

氏名(本籍)	金 万 洙 (中華人民共和国)
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第128号
学位授与年月日	平成15年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	Studies on the Regulatory Mechanism of Testicular Function in the Golden Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) (ゴールデンハムスターの精巣機能調節機構に関する研究)
審査委員	主査 東京農工大学 教授 田谷 一 善 副査 帯広畜産大学 教授 山田 純 三 副査 岩手大学 教授 三宅 陽 一 副査 東京農工大学 教授 加茂前 秀 夫 副査 岐阜大学 教授 坪田 敏 男

論文の内容の要旨

哺乳類の精巣機能は、視床下部・下垂体・精巣軸のフィードバック機構による性腺刺激ホルモン「黄体形成ホルモン (LH) と卵胞刺激ホルモン (FSH)」分泌量の調節と精巣局所でのオートクリンおよびパラクリン機構によって調節されている。しかし、その詳細な調節機構に関しては、動物種によっても差があり未解明の部分が多い。本研究は、哺乳類における精巣機能調節機構を解明する一環として、照明時間の調節により実験室で容易に精巣機能の人為的調節が可能なゴールデンハムスターをモデル動物として、3つの精巣ホルモン (インヒビン、テストステロン、エストラジオール) による性腺刺激ホルモンの分泌調節機構ならびに精巣局所因子として神経成長因子 (NGF) の生理的役割を解明したものである。

第一章では、緒論として、精巣機能の局所調節におけるインヒビン、アクチビン、エストロジェンおよび NGF について記述し、本研究の目的を述べた。

第二章では、全体に共通する実験材料と方法について記述した。

第三章では、性腺刺激ホルモン分泌調節機構に関する知見をまとめた。

視床下部・下垂体・精巣軸の調節機構を明らかにする目的で、(1) 片側および両側精巣摘出実験、(2) インヒビンおよびテストステロン投与実験、ならびに(3) 内因性インヒビンおよびテストステロン作用抑制実験を行った。その結果、成熟雄ゴールデンハムスターでは、LH は、主にテストステロンにより、FSH はインヒビンにより抑制的に調節されている事実を明らかにした。また、インヒビンとテストステロンは、ともに精巣が分泌器官であるが、片側精巣を摘出した場合に、テストステロンは、片側の残存精巣から代償性分泌が認められるが、インヒビンには、代償性分泌が認められない事実を明らかにした。

第四章では、精巣から分泌されるインヒビンの種類及び分泌細胞に関する知見をまとめた。

精巣から分泌されるインヒビンの種類を明らかにする目的で、血漿中及び精巣抽出液中各種インヒビンを測定した。また、免疫組織化学法を用いてインヒビンサブユニットの局在を調べた。その結果、成熟雄ゴールデンハムスターの血漿および精巣抽出液にインヒビン pro- α C およびインヒビン B が検出されたが、インヒビン A は、検出できなかった。免疫組織化学法により、ライディッヒ細胞にインヒビン α 鎖と β B鎖が、セルトリ細胞にはインヒビン α 鎖のみが検出され、インヒビン β A鎖は、検出されなかった。以上の結果から、成熟雄ゴールデンハムスターでは、ライディッヒ細胞がインヒビンBの主な分泌細胞である事実が判明した。

第五章では、季節繁殖における精巣機能調節機構に関する知見をまとめた。

短日照明条件から長日照明条件へ移行する精巣機能賦活モデルを用いて視床下部・下垂体・精巣軸の調節機構と精巣での精子形成過程の経日的変化を明らかにした。すなわち、精巣機能の賦活過程では、初めに FSH 分泌量が増加してセルトリ細胞を刺激し、次いで LH 分泌量の増加によりライディッヒ細胞が刺激され、それによってインヒビンやテストステロン分泌が促進される結果として、精子形成が促進される事実を明らかにした。また、Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)法の結果から、精巣の賦活過程においては、精細胞は、分裂増加するが、セルトリ細胞とライディッヒ細胞は、細胞質の肥大が起こるが、細胞数の増加は起こらない事実が判明した。

第六章では、精巣機能の局所調節機構におけるエストロゲンの役割に関する知見をまとめた。

精巣におけるエストロゲンの局所作用を解明する目的で、内因性エストラ

ジオールの免疫学的中和実験とエストラジオール投与実験を行い、血漿中各種ホルモン濃度の変化と精子運動性の変化を調べた。その結果、成熟雄ゴールデンハムスターでは、エストラジオールは、下垂体のLHとFSH分泌に促進的に作用し、その結果として精子の運動性にも促進的な役割を有するものと推察された。

第七章では、精巣、副生殖腺および精子におけるNGFとその受容体の発現に関する知見をまとめた。

本研究では、精巣機能の局所調節におけるNGFの生理的役割を解明する一環として、精巣、精巣上体および輸出管でのNGFとその受容体(TrkA、p75LNGFR)の局在を免疫組織化学法、ウエスタンブロット法を用いて調べた。NGFは、ライディヒ細胞とパキテン期精母細胞および精子にその局在が認められたが、セルトリ細胞では局在が認められなかった。NGFに親和性の高い受容体TrkAは、セルトリ細胞のみに局在性を示した。セルトリ細胞とライディヒ細胞、パキテン期精母細胞および初期の精母細胞には、p75LNGFRの局在が確認された。一方、精巣上体の頭部、体部、尾部および輸出管の上皮細胞に、NGF、TrkAおよびp75LNGFRの特異的な局在が認められた。さらに、ウエスタンブロット法の結果から、精巣、精巣上体の頭部、体部、尾部および輸出管、精管、精嚢腺からNGFに対する特異的な53kDa、TrkAに対する140kDa、p75LNGFRに対する75kDaのバンドがそれぞれ観察された。次に、NGFが精子に及ぼす役割を明らかにする目的で、精子膜表面でのNGFとその受容体の発現をウエスタンブロット法、蛍光免疫染色法およびFlow cytometry法を用いて調べた。その結果、精子細胞膜表面から、NGF、TrkAおよびp75LNGFRの発現がそれぞれ確認された。また、高い塩濃度の条件でも、NGFとその受容体は精子細胞膜表面から離れないことから、これらの物質は、精子細胞膜構成成分であることが判明した。以上の結果から、NGFとその受容体は、1) 精巣で精子形成過程のパラクリンおよびオートクリン調節因子として作用する、2) 輸出管での精液の再吸収に関与する、および3) 精子運動性にオートクリン的に作用する可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

精巣機能は、視床下部・下垂体・精巣軸によるフィードバック機構と精巣局所でのオートクリンおよびパラクリン機構によって調節されている。しかし、その詳細な調節機構に関しては、動物種によっても差があり未解明の部分が多い。本研究では、哺乳類における精巣機能調節機構を解明する一環として、照明時間の調節により実験室で容易に精巣機能の人為的調節が可能なゴールデンハムスターを用いて以

下の研究を行った。

1. 性腺刺激ホルモン分泌調節機構

視床下部・下垂体・精巣軸の調節機構を明らかにする目的で、(1)片側および両側精巣摘出実験、(2)インヒビンおよびテストステロン投与実験、ならびに(3)内因性インヒビンおよびテストステロン作用抑制実験を行った。その結果、成熟雄ゴールデンハムスターでは、黄体形成ホルモン(LH)は、主にテストステロンにより、卵胞刺激ホルモン(FSH)はインヒビンにより抑制的に調節されている事実を明らかにした。

2. 精巣から分泌されるインヒビンの種類及び分泌細胞

精巣から分泌されるインヒビンの種類を明らかにする目的で、酵素免疫測定法(ELISA)を用いて、血漿中及び精巣抽出液中各種インヒビンを測定した。また、免疫組織化学法を用いてインヒビンサブユニットの局在を調べた。成熟雄ゴールデンハムスターの血漿および精巣抽出液にインヒビン pro- α C およびインヒビン B が検出されたが、インヒビン A は、いずれにおいても検出できなかった。免疫組織化学法により、ライディッヒ細胞にインヒビン α 鎖と β B鎖が、セルトリ細胞にはインヒビン α 鎖のみが検出された。以上の結果から、ライディッヒ細胞がインヒビンBの主な分泌源である事実が判明した。

3. 季節繁殖における精巣機能調節機構

短日照明条件から長日照明条件へ移行する精巣機能賦活モデルを用いて視床下部・下垂体・精巣軸の調節機構について研究した。その結果、精巣機能の賦活過程では、初めにFSH分泌量が増加してセルトリ細胞機能を刺激し、次いでLH分泌量の増加によりライディッヒ細胞機能が刺激され、それによってインヒビンやテストステロン分泌が促進される結果として、精子形成が促進される事実を明らかにした。また、Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)法の結果から、精巣の賦活過程においては、精子細胞は、分裂増加するが、セルトリ細胞とライディッヒ細胞は、細胞質の肥大が起こり、細胞数の増加は起こらない事実が判明した。

4. 精巣機能の局所調節機構におけるエストロゲンの役割

精巣におけるエストロゲンの局所作用を解明する目的で、内因性エストラジオールの免疫学的中和実験とエストラジオール投与実験を行い、血漿中各種ホルモン濃度の変化と精子運動性を調べた。その結果、成熟雄ゴールデンハムスターでは、エストラジオールは、下垂体のLHとFSH分泌に促進的に作用し、その結果として精子の運動性にも促進的な役割を有するものと推察された。

5. 精巣、副生殖腺および精子における神経成長因子とその受容体の発現

本研究では、精巣機能の局所調節における神経成長因子(NGF)の生理的役割を解

明する一環として、精巣、精巣上体および輸出管での NGF とその受容体 (TrkA、p75LNGFR) の局在を免疫組織化学法、ウエスタンブロット法を用いて調べた。NGF は、ライディヒ細胞とパキテン期精母細胞および精子にその局在が認められたが、セルトリ細胞では局在が認められなかった。NGF に親和性の高い受容体 TrkA は、セルトリ細胞のみに局在性を示した。セルトリ細胞とライディヒ細胞、パキテン期精母細胞および初期の精母細胞には、p75LNGFR の局在が確認された。一方、精巣上体の頭部、体部、尾部および輸出管の上皮細胞に、NGF、TrkA および p75LNGFR の特異的な局在が認められた。さらに、ウエスタンブロット法の結果から、精巣、精巣上体の頭部、体部、尾部および輸出管、精管、精嚢腺から NGF に対する特異的な 53kDa、TrkA に対する 140kDa、p75 LNGFR に対する 75kDa のバンドがそれぞれ観察された。次に、NGF が精子に及ぼす役割を明らかにする目的で、精子膜表面での NGF とその受容体の発現をウエスタンブロット法、蛍光免疫染色法および Flow cytometry 法を用いて調べた。その結果、精子細胞膜表面から、NGF、TrkA および p75LNGFR の発現がそれぞれ確認された。また、高い塩濃度の条件でも、NGF とその受容体は精子細胞膜表面から離れないことから、これらの物質は、精子細胞膜構成成分であることが判明した。以上の結果から、NGF とその受容体は、1) 精巣で精子形成過程のパラクリンおよびオートクリン調節因子として作用する、2) 輸出管での精液の再吸収に関与する、および 3) 精子運動性にオートクリン的に作用する可能性が示唆された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分に価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 題 目 Testicular secretion of inhibin in the male golden hamster (Mesocricetus auratus).

著 者 名 JIN, WanZhu WADA, Sachiko ARAI, Y Koji KISHI, Hisashi HERATH, Chandana B WATANABE, Gen SUZUKI, K Akira GROOME, Nigel P and TAYA, Kazuyoshi

学術雑誌名 Journal of Andrology

巻・号・頁・発行年 22 (2) : 207~211, 2001

- 2) 題 目 Inhibin B regulating follicle-stimulating hormone secretion during testicular recrudescence in the male golden hamster

著 者 名 JIN, WanZhu HERATH, Chandana B YOSHIDA, Midori ARAI, Y koji SAITA, Erina SHI, ZhanQuan REN, LongQuan WATANABE, Gen GROOME, Nigel P and TAYA, Kazuyoshi

学術雑誌名 Journal of Andrology

巻・号・頁・発行年 23 (6) : 845~853, 2002

既発表学術論文

- 1) 題 目 Changes in plasma concentrations of inhibin A and inhibin B throughout sexual maturation in the male chimpanzee.
著 者 名 KONDO, Mashahiro UDONO, Takefumi JIN, WanZhu SHIMIZU, Keiko FUNAKOSHI, Miho ITOH, Mariko WATANABE, Gen GROOME, Nigel P and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Endocrine Journal
巻・号・頁・発行年 47 (6) : 707~714, 2000

- 2) 題 目 Secretion of inhibin A and inhibin B throughout pregnancy and the early postpartum period in chimpanzees.
著 者 名 KONDO, Mashahiro UDONO, Takefumi JIN, WanZhu FUNAKOSHI, Miho SHIMIZU, Keiko ITOH, Mariko HERATH, Chandana B WATANABE, Gen GROOME, Nigel P and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Journal of Endocrinology
巻・号・頁・発行年 168 (2) : 257~262, 2001

- 3) 題 目 Preovulatory follicles in the ovary as the source of circulating inhibin in the duck.
著 者 名 YANG, PeiXin ARAI, Y Koji JIN, WanZhu WATANABE, Gen GROOME, Nigel P and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 General and Comparative Endocrinology
巻・号・頁・発行年 121 (2) : 156~162, 2001

- 4) 題 目 Diesel exhaust (DE) effects the regulation of testicular function in male fischer 344 rats.
著 者 名 TSUKUE, Naomi TODA, Noriko, TSUBONE, Hirokazu SAGAI, Masaru JIN, WanZhu WATANABE, Gen TAYA, Kazuyoshi BIRUMAZHI, Jun-ichi and SUZUKI, K Akira.
学術雑誌名 Journal of Toxicology, Environment and Health
巻・号・頁・発行年 63 (2) : 115~126, 2001

- 5) 題 目 Elevated levels of inhibin-A and immunoreactive inhibin in aged male Wistar rats with testicular Leydig cell tumor.
著 者 名 HERATH, Chandana B WATANABE, Gen JIN, WanZhu NOGUCHI, Junko AKIYAMA, Kyoichi KURAMOTO, Kazunao GROOME, Nigel P and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Journal of Andrology
巻・号・頁・発行年 22 (5) : 838~846, 2001

- 6) 題 目 Inhibins in the male Göttingen miniature pig: Leydig cells are the predominant source of inhibin B
著 者 名 JIN, WanZhu ARAI, Y Koji HERATH, Chandana B KONDO, Mashahiro ISHI, Hajime TANIOKA, Yoshikuni WATANABE, Gen GROOME, Nigel P and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Journal of Andrology
卷・号・頁・発行年 22 (6) : 953~960, 2001
- 7) 題 目 Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimeric inhibins in the infantile female rat.
著 者 名 HERATH, Chandana B YAMASHITA, Maiko WATANABE, Gen JIN, WanZhu TANGTRONGSUP, Sahatchai KOJIMA, Akemi GROOME, Nigel P SUZUKI, K Akira and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Biology of Reproduction
卷・号・頁・発行年 65 (6) : 1623~1633, 2001
- 8) 題 目 Secretion of inhibin A and inhibin B during pregnancy and early postpartum period in Japanese monkeys.
著 者 名 KOJIMA, Chihiro KONDO, Mashahiro JIN, WanZhu SHIMIZU, Keiko ITOH, Mariko WATANABE, Gen GROOME, Nigel P and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Endocrine
卷・号・頁・発行年 18 (1) : 21~25, 2002
- 9) 題 目 Developmental Changes in Testicular Function and Inhibin Secretion of Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*)
著 者 名 ITOH, Mariko KISHI, Hisashi OHSHIMA, Ken-ichi KAWAZU, Satoko JIN, WanZhu WADA, Sachiko SAITA, Erina NAKANO, Saeko HANAI, Sayuri SUZUKI, K Akira WATANABE, Gen and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Journal of Reproduction and Development
卷・号・頁・発行年 48 (4) : 343~353, 2002
- 10) 題 目 Circulating Inhibin A and Inhibin B in Normal Menstrual Cycle during Breeding Seasons of Japanese Monkeys
著 者 名 SHIMIZU, Keiko KOJIMA, Chihiro KONDO, Masahiro JIN, WanZhu ITO, Mariko WATANABE, Gen GROOME, Nigel P and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Journal of Reproduction and Development
卷・号・頁・発行年 48 (4) : 355~361, 2002

- 11) 題 目 Roles of Basal Levels of Circulating Luteinizing Hormone on
Follicular Maturation in the Pregnant Golden Hamster
(*Mesocricetus auratus*)
著 者 名 OHSHIMA, Ken-ichi ITOH, Mariko KISHI, Hisashi WATANABE, Gen JIN,
WanZhu SAITA, Erina SUZUKI, K Akira TERRANOVA, Paul F and TAYA,
Kazuyoshi
学術雑誌名 Journal of Reproduction and Development
卷・号・頁・発行年 48 (4) : 363~369, 2002
- 12) 題 目 Cellular Localization of Nerve Growth Factor (NGF) and Its
Receptors TrkA and p75LNGFR in the Ovary of the Japanese Monkey
(*Macaca fuscata fuscata*)
著 者 名 SHIMIZU, Keiko JIN, WanZhu KOJIMA, Chihiro SHI, ZhanQuan KONDO,
Masahiro ITOH, Mariko WATANABE, Gen and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Journal of Reproduction and Development
卷・号・頁・発行年 48 (4) : 377~381, 2002
- 13) 題 目 Changes in circulating relaxin levels during pregnancy and early
lactation in Japanese monkey (*Macaca fuscata fuscata*)
著 者 名 SHIMIZU, Keiko JIN, WanZhu KISHI, Hisashi NOGUCHI, Junko WATANABE,
Gen and TAYA, Kazuyoshi
学術雑誌名 Journal of Reproduction and Development
卷・号・頁・発行年 48 (4) : 383~391, 2002