

氏名（本（国）籍）	Pramod DHAKAL（ネパール連邦民主共和国）
主指導教員名	東京農工大学 教授 田谷一善
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第366号
学位授与年月日	平成24年9月18日
学位授与の要件	学位規則第3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	Endocrinological Studies on Equine Reproduction at Various Reproductive Stages (ウマ各種生殖ステージにおける生殖内分泌学的研究)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 南保泰雄 副査 帯広畜産大学 教授 北村延夫 副査 岩手大学 教授 居在家義昭 副査 東京農工大学 教授 田谷一善 副査 岐阜大学 教授 村瀬哲磨

### 論文の内容の要旨

ウマの妊娠中には、子宮内膜盃や副黄体の出現あるいは胎子性腺の肥大など、他の動物とは異なったウマ特有のユニークな現象が認められる。ウマ胎子性腺が肥大し、縮小することは、古くから知られている現象であるが、その生理学的機構は未解明のままである。本研究では、胎子期、新生子期、春機発動期及び成熟期に至る各種生殖ステージにおける下垂体と性腺の機能を内分泌学的に検討した。

第1章では、緒論としてウマの生殖内分泌学について概説し、研究の目的を述べた。第2章では、本研究に共通する実験材料と方法について記述した。

第3章では、ウマの妊娠期におけるアクチビンAの生理作用について記述した。本研究では、ウマの妊娠期間における血中アクチビンA濃度の変化及び胎子性腺と子宮胎盤ユニットにおけるアクチビンAレセプター及びアクチビンシグナル分子の局在を調べた。アクチビンAの測定には、6頭のサラブレッド種妊娠馬から1週間毎に集めた血漿を用いた。胎子精巣(妊娠120, 180, 225, 314日)と卵巣(妊娠110, 140, 180, 270日)及び、それぞれの子宮胎盤ユニットを用いて、免疫組織化学染色によりアクチビンAレセプター(IIA/B, IA/B)とその細胞内メディエーター(Smad 2, 3, 4)の局在を調べた。妊娠50日頃までは、血中アクチビンA濃度は、低値を維持したが、妊娠96日には有意な上昇を示した。その後、同レベルを分娩当日まで維持し、分娩当日に2度目の上昇を示した。アクチビンA濃度は、尿膜絨

毛膜と比べて、子宮組織が6倍高い値を示したが、胎子性腺には、検出されなかった。アクチビンタイプII A/B及びタイプI A/Bレセプターは、全ての妊娠ステージを通して、子宮胎盤ユニットと共に、胎子性腺の間質細胞と精巣・卵巣の生殖細胞に陽性反応を示した。アクチビンシグナル因子であるSmad protein 2, 3, 4は、全ての組織に局在が認められた。血中アクチビンA濃度の最初の上昇は、胎子性腺が肥大し始めた時期と一致し、2度目の上昇は分娩時期と一致した。

第4章では、ウマの出生から春機発動までの下垂体と性腺ホルモンの分泌変化について記述した。初めに、雌雄サラブレッドの出生後6カ月までの卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、immunoreactive(ir-)inhibin、プロジェステロン、テストステロン及びエストラジオール-17 $\beta$ の分泌変化とそれぞれのホルモンの関係性を検討した。636頭の雄馬と694頭の雌馬を用いた。雌雄馬共に、血中プロジェステロン、テストステロン、エストラジオール-17 $\beta$ が高い濃度で出生し、出生後48時間以内に急激な低下を示し、6ヶ月齢まで低値を維持した。ir-inhibinも高い濃度で出生し、その後徐々に低下して20日齢までに半減し、6ヶ月齢まで低下した。血中LH濃度は、雄では、出生時が最も高く、26日齢まで低下し、90日齢までに出生時のレベルにまでゆっくり上昇した。雌では、血中LH濃度は、出生後急激に低下して、10日齢で最低値を示し、6ヶ月齢まで低値を維持した。雄では、血中FSH濃度は、12日齢まで急激に低下し、その後徐々に上昇して100日齢にピークを示した後は、6ヶ月齢まで低値を維持した。雌では、血中FSH濃度は、出生後48時間以内に上昇し、その後一度低下した後に次第に上昇して6ヶ月齢まで高値を示した。雌雄共に、血中FSH濃度の上昇は、血中ir-inhibin濃度の低下と負の相関を示した。血中FSH濃度の初期の上昇は、その後の性腺の発達に関与すると推察された。

次に、春生まれのサラブレッド種雌雄馬における、出生から春機発動期までの下垂体と性腺ホルモンの分泌変化について検討した。春生まれの雄(n=6)と雌(n=9)の出生から60週齢まで毎週採取し、血中FSH、LH、プロラクチン、テストステロン、プロジェステロン、エストラジオール-17 $\beta$ およびir-inhibin濃度を測定した。雌雄共にステロイドホルモンレベルは、出生時に高く、出生後一週間以内に急激に低下し、出生後の2度目の春まで低い値を維持した。Ir-inhibinも出生時には高く、しだいに低下して2度目の春に再び上昇した。出生後の最初の夏では、雌雄子馬の血中FSH濃度が上昇した。その後、2年目の夏には明らかに血中LH濃度と共にFSH濃度が上昇した。プロラクチンの季節性の上昇は、初年度と2年目で同様の変化を示し、違いは認められなかった。これらの結果は、視床下部-下垂体軸は、すでに光周期の変化に反応し、成熟馬同様にプロラクチンを分泌する能力を有しているのに対して、LHとFSHの分泌は、初年度には季節による影響を強く受けていないものと推察された。2度目の繁殖期におけるこれらのホルモン濃度は、成熟馬と比較して違いは認められなかった。以上の結果から、日本の春生まれの雌雄サラブレッドは、出生後2度目の繁殖期に春機発動に達することが判明した。

第5章では、サラブレッド種雄馬の生殖関連ホルモンの周年変化及びホルモン濃度の変化と日長と温度の相関について記述した。5頭の種雄馬と13頭の去勢馬の血液を年間を通して1ヶ月毎に採取した。全てのホルモンは、繁殖期の春と夏に高く、非繁殖期の秋と冬の間は

低値を示した。血中 Insulin like growth factor-I (IGF-I) 濃度も、季節性を示し、ピークは4月であった。プロラクチンの血中濃度も、繁殖期に上昇した。このプロラクチンの分泌変化は、種雄馬と去勢馬のどちらも同様に認められたが、去勢馬は種雄馬に比べて低い濃度であった。種牡馬と去勢馬における血中プロラクチン濃度の変化は、温度よりも日長に強い相関が認められた。

以上の結果から、ウマ胎子性腺の肥大化には、母馬の子宮や胎盤から分泌されるアクチビンが重要な調節因子の一つとして作用すると推察された。出生後は、主として日照時間の変化に同調して視床下部・下垂体・性腺軸の機能が調節される事実が明らかとなった。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ウマの妊娠中に出現する胎子性腺の肥大化現象は、他の動物には認められないウマ特有の現象である。胎子の発育中に性腺が肥大し、縮小することは、古くから知られている現象であるが、その生理学的機構は未解明のままである。本研究では、胎子期、新生子期、春機発動期及び成熟期に至る各種生殖ステージにおける下垂体と性腺の機能を内分泌学的に検討した。

### I. ウマ胎子性腺肥大化現象におけるアクチビンAの生理作用

本研究では、ウマの妊娠期間中における血中アクチビンA濃度の変化及び胎子性腺と子宮胎盤ユニットにおけるアクチビンAレセプターとアクチビンシグナル分子の局在を調べた。アクチビンAの測定には、6頭のサラブレッド種妊娠馬から1週間毎に集めた血漿を用いた。胎子精巣(妊娠 120, 180, 225, 314日)と卵巣(妊娠110, 140, 180, 270日)及び、それぞれの子宮胎盤ユニットを用いて、免疫組織化学染色によりアクチビンAレセプター(II A/B, I A/B)とその細胞内メディエーター (Smad 2, 3, 4) の局在を検討した。妊娠50日頃までは、血中アクチビンA濃度は、低値を維持したが、妊娠96日には有意な上昇を示した。その後、同レベルを分娩当日まで維持し、分娩当日に2度目のピークとして上昇した。アクチビンは、母馬の子宮と胎盤に検出されたが胎子性腺には検出されなかった。アクチビンA濃度は、尿膜絨毛膜と比べて、子宮組織が6倍高い値を示した。アクチビンタイプ II A/B及びタイプ I A/Bレセプターは、全ての妊娠ステージを通して、子宮胎盤ユニットと共に、間質細胞と胎子精巣・卵巣の生殖細胞に陽性反応を示した。アクチビンシグナル因子であるSmad protein 2, 3, 4は、全ての組織に局在が認められた。母馬の血中アクチビンA濃度の最初の上昇は、胎子性腺が肥大し始めた時期と一致し、2度目の上昇は分娩時期と一致した。

### II. 雌雄サラブレッドにおける出生後6ヶ月までの卵胞刺激ホルモン (FSH), 黄体形成ホルモン (LH), immunoreactive (ir-) inhibin, プロジェステロン, テストステロン及びエストラジオール17- $\beta$ の分泌変化

本研究では、636頭の雄馬と694頭の雌馬を用いて、サラブレッド種雌雄馬における出生後の血中FSH, LH, ir-inhibin, プロジェステロン, テストステロン及びエストラジオール-17 $\beta$  の変化とそれぞれのホルモンの関連性を検討した。雌雄馬共に、血中プロジェステロン, テストステロン, エストラジオール-17 $\beta$  が高い濃度で出生し、出生後48時間以内に急激な低下を示し、6ヶ月齢になるまで低値を維持した。雄では、血中FSH濃度は、12日齢まで急激に低下し、その後徐々に上昇して100日齢にピークを示した後は、6ヶ月齢まで低値を維持した。血中LH濃度は、出生時が最も高く、26日齢まで低下し、90日齢までに出生時のレベルにまでゆっくり上昇した。雌雄共に、ir-inhibinは高い濃度で出生し、その後徐々に低下し、20日齢までに半減し、6ヶ月齢まで低下した。雌では、血中FSH濃度は、出生後48

時間以内に上昇し、その後一度低下した後に次第に上昇して6ヶ月齢まで高値を示した。血中LH濃度は、出生後急激に低下して、10日齢で最低値を示し、6ヶ月齢まで低値を維持した。雌雄共に、血中FSH濃度の上昇は、血中ir-inhibin濃度の低下と負の相関を示した。血中FSH濃度の初期の上昇は、その後の性腺の発達に關与すると推察された。

### Ⅲ. 春機発動までの下垂体と性腺ホルモンの分泌変化

本研究では、雌雄サラブレッドの出生から春機発動期までの性腺刺激ホルモン及び性腺ホルモンの分泌変化と季節性の関連性を検討した。春生まれの雄(n=6)と雌(n=9)の出生から60週齢まで毎週採取した。血中FSH, LH, プロラクチン, テストステロン, プロジェステロン, エストラジオール-17 $\beta$ およびir-inhibin濃度を測定した。雌雄共に、ステロイドホルモンレベルは、出生時に高く、出生後一週間以内に急激に低下し、出生後の2度目の春まで低い濃度を維持した。Ir-inhibinも出生時には高く、しだいに低下して2度目の春に再び上昇した。出生後の最初の夏では、雌雄子馬の血中FSH濃度が上昇した。その後、2年目の夏には明らかに血中LH濃度と共にFSH濃度が上昇した。プロラクチンの季節性の上昇は、初年度と2年目で同様の变化を示し、違いは認めなれなかった。これらの結果は、視床下部-下垂体軸は、すでに光周期の変化に反応し、成熟馬同様にプロラクチンを分泌する能力を有するが、下垂体性腺刺激ホルモンであるLHとFSHの分泌は、初年度には、季節による影響を強く受けていないものと推察された。出生後の2度目の繁殖期におけるこれらのホルモンの濃度が、繁殖期の成熟馬の濃度と比較して、有意な違いは認められなかった。以上の結果から、日本の春生まれの雌雄サラブレッド馬は、出生後2度目の繁殖期に春機発動に達することが判明した。

### Ⅳ. サラブレッド種雄馬と去勢馬における生殖関連ホルモンの周年変化

サラブレッド種雄馬における血中FSH, LH, プロラクチン, ir-inhibin, テストステロン, エストラジオール-17 $\beta$ 及びIGF-1濃度の変化と、去勢馬でのプロラクチン分泌の変化を検討した。併せて、これらのホルモン濃度の変化と日長と温度の相関を検討した。5頭の種雄馬と13頭の去勢馬の血液を年間を通して1ヶ月毎に採取した。全てのホルモンは、季節性の変化を示し、繁殖期の春と夏に高く、非繁殖期の秋と冬の間は低値を示した。ホルモンの多くは、北半球で春の中頃である4月に最大値を示した。血中Insulin like growth factor-I (IGF-I)濃度も、季節性を示し、ピークは4月であった。プロラクチンの血中濃度も、繁殖期に上昇した。このプロラクチンの分泌変化は、種雄馬と去勢馬のどちらも同様に認められたが、去勢馬は種雄馬に比べて低い濃度であった。種牡馬と去勢馬における血中プロラクチン濃度の変化は、温度よりも日長に強い正の相関が認められた。以上の結果から、日本の気候条件下では、サラブレッド種牡馬は、下垂体ホルモンと精巣ホルモンの分泌が明らかな季節性を示し、繁殖期の4月から5月に血中濃度が最大となる事が明らかとなった。

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価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目: Post-natal dynamic changes in circulating follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, immunoreactive inhibin, progesterone, testosterone and estradiol-17 $\beta$  in Thoroughbred colts until 6 months of age  
著 者 名: Dhakal, P., Tsunoda, N., Nakai, R., Nagaoka, K., Nambo, Y., Sato, F., Taniyama, H., Watanabe, G. and Taya, K.  
学術雑誌名: Journal of Equine Science  
巻・号・頁・発行年: 22 (1): 9-15, 2011

- 2) 題 目 : Annual changes in day-length, temperature, and circulating reproductive hormones in Thoroughbred stallions and geldings  
著 者 名 : Dhakal, P., Tsunoda, N., Nakai, R., Kitaura, T., Harada, T. Ito, M., Nagaoka, K., Toishi, Y., Taniyama, H., Watanabe, G. and Taya, K.

学術雑誌名 : Journal of Equine Science  
卷・号・頁・発行年 : 22 (2) : 29-36, 2011

- 3) 題 目 : Circulating pituitary and gonadal hormones in spring-born Thoroughbred fillies and colts from birth to puberty  
著 者 名 : Dhakal, P., Hiramata, A., Nambo, Y., Harada, T., Sato, F., Nagaoka, K., Watanabe, G. and Taya, K.

学術雑誌名 : Journal of Reproduction and Development  
卷・号・頁・発行年 : in press

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Impact of livestock hygiene education programs on mastitis in smallholder water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Chitwan, Nepal  
著 者 名 : Ng, L., Jost, C., Robyn, M., Dhakal, I.P., Bett, B., Dhakal, P. and Khadka, R.

学術雑誌名 : Preventive Veterinary Medicine  
卷・号・頁・発行年 : 1(96) : 179-185, 2010