

# 新規精巣ホルモン・インスリン様ペプチド3の測定法開発とその応用



大阪府立大学大学院(獣医繁殖学教室)とMedical University of South Carolina、兵庫県立北部農業技術センター、兵庫県立農業大学、大阪府立食とみどり技術センター他との共同研究

## 背景・目的

インスリン様ペプチド3 (INSL3) は1993年に発見された精巣のライディヒ細胞から分泌されるホルモン

マウス・ラットで精巣下降や精子形成を促進する役割が示唆

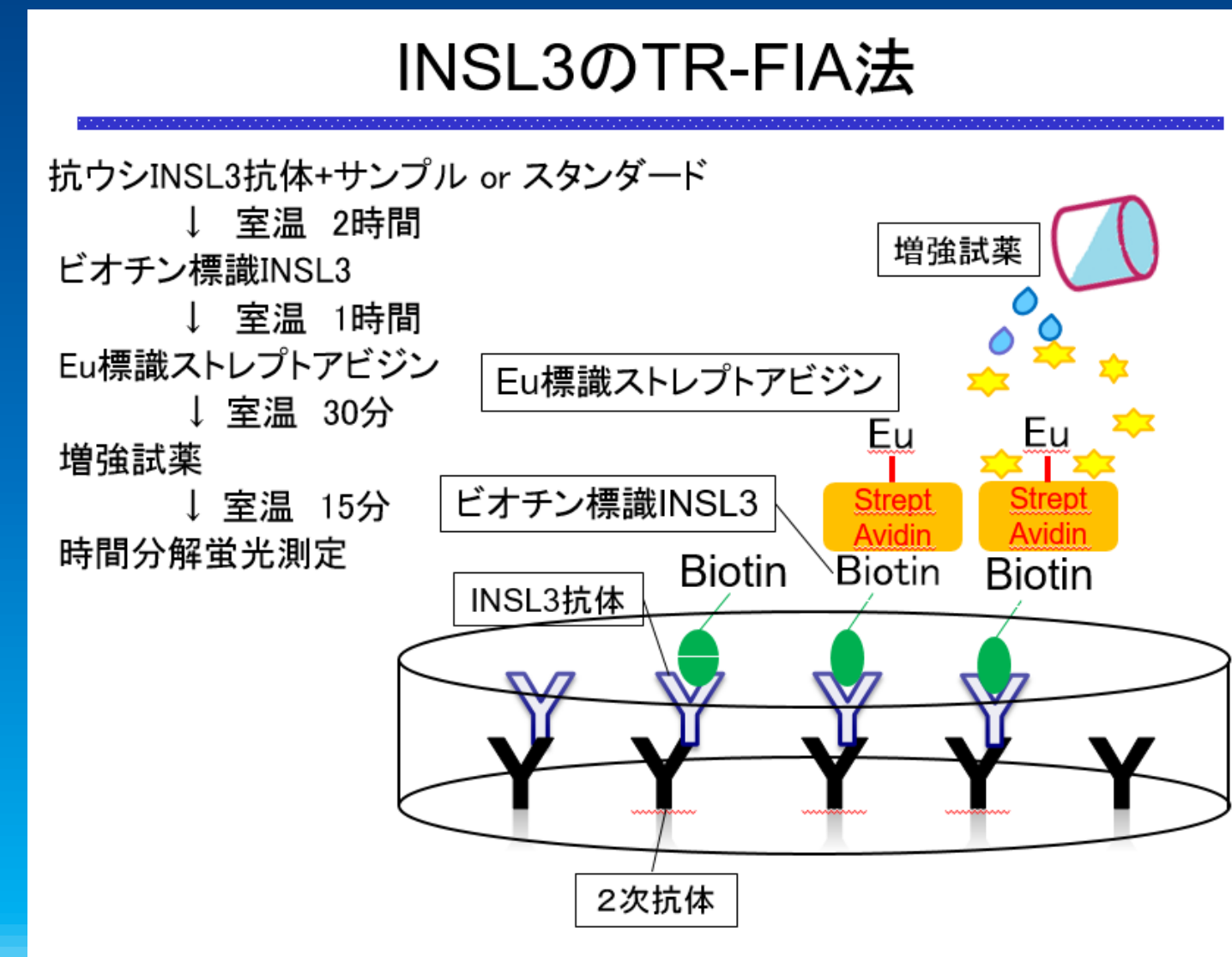
産業動物や伴侶動物ではINSL3の分泌動態や役割は不明

ウシ・ヤギ・イヌ等のINSL3測定法は未開発であった

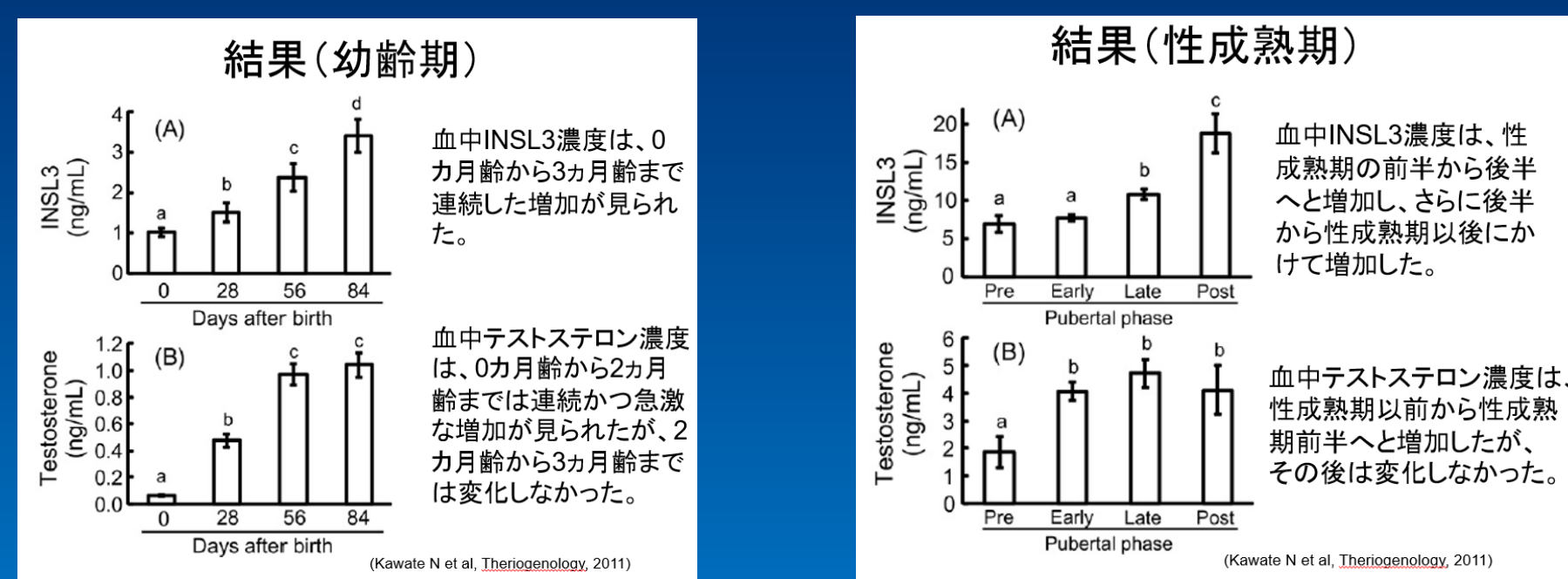
ウシ・ヤギ・イヌのINSL3測定法を開発し、それら動物の血中分泌動態と調節を解明し、精巣機能判定等への応用を検討

## INSL3測定法の開発

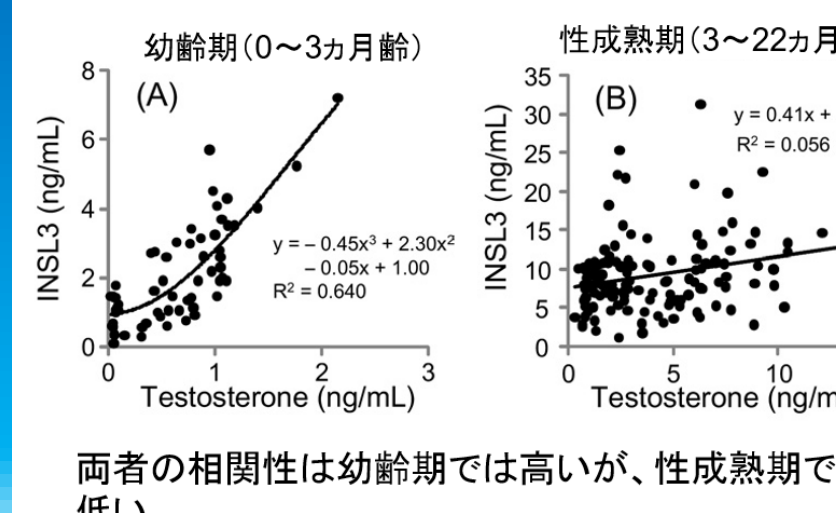
EIA法・TR-FIA法を確立



## 雄ウシの出生から性成熟後までの血中INSL3濃度の変化



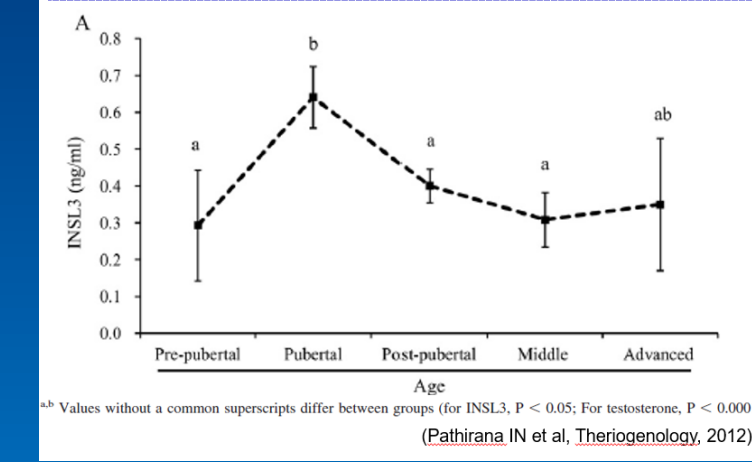
### 結果(血中INSL3とTの相関性)



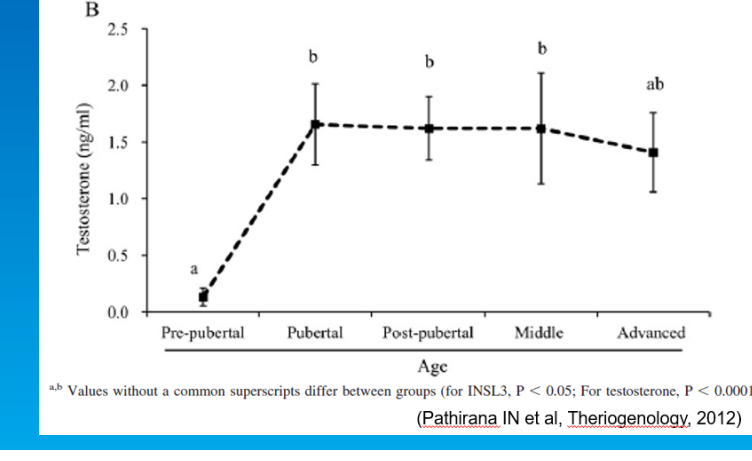
両者の相関性は幼齢期では高いが、性成熟期では低い。

## 雄イヌの性成熟過程および潜在精巣例の血中INSL3濃度

### 正常雄イヌの血漿INSL3濃度の年齢に伴う変化



### 正常雄イヌの血漿テストステロン濃度の年齢に伴う変化



### 血漿INSL3およびテストステロン濃度の正常例と潜在精巣例の比較

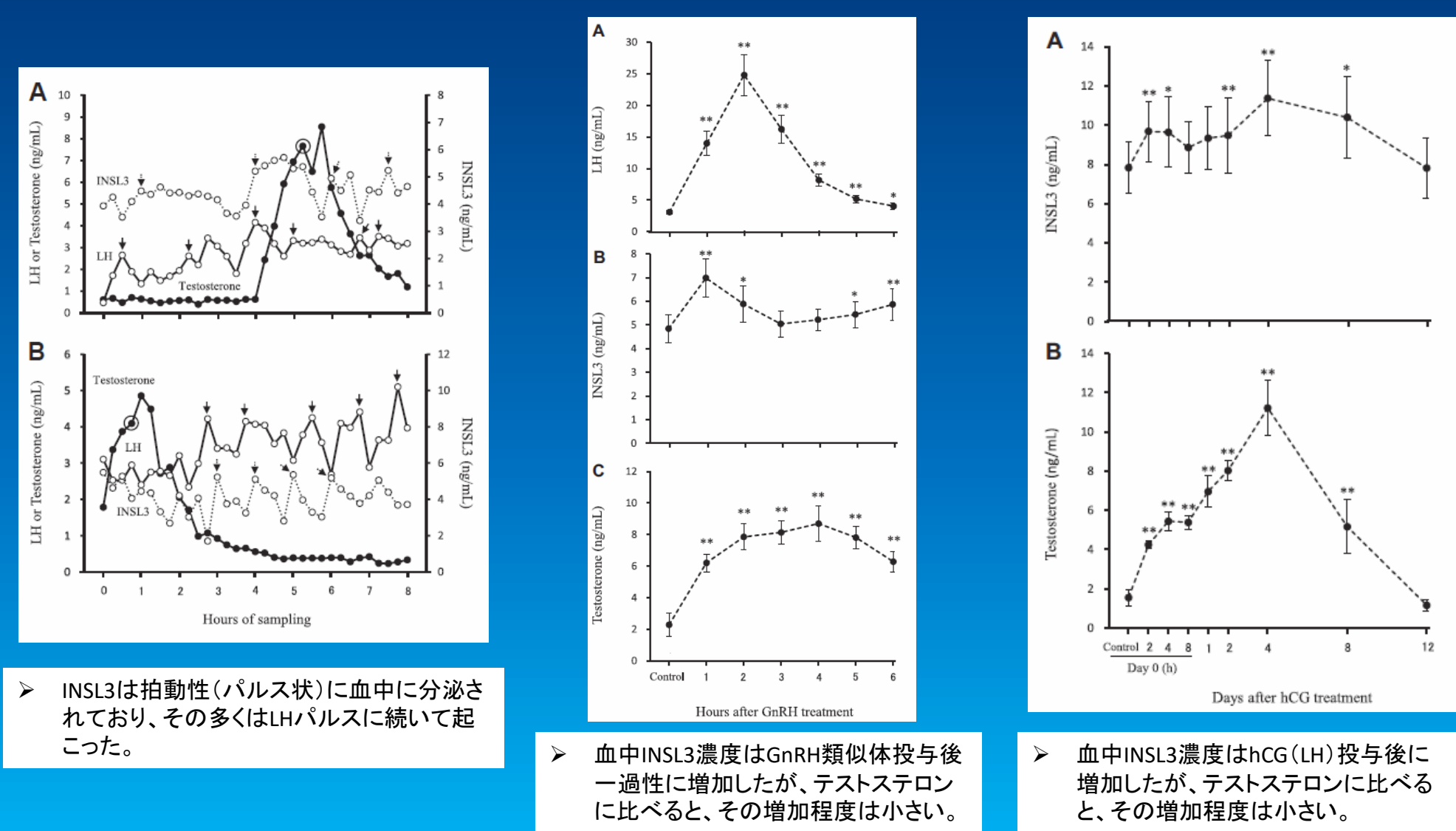
	正常例 Normal (n = 80)	一側性例 UCO (n = 31)	両側性例 BCO (n = 7)	去勢例 Castrated (n = 3)
INSL3	0.49 ± 0.04	0.55 ± 0.08	0.21 ± 0.05*	UD
Testosterone	1.64 ± 0.21	1.57 ± 0.32	0.37 ± 0.10*	UD

UD, undetectable; hormone concentration was below the minimum detection limit (INSL3<0.02 ng/ml; testosterone<0.04 ng/ml) of the assay.  
\*P<0.0001 compared with normal and unilateral cryptorchid dogs.  
(Pathirana IN et al. Theriogenology, 2012)

▶ 両側性潜在精巣の精巣のINSL3およびテストステロン分泌能は低下していることが示唆された。  
▶ 両側性潜在精巣のこれら両ホルモンを測定することで停留精巣の存在を予測することができると考えられる。

▶ 正常雄イヌの血漿INSL3濃度は性成熟期に一過性に増加することが示され、血漿テストステロン濃度の動態とは異なることが判明した。

## 雄ウシの血中INSL3濃度の短時間動態と分泌調節



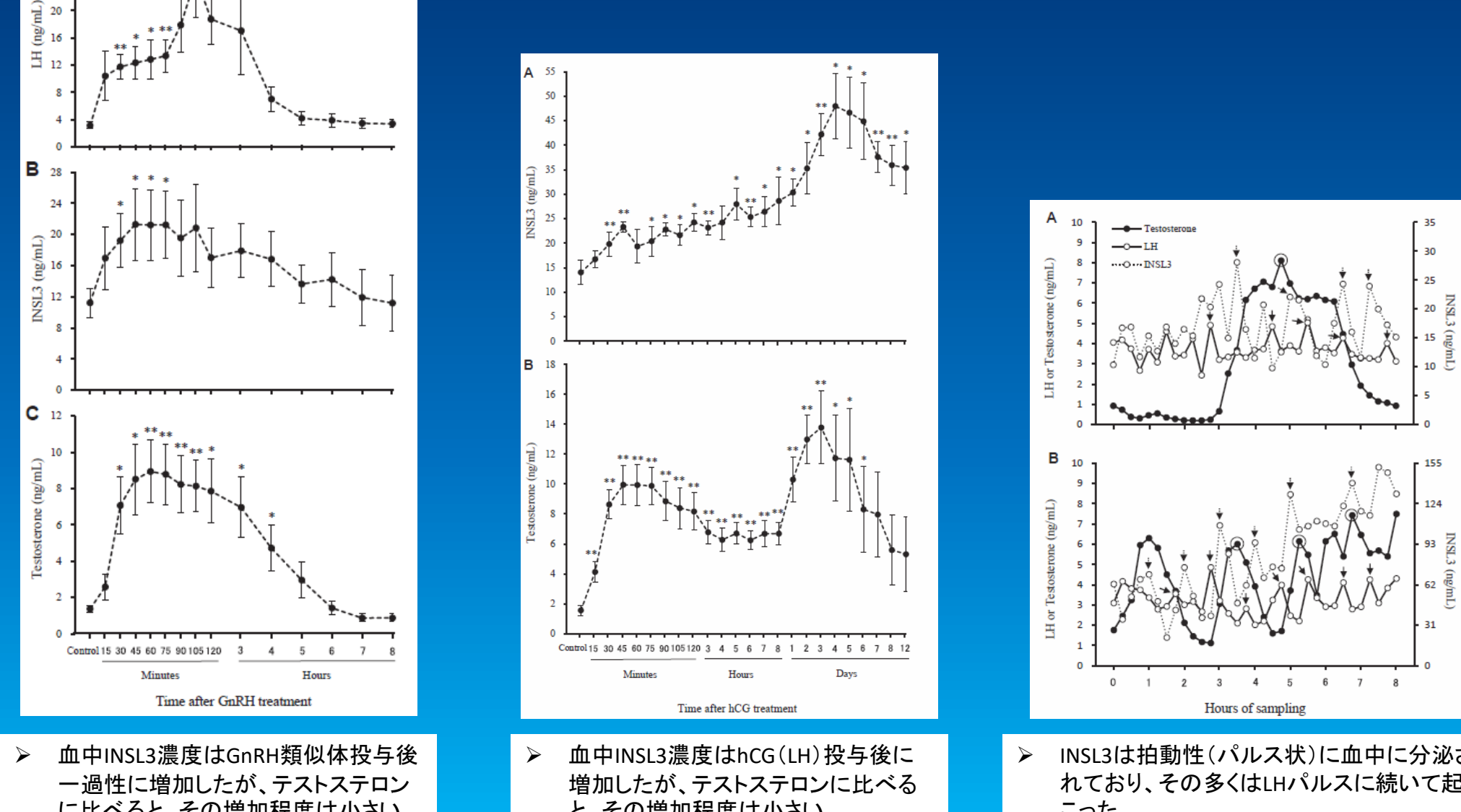
▶ INSL3は拍動性(パルス状)に血中に分泌されており、その多くはLHパルスに続いて起こった。

▶ 血中INSL3濃度はGnRH類似体投与後に一過性に増加したが、テストステロンに比べると、その増加程度は小さい。

▶ 血中INSL3濃度はhCG(LH)投与後に増加したが、テストステロンに比べると、その増加程度は小さい。

(Hannan MA et al. Theriogenology, 2015)

## 雄ヤギの血中INSL3濃度の短時間動態と分泌調節



▶ 血中INSL3濃度はGnRH類似体投与後に一過性に増加したが、テストステロンに比べると、その増加程度は小さい。

▶ 血中INSL3濃度はhCG(LH)投与後に増加したが、テストステロンに比べると、その増加程度は小さい。

▶ INSL3は拍動性(パルス状)に血中に分泌されており、その多くはLHパルスに続いて起こった。

(Hannan MA et al. Theriogenology, 2016)

## 妊娠母牛の血中精巣ホルモン測定による胎子の雌雄判別への応用

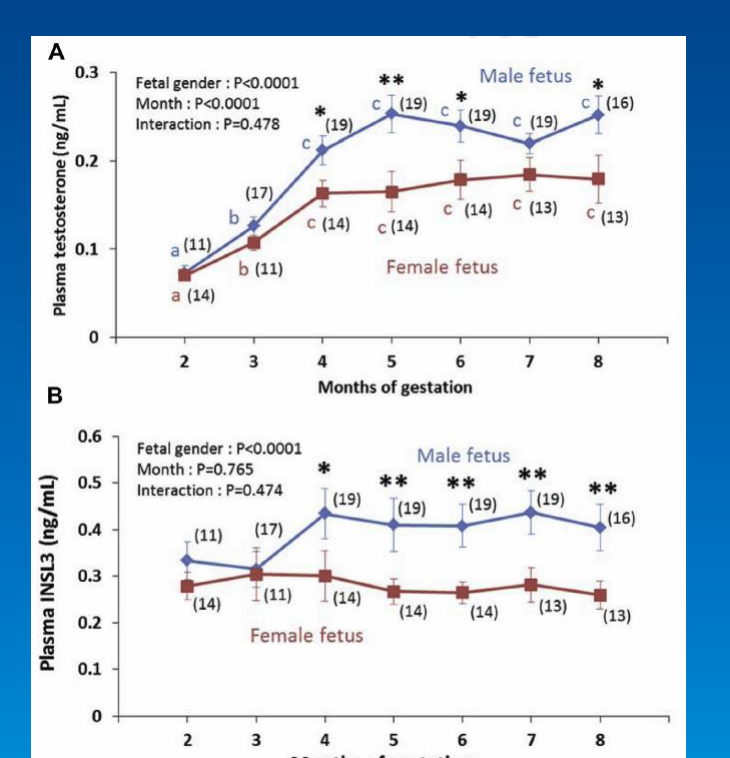


Table 3. Predictive values, detection rates and accuracy of fetal gender predicted based on maternal plasma testosterone and INSL3 concentrations in Japanese Black beef cows at mid- and late gestation.

Cut-off value (ng/mL)	Testosterone				INSL3			
	5 mo	6 mo	8 mo	4 mo	8 mo			
0.172	0.188	0.176	0.241	0.264				
Predictive value <sup>1</sup>								
Male fetus <sup>2</sup>	77.3%	76.2%	75.0%	76.5%	78.6%			
Female fetus <sup>2</sup>	81.8%	75.0%	88.9%	62.5%	66.7%			
Detection rate <sup>3</sup>								
Male fetus <sup>2</sup>	89.5%	84.2%	90.8%	68.4%	68.8%			
Female fetus <sup>2</sup>	78.8%	75.0%	79.2%	71.0%	72.9%			
Accuracy <sup>4</sup>								
	(26/33)	(25/33)	(23/29)	(23/33)	(21/29)			

雄胎子を受胎した妊娠母牛(黒毛和種)の妊娠4~6ヵ月と8ヵ月の血中テストステロンとINSL3濃度は雌胎子の母牛よりも高かった。

妊娠中期~後期の母牛(黒毛和種)の血中テストステロン濃度(1時点のデータ)による胎子の雌雄判別の的中率は約8割であり、INSL3の的中率は約7割であった。

複数回のテストステロンとINSL3濃度のデータを組合せて雌雄判別を行うと、的中率は9割近くまで上昇した。

(Kibushi M et al. Theriogenology, 2016)

## 発表論文

1. Kawate N, Fukami Y, Pathirana IN, Bullock EE, Inaba T, Tamada H. Changes of plasma concentrations of insulin-like peptide 3 and testosterone, and their association with scrotal circumference during pubertal development in male goats. Theriogenology. 2017;82:31-46.

2. Kawate N, Kawate Y, Hannan MA, Wierakop W, Sakase M, Fukushima M, Suzuki T, Inaba T, Tamada H. Fetal gender prediction based on maternal plasma testosterone and insulin-like peptide 3 concentrations at mid- and late gestation in cattle. Theriogenology. 2016;88(7):1764-1773.

3. Kawate N, Fukami Y, Pathirana IN, Bullock EE, Inaba T, Tamada H. Active regulation of plasma insulin-like peptide 3 concentrations by luteinizing hormone in male goats. Theriogenology. 2016;88(5):749-56.

4. Kawate N, Fukami Y, Kawate Y, Sakase M, Fukushima M, Pathirana IN, Bullock EE, Inaba T, Tamada H. Plasma insulin-like peptide 3 concentrations are actively regulated by luteinizing hormone in pubertal Japanese Black beef bulls. Theriogenology. 2015;84(9):1630-5.

5. Kawate N, Kato Y, Pathirana IN, Bullock EE, Hatori S, Inaba T, Takahashi M, Tamada H. Expression analyses of insulin-like peptide 3, EXPT3, LH receptor, and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in testes of normal and cryptorchid dogs. Theriogenology. 2015;84(7):1176-84.

6. Kawate N, Bullock EE, Takahashi M, Hatori 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.

7. Kawate N, Tamada H, Kawate Y, Inaba T, Takahashi M, Hatori 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.

8. Kawate N, Ohtani K, Sakase M, Bullock 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.

9. Kawate N, Tsuji M, Takahashi M, Hatori S, Inaba T, Tamada H. In vitro effects of estradiol 17β, nonpulsed phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate on the secretion of testosterone and insulin-like peptide 3 by interstitial cells of acrotal and retained testes in dogs. Theriogenology. 2011;76(7):1227-33.

10. Kawate N, Sakase M, Kawate Y, Tamada H, Tsuji M, Takahashi M, Hatori S, Inaba T, Tamada H. Comparison of gonadotropin in cultured interstitial cells from scrotal and retained testes in dogs. Anim Reprod Sci. 2011;124(1-2):138-44.