ホルモン 血液生化学 精子結合蛋白質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、黒毛和種の種雄牛の一部に精液性状不良がみられ、大きな損失となっているが、その原因は不明であり、効果的な対策を講じることができない状態となっていた。精液性状不良牛の血中精巣ホルモン濃度の異常に関する過去の報告はごくわずかにしかみられず、黒毛和種での報告はみあたらなかった。またインスリン様成長因子-I (IGF-I)、インスリン、コルチゾールのような代謝に関連するホルモンの血中濃度を精液性状不良牛で測定した報告はなかった。雄ウシの精漿に特異的な精子結合蛋白質 (Binder of Sperm proteins; BSP 蛋白質) は精子の様々な機能に参与することが示唆されているが、精液性状不良牛の精漿中濃度を解析した報告はほとんどみられなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、黒毛和種牛の精液性状不良の原因を解明することを目的として、1) 精液不良の雄ウシの血中精巣ホルモン動態と陰嚢周囲長の変化を調べ、2) 精液不良の雄ウシの GnRH 投与に対する血中 LH とテストステロン分泌能を解析し、3) 精液不良の雄ウシの血中代謝ホルモン動態を調べ、4) 精液不良の雄ウシの血液生化学値の動態を解析し、5) 精液不良の雄ウシの精漿中精子結合蛋白質とホルモン濃度を調査して、それぞれの項目について正常精液を示す雄ウシと比較・検討した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 精液不良の雄ウシの血中精巣ホルモン動態と陰嚢周囲長の変化

不良精液および正常精液を示す黒毛和種雄ウシの性成熟前後の血漿インスリン様ペプチド 3 (INSL3)、テストステロン、エストラジオール-17 $\beta$ 、インヒビン濃度および陰嚢周囲長を比較した。血液サンプルの採取および陰嚢周囲長の計測は4ヵ月齢から24ヵ月齢まで月1回の頻度で実施した。精液採取は12ヵ月齢から18ヵ月齢まで週1回の頻度で実施した。新鮮精液は精液量、精子の運動性、濃度と奇形率を検査した。凍結融解後に精子の運動性と受精能力を評価した。それらの検査の全項目の基準を満たした精液を正常精液とし、1項目でも満たさないものを不良精液とした。不良精液は新鮮精液不良と凍結融解後不良 (低受精のみ) に分けられ、新鮮精液不良はさらに精子の高奇形率、低運動性、高奇形率 + 低運動性に分類した。4~11ヵ月齢を性成熟前、12~17ヵ月齢を性成熟期、18~24ヵ月齢を性成熟後とした。

#### 2) 精液不良の雄ウシの GnRH 投与に対する血中 LH とテストステロン分泌能

不良精液および正常精液を示す黒毛和種雄ウシの性成熟前 (10ヵ月齢) と性成熟後 (20ヵ月齢) における GnRH 投与に対する血漿黄体形成ホルモン (LH) とテストステロン分泌能を比較した。

#### 3) 精液不良の雄ウシの血中代謝ホルモン動態

不良精液および正常精液を示す黒毛和種雄ウシの性成熟前後の血漿インスリン様成長因子 (IGF) -I、インスリンおよびコルチゾール濃度を比較した。血液サンプル採取、精液採取、正常と不良精液の区分および不良精液の分類は、上記「1. 精液不良の雄ウシの血中精巣ホルモン動態と陰嚢周囲長の変化」と同じ要領で実施した。

#### 4) 精液不良の雄ウシの血液生化学値の動態

不良精液および正常精液を示す黒毛和種雄ウシの性成熟前後の血清生化学値 (総蛋白、アルブミン、トリグリセリド、総コレステロール、非エステル化脂肪酸 (NEFA)、グルコース、 $\beta$ -ヒドロキシブチル酸 (BHBA)、ケトン、酢酸、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、ガンマグルトミルトランスフェラーゼ ( $\gamma$ -GTP)、マグネシウム、カルシウム、リン、クレアチニン、血液尿素窒素 (BUN)) を比較した。血液サンプル採取は6ヵ月齢から21ヵ月齢まで3ヵ月に1回の頻度で実施した。精液採取、正常と不良精液の区分および不良精液の分類は、上記「1. 精液不良の雄ウシの血中精巣ホルモン動態と陰嚢周囲長の変化」と同じ要領で実施した。

#### 5) 精液不良の雄ウシの精漿中精子結合蛋白質とホルモン濃度ならびに精液不良改善の試み

黒毛和種牛の精液性状と精漿中精子結合蛋白質 (BSP1) 濃度との関連性解析を行った。黒毛和種雄ウシ (1~12才) から週に1日の頻度で精液を採取した。精液採取、正常と不良精液の区分は、上記「1. 精液不良の雄ウシの血中精巣ホルモン動態と陰嚢周囲長の変化」と同じ要領で実施した。遠心分離を行なって精漿を分離して BSP1 とアルブミンを測定し、精液正常牛と精液不良牛で比較した。加えて精子運動性の低下を示す精液に INSL3 を添加して、運動性の改善がえられるか否かを検討した。

### 4. 研究成果

#### 1) 精液不良の雄ウシの血中精巣ホルモン動態と陰嚢周囲長の変化

精液不良牛の陰嚢周囲長は精液正常牛に比べて20と24ヵ月齢で低値を示した ( $p < 0.05$ )。精液不良牛の血漿 INSL3 とインヒビン濃度は精液正常牛に比べて性成熟前後 (INSL3 : 6, 9, 11~

14, 17, 20, 21 ヲ月齡; inhibin:5, 8~13, 16, 17, 19, 20 ヲ月齡)で低い値を示した( $p<0.05$ )。精液不良牛の血漿テストステロン濃度は精液正常牛に比較して 22 ヲ月齡でのみ低値を示した( $p<0.05$ )。

精子が高奇形率+低運動性を示すウシの血漿 INSL3 濃度は精液正常牛に比べて性成熟前後(4, 6~22 ヲ月齡)で低値を示した。低受精を示すウシの血漿インヒピン濃度は精液正常牛に比べて性成熟前後(10~12, 16~21 ヲ月齡)で低値を示した。また低受精を示すウシの血漿エストラジオール-17 濃度は精液正常牛に比べて主に性成熟後(17~21 ヲ月齡)で低値を示した( $p<0.05$ )。

以上の成績から、性成熟前後の血中 INSL3 およびインヒピン分泌は黒毛和種牛の精液不良と関連している可能性が示唆された。特に精子の高奇形率と低運動性が合併した精液不良には INSL3 の分泌低下が関与し、精子の低受精にはインヒピン分泌低下が関与していることが示された。以上のことから、黒毛和種雄ウシの性成熟前の血中 INSL3 とインヒピン濃度は精液不良を予測するマーカーとして活用できると考えられる。

## 2) 精液不良の雄ウシの GnRH 投与に対する血中 LH とテストステロン分泌能

20 ヲ月齡の精液正常牛の血漿テストステロン濃度は 10 ヲ月齡の精液正常牛に比べて高い値を示したが( $p<0.05$ )、LH 濃度には差はみられなかった。20 ヲ月齡の精液不良牛の血漿 LH とテストステロン濃度は同月齡の精液正常牛と比べて違いはみられなかった。これらの結果から、性成熟後の精液正常牛の GnRH 投与に対するテストステロン分泌能は性成熟前に比べて増加するが、精液不良牛の LH とテストステロン分泌能には異常はみられないことが判明した。

## 3) 精液不良の雄ウシの血中代謝ホルモン動態

精液不良牛の血漿 IGF-I 濃度は精液正常牛に比べて性成熟前後(4~6, 8, 18~22, 24 ヲ月齡)で低い値を示した( $p<0.05$ )。精子が低受精を示すウシの血漿 IGF-I 濃度は精液正常牛に比べて性成熟前~性成熟後(8, 9, 11, 15-21 ヲ月齡)で低値を示した。低受精を示すウシの血漿インスリン濃度は精液正常牛に比べて性成熟前と性成熟後(11, 20 ヲ月齡)で低値を示した。新鮮精液不良を示すウシの血漿コルチゾール濃度は精液正常牛に比べて性成熟前と性成熟後(14, 24 ヲ月齡)で低値を示した( $p<0.05$ )。

以上の成績から、黒毛和種牛の精子の低受精には IGF-I 分泌の低下が関与している可能性が示された。黒毛和種牛の性成熟前の血中 IGF-I 濃度は精液不良を予測するマーカーとして活用できると考えられる。

## 4) 精液不良の雄ウシの血液生化学値の動態

新鮮精液不良を示すウシの血清マグネシウム濃度は性成熟前(6, 9 ヲ月齡)で精液正常牛と比較して低値を示した( $p<0.05$ )。新鮮精液不良を示すウシの血清 AST 濃度は精液正常牛に比べて性成熟前~性成熟期(9, 12, 15 ヲ月齡)において低値を示した( $p<0.05$ )。精子奇形率が高いウシの血清クレアチニン濃度は精液正常牛に比べて性成熟前~性成熟期(9, 12, 15 ヲ月齡)で低値を示した。

以上の成績から、黒毛和種牛の新鮮精液不良には血清マグネシウムと AST の上昇が関与している可能性が、また精子奇形の増加には血清クレアチニン濃度の上昇が関与している可能性が推察される。しかし、それらの生化学値の上昇と精液不良との直接の因果関係については不明であり、また精液不良牛の生化学値の上昇は、統計的に有意ではあっても、大幅なものではないため、今後さらなる検討を要する。

## 5) 精液不良の雄ウシの精漿中精子結合蛋白質とホルモン濃度ならびに精液不良改善の試み

不良精液牛の精漿中 BSP1 およびアルブミン濃度は正常精液牛に比べて有意な差はみられなかった。

黒毛和種牛の精液性状と精漿中ホルモン(INSL3、テストステロン、IGF-I)濃度との関連性解析を行った。黒毛和種雄ウシから週に1日の頻度で12 ヲ月齡から15 ヲ月齡まで精液を採取した。遠心分離を行なって精漿を分離して INSL3、テストステロンおよび IGF-I 濃度を測定し、精液正常牛と新鮮精液不良牛で比較した。その結果、新鮮精液不良牛の精漿 INSL3、テストステロンおよび IGF-I 濃度は正常精液牛との間に有意な差はみられなかった。

加えて精子運動性の低下を示す精液に INSL3 を添加して、運動性の改善がえられるか否かを検討した。精子運動性の低下を示す精液に INSL3 濃度を添加しても運動性の顕著な改善は観察されなかった。

以上のような一連の研究を実施した結果、以下のような結論がえられた。

- 黒毛和種雄ウシの性成熟前後の血中 INSL3 およびインヒピン分泌は精液不良と関連している可能性が示唆された。
- 特に精子の高奇形率と低運動性が合併した精液不良には INSL3 の分泌低下が関与し、精子の低受精にはインヒピン分泌低下が関与している。
- 精液不良の雄ウシの陰囊周囲長は性成熟後の一部の時期にわずかに減少することが示された。

- 黒毛和種雄ウシの性成熟後の精液正常牛の GnRH 投与に対するテストステロン分泌能は性成熟前に比べて増加するが、精液不良牛の LH とテストステロン分泌能には異常はみられないことが判明した。
- 黒毛和種雄ウシの精子の低受精には IGF-I 分泌の低下が関与している可能性が示された。
- 黒毛和種牛の新鮮精液不良には血清マグネシウムと AST の上昇が関与している可能性が、また精子奇形の増加には血清クレアチニン濃度の上昇が関与している可能性が推察される。
- それらの生化学値の上昇と精液不良との直接の因果関係については不明であり、また精液不良牛の生化学値の上昇は大幅なものではないため、今後さらなる検討を要する。
- 精液不良の黒毛和種雄ウシの精漿の精子結合蛋白質( BSP1 )と INSL3、テストステロン、IGF-I 濃度を解析したが、精液正常牛との顕著な差はみられなかった。
- 精子運動性の低い精液に INSL3 を添加しても運動性は改善しなかった。
- 以上の成果から、黒毛和種雄ウシの性成熟前の血中 INSL3、インヒピンおよび IGF-I 濃度は精液不良を予測するマーカーとして活用できると考えられる。

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

1. Plasma IGF-I, INSL3, testosterone, inhibin concentrations and scrotal circumferences surrounding puberty in Japanese Black beef bulls with normal and abnormal semen. Weerakoon WWPN, Sakase M, Kawate N, Hannan MA, Kohama N, Tamada H. *Theriogenology*. 2018;114:54-62.
2. LH and testosterone secretions in response to GnRH challenge in pubertal Japanese Black beef bulls with normal and abnormal semen. Sakase M, Weerakoon WWPN, Hannan MA, Kohama N, Tamada H, Kawate N. *J Vet Med Sci*. 2018;80:1829-1833.
3. Relationships of plasma insulin-like peptide 3, testosterone, inhibin, and insulin-like growth factor-I concentrations with scrotal circumference and testicular weight in Japanese Black beef bull calves. Sakase M, Kitagawa K, Kibushi M, Kawate N, Weerakoon WWPN, Hannan MA, Kohama N, Tamada H. *J Reprod Dev*. 2018;64:401-407.
4. Effects of gonadotropin-releasing hormone antagonist degarelix on musth and serum testosterone concentrations in Asian elephants (*Elephas Maximus*). Pathirana IN, Rajapaksa C, Kawate N, Wimalarathne A, Fonseka L, Weerakoon PN, Hannan MA, Alexander B, Pushpakumara A, Ariyaratne S, Tamada H. *J Zoo Wildl Med* 2018;49:779-783.
5. Age related and seasonal changes of plasma concentrations of insulin-like peptide 3 and testosterone from birth to early-puberty in Thoroughbred male horses. Hannan MA, Murase H, Sato F, Tsogtgerel M, Kawate N, Nambo Y. *Theriogenology*, 2019;132:212-217.

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

1. Comparison of plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like peptide 3, testosterone and inhibin concentrations around puberty in Japanese Black beef bulls between normal and abnormal semen. Weerakoon WWPN, Kawate N, Hannan MA, Sakase M, Kohama N, Tamada H. The 4th World Congress of Reproductive Biology, Okinawa, September 2017.
2. Changes of plasma concentrations of insulin-like peptide 3 and testosterone, and their association with scrotal circumference during pubertal development in male goats. Hannan MA, Kawate N, Fukami Y, Weerakoon WWPN, Büllesbach EE, Inaba T, Tamada H. The 4th World Congress of Reproductive Biology, Okinawa, September 2017.

3. Scrotal circumference and plasma concentrations of testicular and metabolic hormones from pre-puberty to post-puberty in Japanese Black beef bulls with normal, abnormal fresh and low-fertility post-thaw semen. Weerakoon WWP, Sakase M, Hannan MA, Kohama N, Tamada H, Kawate N. The 30th World Buiatrics Congress 2018, Sapporo, August 2018.
4. Relationships of plasma insulin-like peptide 3, testosterone, inhibin and insulin-like growth factor-I concentrations with scrotal circumferences and testicular weights in Japanese Black beef male calves. Kitagawa, K, Sakase M, Kibushi, M, Weerakoon WWP, Hannan MA, Kohama N, Tamada H, Kawate N. The 30th World Buiatrics Congress 2018, Sapporo, August 2018.
5. Inhibitory effects of long-term repeated treatments of sustainable GnRH antagonist, degarelix acetate, on caprine testicular functions. Kawate N, Kanuki R, Hannan MA, Weerakoon WWP, Tamada H. The 30th World Buiatrics Congress 2018, Sapporo, August 2018.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/reprod/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：玉田尋通

ローマ字氏名：Tamada Hiromichi

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：生命環境科学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：10155252

研究分担者氏名：稲葉俊夫

ローマ字氏名：Inaba Toshio

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：生命環境科学研究科

職名：客員教授

研究者番号（8桁）：00137241

研究分担者氏名：坂瀬充洋

ローマ字氏名：Sakase Mitsuhiro

所属研究機関名：兵庫県立農林水産技術総合センター

部局名：北部農業技術センター

職名：課長

研究者番号（8桁）：70463396

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：Hannan M.A.

ローマ字氏名：Hannan M.A.

研究協力者氏名：Weerakoon W.W.P.N.

ローマ字氏名：Weerakoon W.W.P.N.

研究協力者氏名：小浜菜美子

ローマ字氏名：Kohama Namiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。