

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580365

研究課題名（和文） イヌとウシの血中インスリン様ペプチド3の免疫測定法の確立と精巣機能検査への応用

研究課題名（英文） Establishment of immunoassays for insulin-like peptide 3 in canine and bovine blood and their application for examination of testicular functions

研究代表者

川手 憲俊（KAWATE NORITOSHI）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：80221901

研究成果の概要（和文）：イヌとウシのインスリン様ペプチド3（INSL3）の測定法を確立し、雄動物の性成熟と加齢に伴う INSL3 分泌能の変化を調べるとともに、潜在精巣例の病態解析や診断への応用について検討した。その結果、性成熟過程の血中 INSL3 濃度の変化はテストステロンとは異なることが判明した。潜在精巣例の精巣ライディッヒ細胞の内分泌機能が低下していると考えられる。さらに、精巣が陰嚢内に存在しない動物において、INSL3 を測定することにより、精巣停留の予見が可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We established immunoassays for canine and bovine insulin-peptide 3 (INSL3) and examined changes of the hormone secretion during sexual maturation and aging in male animals. We also analyzed the INSL3 secretion in cryptorchid cases to examine pathological condition and application to its diagnosis. As the results, the change of INSL3 concentration differed from those of testosterone during puberty. It is elucidated that endocrine function of testicular Leydig cells is reduced in cryptorchid cases. Also, it is suggested that retained testis can be predicted by measuring INSL3 in dogs without testis in scrotum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：臨床獣医学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：臨床繁殖・産科

1. 研究開始当初の背景

インスリン様ペプチド（INSL）3は、リラキシン様因子あるいはライディッヒ・インスリン様ペプチドとも呼ばれ、精巣に特異的に発現するペプチドとして、1990年代中頃に発見された新しいホルモンである（Adham IM et al, J Biol Chem, 1993; Pusch W et al,

Endocrinology, 1996)。INSL3は精巣のライディッヒ（間質）細胞から分泌され、ラットやマウスでは胎生期の精巣下降作用（Nef S et al, Nat Genet, 1999）や性成熟後の精子形成の維持作用（Kawamura K et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2004; Del Borgo MP et al, J Biol Chem, 2006）を持つことが示唆されて

いる。ヒトでは血中 INSL3 の免疫測定法が開発され、妊婦の羊水中の INSL3 濃度は、男児の場合は 12~14 週齢の時に最も高くなり、その後分娩時まで減少するが、女児の場合は検出限界以下の低値を示すことが報告されている (Anand-Ivell et al, Human Reprod, 2008)。また、出生時に潜在 (停留) 精巢を示す男児の臍帯血 INSL3 濃度は正常男児に比べて低いことが示唆されている (Bay et al, J Clin Endocrinol Metab, 2007)。性成熟過程の男性の血中 INSL3 濃度を測定した報告 (Ferlin A et al, J Clin Endocrinol Metab, 2006) によると、INSL3 濃度はテストステロン濃度と同様に性成熟過程で増加するが、INSL3 は性成熟終了後も増加し続ける (30 才頃まで増加する) ことが相違点であると述べられている。

INSL3 の分泌調節は同じライディッヒ細胞から分泌されるテストステロンとは異なることが報告されている (Sadeghian H et al, Mol Cell Endocrinol, 2005)。テストステロンは下垂体前葉から拍動的に放出される黄体形成ホルモン (LH) 等によって即時に調節され、その血中濃度は数時間内に著しく変動するため、1 時点の検査で精巢内分泌機能を検査することは困難とされている。それに対して INSL3 は LH などの精巢機能調節因子による急速な影響を受けにくいことがヒトやげっ歯類で報告されており、1 時点の血中 INSL3 濃度がその動物個体のライディッヒ細胞の数と機能を反映すると述べられている (Ivell R et al, Human Reprod Update, 2009)。

しかしイヌやウシなどの伴侶動物・産業動物の血中 INSL3 の測定方法を確立した報告は全く見当たらず、それら雄動物の性成熟過程における血中動態や分泌調節、さらに精巢疾患例の分泌能については全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、イヌとウシの INSL3 の免疫測定法を確立し、正常雄動物の性成熟と加齢に伴う INSL3 分泌能の生理的变化を調べるとともに、潜在精巢例における INSL3 分泌能を解析して、その病態解析や診断への応用について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

①ウシ INSL3 の酵素免疫測定法の確立

ウシの血漿 INSL3 濃度を測定するための酵素免疫測定 (EIA) 法を確立した。本測定系にはウシ INSL3、ビオチン標識ウシ INSL3 および抗ウシ INSL3 モノクローナル抗体を用いた。血漿中の INSL3 はトリフルオロ酢酸およびアセトニトリルを用いて抽出する方法を用いた。EIA には抗マウス IgG 抗体を固相したストリップウェルを用いて、標準品の

INSL3 もしくは血漿サンプル中の未知量の INSL3 と INSL3 抗体を反応させ、その後にビオチン標識 INSL3 を加えて非標識 INSL3 と競合させた。洗浄後にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加えて反応させ、洗浄後にテトラメチルベンチジン液を加えて発色させ、吸光度を測定した。

②雄ウシの出生から性成熟後までの血中 INSL3 の動態解明および潜在精巢例と正常例の比較

1) 出生から幼齢期

出生から幼齢期までの血中 INSL3 とテストステロン動態を調べるために、黒毛和種の正常雄子ウシを用いて、0 日齢 (0 ヶ月齢)、28 日齢 (1 ヶ月齢)、56 日齢 (2 ヶ月齢)、84 日齢 (3 ヶ月齢) の各時点で血液を採取した。

2) 性成熟過程

性成熟過程における血中 INSL3 とテストステロン動態を調べるために、黒毛和種の正常雄ウシを実験に用いて、3 ヶ月齢から 22 ヶ月齢の間で血液採取を行った。

3) 潜在精巢例

潜在精巢例の血中 INSL3 とテストステロン濃度を比較するために、潜在精巢牛から血液を採取した。

上記のウシの血漿 INSL3 濃度を①で確立した EIA 法で測定した。

③イヌ INSL3 の時間分解蛍光免疫測定法の確立

イヌの血漿 INSL3 濃度を測定するための時間分解蛍光免疫測定 (TR-FIA) 法を確立した。本測定系には、ヒト INSL3 もしくはイヌ INSL3、ユーロピウム標識ヒト INSL3 および抗ウシ INSL3 モノクローナル抗体を用いた。抽出および測定法は前述のウシの EIA 法と類似の方法を用い、蛍光強度は時間分解蛍光測定装置を用いて測定した。

④雄イヌの性成熟および加齢にともなう血中 INSL3 の動態および潜在精巢例と正常例の比較

1) 性成熟前か老齢期

性成熟前から老齢期までの血中 INSL3 とテストステロン動態を調べるために、性成熟前から老齢期まで (4 ヶ月~14 歳、n=89) の正常な雄犬から血液を採取した。それらの正常犬は、性成熟前 (4~6 ヶ月)、性成熟期 (6~12 ヶ月)、性成熟後 (1~5 歳)、壮齢期 (5~10 歳) および高齢期 (10~14 歳) の 5 つの年齢群に分類して、その動態を調べた。

2) 潜在精巢例

潜在精巢例の血中 INSL3 とテストステロン濃度を比較するために、潜在精巢犬から血液を採取した。潜在精巢例の血中ホルモン濃度は、一側性と両側性に分類して、正常犬およ

び去勢犬と比較した。

上記のイヌの血漿 INSL3 濃度を③で確立した TR-FIA 法で測定した。

4. 研究成果

①ウシの INSL3 の酵素免疫測定法の確立

ウシの血漿 INSL3 濃度を測定するための EIA 法を開発した。まず、トリフルオロ酢酸とアセトニトリルを用いて血漿からの INSL3 を抽出する方法を開発した。さらに EIA 法はビオチン標識ウシ INSL3、抗ウシ INSL3 抗体およびウシ INSL3 標準品を用いて実施した。これらの方法によりウシ血漿 INSL3 濃度を測定することが可能になった。本測定法の最小検出濃度は 0.5 ng/mL で、測定可能な範囲は 0.5~20 ng/mL であり、本 EIA 法により、出生から性成熟後までのオス牛の血漿 INSL3 濃度の動態を検出できることがわかった。

②雄ウシの出生から性成熟後後までの血中 INSL3 の動態解明および潜在精巢例と正常例の比較

前項の①で確立したウシの血漿 INSL3 の EIA 法を用いて、正常雄ウシの新生子から性成熟後までの発育過程にともなう血中動態を解析し、テストステロンのそれと比較した。その結果、雄子ウシの血中 INSL3 濃度は出生から 3 ヶ月齢まで増加するが、その増加率はテストステロンのそれよりも緩やかであることが示唆された (Fig. 1)。性成熟過程では、テストステロン濃度の上昇は性成熟期前半までにほぼ完了するのに対して、INSL3 濃度は性成熟期の後半から増加が開始し、性成熟期以後も増加することが示唆された (Fig. 2)。

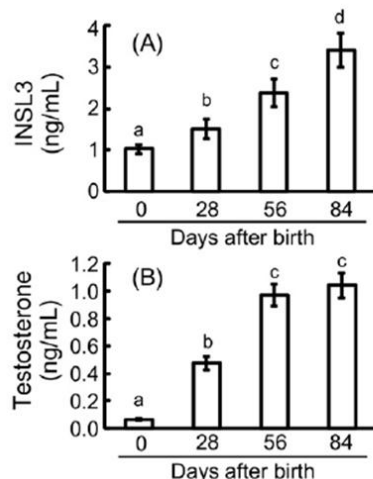


Fig.1. Changes of plasma INSL3 (A) and testosterone (B) concentrations during neonatal period in calf bulls

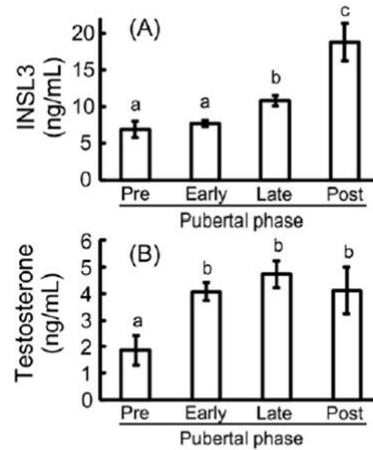


Fig. 2. Changes of plasma INSL3 (A) and testosterone (B) concentrations during puberty in bulls

潜在精巢牛の血漿 INSL3 とテストステロン濃度を測定し、同年齢の正常牛と比較した。その結果、潜在精巢牛の両ホルモン濃度は正常例より低い、去勢牛よりも高い値を示した。これらの結果から、潜在精巢牛の精巢ライディッシュ細胞の内分泌機能は低下している可能性が示唆された。さらに、精巢が陰嚢内に存在しないウシにおいて、両ホルモンを測定することにより、精巢停留の予知が可能であることが示された。

③イヌ INSL3 の時間分解蛍光免疫測定法の確立

トリフルオロ酢酸とアセトニトリルを用いる抽出法により、イヌ血漿から INSL3 を高率に回収できることを確認した。さらにイヌ INSL3 の TR-FIA 法として、INSL3 標準品、ユーロピウム標識ヒト INSL3 および抗ウシ INSL3 マウス抗体を用いることで、測定感度が 0.02 ng/mL で、測定可能範囲が 0.02~20 ng/mL の測定法を開発することができた。

④雄イヌの性成熟および加齢にともなう血中 INSL3 の動態および潜在精巢例と正常例の比較

前項の③で確立したイヌの血漿 INSL3 の TR-FIA 法を用いて、正常雄イヌの性成熟および加齢にともなう血中動態を解析し、テストステロンのそれと比較した。その結果、血漿 INSL3 濃度は性成熟前から性成熟期に増加し、性成熟後に減少し、その後顕著な変化はみられなかった (Fig. 3A)。血漿テストステロン濃度は性成熟前から性成熟期に一気に増加し、その後顕著な変化はみられなかった (Fig. 3B)。これらの結果から、雄イヌの血漿 INSL3 濃度は性成熟期に一過性にサージが起こることが解明され、イヌの性成熟期過程における INSL3 動態はラットと類似していることが

明らかになった。さらに、雄イヌの性成熟期の INSL3 とテストステロン動態の違いが示されたことから、両ホルモンの分泌調節機構は異なると考えられる。

両側性潜在精巣犬の血漿 INSL3 とテストステロン濃度は正常犬と一側性潜在精巣犬に比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。また、INSL3 とテストステロン濃度は両側性停留精巣犬で容易に検出されたが、去勢犬では検出されなかった。以上の成績から、両側性潜在精巣犬の血漿 INSL3 とテストステロン濃度はとも

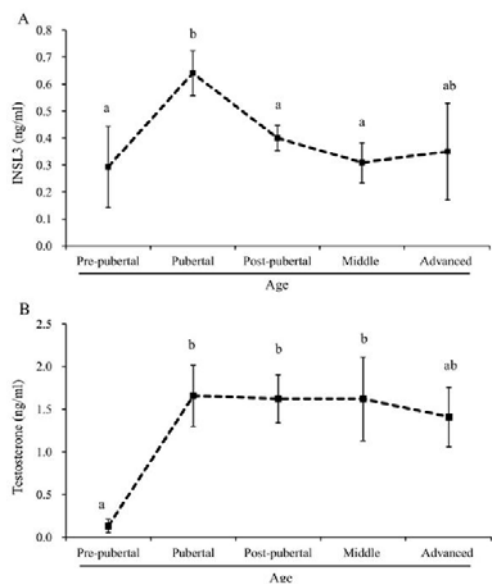


Fig. 3. Changes of plasma INSL3 (A) and testosterone (B) concentrations in various age groups in male dogs

に正常犬および一側性潜在精巣犬よりも低い値を示したことから、両側性潜在精巣犬の精巣ライディッヒ細胞の内分泌機能は低下していることが示唆された。また、両側性潜在精巣犬の両ホルモン濃度は正常犬や一側性潜在精巣犬より低いが、去勢犬よりも高い値を示したことから、精巣が陰嚢内に存在しないイヌにおいて、両ホルモンを測定することにより、精巣停留の予見が可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Pathirana IN, Kawate N, Büllesbach EE, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. Insulin-like peptide 3 stimulates testosterone secretion in mouse Leydig cells via cAMP pathway. Regul Pept. 2012;178(1-3):102-6. doi: 10.1016/j.regpep.2012.07.003. 査読有
- ② Pathirana IN, Yamasaki H, Kawate N,

Tsuji M, Büllesbach EE, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. Plasma insulin-like peptide 3 and testosterone concentrations in male dogs: changes with age and effects of cryptorchidism. Theriogenology. 2012;77(3):550-7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.08.030. 査読有

- ③ Kawate N, Ohnari A, Pathirana IN, Sakase M, Büllesbach EE, Takahashi M, Inaba T, Tamada H. Changes in plasma concentrations of insulin-like peptide 3 and testosterone from birth to pubertal age in beef bulls. Theriogenology. 2011;76(9):1632-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.07.011. 査読有
- ④ Pathirana IN, Kawate N, Tsuji M, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. In vitro effects of estradiol-17 β , monobutyl phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on the secretion of testosterone and insulin-like peptide 3 by interstitial cells of scrotal and retained testes in dogs. Theriogenology. 2011;76(7):1227-33. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.027. 査読有
- ⑤ Pathirana IN, Tanaka K, Kawate N, Tsuji M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. Homozygosity of single nucleotide polymorphisms in the 3' region of the canine estrogen receptor 1 gene is greater in Toy Poodles than in Miniature Dachshunds and Chihuahuas. Anim Sci J. 2011;82(3):390-5. doi: 10.1111/j.1740-0929.2010.00864.x. 査読有
- ⑥ Pathirana IN, Ashida Y, Kawate N, Tanaka K, Tsuji M, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. Comparison of testosterone and insulin-like peptide 3 secretions in response to human chorionic gonadotropin in cultured interstitial cells from scrotal and retained testes in dogs. Anim Reprod Sci. 2011;124(1-2):138-44. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.02.014. 査読有
- ⑦ Pathirana IN, Tanaka K, Kawate N, Tsuji M, Kida K, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 3' region of the estrogen receptor 1 gene in normal and cryptorchid Miniature Dachshunds and Chihuahuas. J Reprod Dev. 2010;56(4):405-10. 査読有

〔学会発表〕（計8件）

- ① Pathirana IN, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H, Kawate N. Effect of insulin-like peptide 3 on testosterone secretion and cAMP release in mouse Leydig cells. Conference on Sri Lanka Japan Collaborative Research 2013, Day 1 Session 6, Health and Hygiene. 2013年3月31日. ペラデニヤ大学工学部、ペラデニヤ、スリランカ.
- ② Pathirana IN, Yamasaki H, Takahashi M, Tamada H, Kawate N. Plasma insulin-like peptide 3 and testosterone concentrations in male dogs: hormonal dynamics related to age and cryptorchidism. Sri Lanka Veterinary Association Annual Meeting, 2012, Common session for selected paper. 2012年5月11日. 植物遺伝資源センター、ガンノルワ、スリランカ.
- ③ 川手憲俊 ウシにおける排卵同期化技術とその応用ならびに精巣内分泌に関する最近の知見 平成23年度全国NOSAI講習会 2011年11月15日. NOSAI兵庫家畜臨床研修所、神戸市.
- ④ 山崎寛子、Indunil Pathirana、Erika Büllesbach、辻 誠、鳩谷晋吾、稲葉俊夫、高橋正弘、玉田尋通、川手憲俊. 雄イヌの正常例および潜在精巣例の血中インスリン様ペプチド3濃度 第152回日本獣医学会学術集会 2011, 獣医繁殖分科会G-9. 2011年9月20日. 大阪府立大学、堺市.
- ⑤ 藤本泰史、Indunil Pathirana、Erika Büllesbach、辻 誠、鳩谷晋吾、稲葉俊夫、高橋正弘、玉田尋通、川手憲俊. イヌ正常精巣および停留精巣の培養細胞におけるテストステロン分泌に及ぼすインスリン様ペプチド3の効果 第152回日本獣医学会学術集会 2011, 獣医繁殖分科会G-10. 2011年9月20日. 大阪府立大学、堺市.
- ⑥ Indunil Pathirana、大成衷子、坂瀬充洋、Erika Büllesbach、高橋正弘、稲葉俊夫、玉田尋通、川手憲俊. Plasma insulin-like peptide 3 and testosterone concentrations in normal and cryptorchid beef bulls. 第152回日本獣医学会学術集会 2011, 獣医繁殖分科会G-11. 2011年9月20日. 大阪府立大学、堺市.
- ⑦ Indunil Pathirana、芦田ゆきの、田中翔、辻 誠、鳩谷晋吾、稲葉俊夫、高橋正弘、玉田尋通、川手憲俊. Comparison of secretory response of insulin-peptide 3 and testosterone to hCG in cultured

testicular cells of cryptorchid and normal dogs. 第150回日本獣医学会学術集会 2010, 獣医繁殖分科会G-16. 2010年9月16日. 帯広畜産大学、帯広市.

- ⑧ Pathirana IN, Tanaka K, Tsuji M, Hatoya S, Inaba T, Takahashi M, Tamada H, Kawate N. Effects of estrogen and phthalates on testosterone secretion in cultured testicular cells from cryptorchid and normal dogs. 第103回日本繁殖生物学会大会 2010, 臨床応用技術 OR-31. 2010年9月4日. 北里大学獣医学部、十和田市.

⑨

〔図書〕（計1件）

- ① 川手憲俊 第7章 生殖工学 2. 発情と排卵の同期化 p230-235. 獣医繁殖学 第4版 文英堂, 2012

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

名称：カテーテル挿入補助器具
発明者：川手憲俊
権利者：公立大学大阪府立大学
種類：実用新案登録
番号：第3162023号
取得年月日：平成22年7月28日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川手 憲俊 (KAWATE NORITOSHI)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：80221901

(2) 研究分担者

高橋 正弘 (TAKAHASHI MASAHIRO)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教
研究者番号：50582334

玉田 尋通 (TAMADA HIROMICHI)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：10155252

稲葉 俊夫 (INABA TOSHIO)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：00137241