

## 研究レポート

# 血中抗ミュラー管ホルモン測定による 片側性潜在精巣の診断

村瀬晴崇<sup>1)</sup>・齋藤重彰<sup>2)</sup>・天谷友彦<sup>2)</sup>・佐藤文夫<sup>1)</sup>・Barry A. Ball<sup>3)</sup>・南保泰雄<sup>4)</sup>

### 要約

胎子期の精巣から分泌される抗ミュラー管ホルモン(AMH)は、本来雄胎子においてミュラー管を退行させる因子であるが、出生後にも分泌され続けることが知られている。本研究ではウマ潜在精巣の診断マーカーとしての血中AMHの有用性を評価した。正常雄馬、下降した精巣のみ摘出された片側性潜在精巣馬、およびセン馬において血中AMH濃度を測定した。加えて、免疫組織学的に精巣内におけるAMH発現を確認した。血中AMH濃度は正常雄馬(n=11)で  $13.3 \pm 1.8$  ng/ml、片側性潜在精巣馬(n=8)で  $17.6 \pm 3.0$  ng/mlである一方、セン馬(n=6)では検出されず、血中AMHが精巣の有無を反映することが示された。また、AMH免疫組織化学的染色において、正常精巣および潜在精巣のセルトリ細胞は好染し、潜在精巣においてもAMHを分泌していることを確かめた。以上の結果から下降側のみ精巣摘出された片側性潜在精巣馬においても残存する精巣からAMHを分泌しており、血中AMHを測定することが診断に有用であることが示された。

### はじめに

潜在精巣は一方もしくは両側の精巣が陰嚢内に下降しない疾患であり、あらゆる哺乳動物で起こりうるが、特にヒト、ブタそしてウマで頻度が高い [7, 23]。ウマにおける発生率は5-8%であり、そのほとんどは片側性である [3]。間質細胞(ライディッヒ細胞)は熱感受性ではないため、腹腔内でもテストステロンを産生、雄性行動が残存する [3]。しばしば、片側性潜在精巣馬が不適切な去勢術によって、正常な下降精巣のみが摘出され、潜在精巣が体内に残存しているにもかかわらずセン馬と誤認されることがある (hemi-castrated unilateral cryptorchid, HCUC) (図1)。

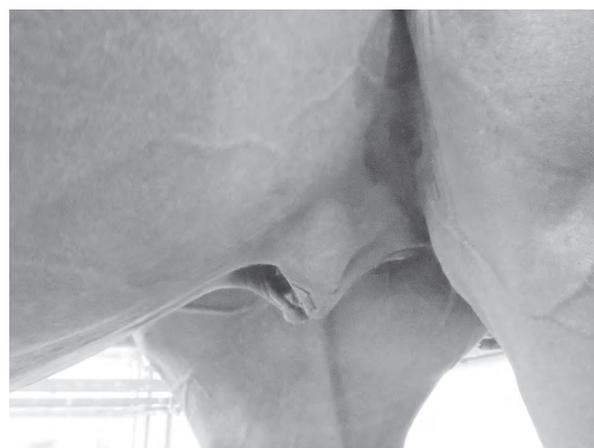


図1  
HCUC馬の外貌。外貌からは潜在精巣を推定することはできず、同馬がセン馬か雄かの鑑別は困難。

<sup>1)</sup>Murase Harutaka, Sato Fumio : 日高育成牧場

<sup>2)</sup>Saito Shigeaki, Amaya Tomohiko : 大和高原動物診療所

<sup>3)</sup>Barry A. Ball : ケンタッキー大学

<sup>4)</sup>Nambo Yasuo : 帯広畜産大学

本論文は、J. Equine Sci. 26(1), 15-20, 2015に英文で掲載されたものを一部改変し、和訳したものである。

HCUC馬の診断は難しい[3]。行動や手術を含む完全な履歴が潜在精巣の正確な診断に必須であるが[20]、多くの馬の履歴は不十分である。行動学的な情報は特に重要である。なぜなら雄性行動は残存する精巣を示唆するからである[20]。診断法としては触診、超音波検査それに血清ホルモン測定などがある。直腸検査で精巣の位置を診断する臨床獣医師もいるが、本検査法が信用できると述べる研究者はわずかである[3]。既報によると、経直腸による鼠径輪の触診の診断率は87%である[22]。またある報告では、経直腸もしくは鼠径部の触診で診断できたのは停留精巣11個中わずか2個のみであった一方、超音波検査では100%診断できた[14]。

血中テストステロン濃度によるセン馬と潜在精巣馬の鑑別誤診率は14%である[20]。また、血中エストロゲン濃度による潜在精巣の診断率は96%である[4]。潜在精巣の標準的な検査であるヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)刺激試験の診断率は94.6%と報告されている[9]。しかし、この方法は2日にわたる複数回の採血が必要であり、テストステロン産生を促すことからドーピング作用を有するため競技馬には利用しづらい。さらに、ホルモン濃度は測定系によって値が異なりうるため、各測定系における標準値を理解しておく必要がある[20]。

抗ミュラー管ホルモン(Anti-Müllerian hormone, AMH)はTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する糖タンパクホルモンである。雄の胎子期においてセルトリ細胞から分泌され、後の卵管となるミュラー管の退行を促す[16]。ヒトにおいてAMHは出生後も分泌し[15, 21]、性成熟前に高く、その後顕著に低下する[1, 5, 17]。ウマにおいても胎子精巣におけるセルトリ細胞で強く発現し、性成熟前の精巣では弱く、成馬ではわずかとなる[2, 6]。また、血中AMH濃度においても性成熟前で成熟後よりも高い[8]。また、潜在精巣馬における血中AMH濃度は正常雄よりも高く[8]、セン馬の血中AMH濃度は測定系における検出限界以下である[8]。ヒト小児科において、AMHは潜在精巣と無精巣症との鑑別法としてよく知られている。AMHはセルトリ細胞由来のため、血中AMHの測定は精巣

組織の存在の指標となりうる[13, 18, 19]。

本研究の目的はHUCU馬において残存する潜在精巣のAMH分泌を免疫組織化学的手法および血中AMH濃度によって確かめ、ウマ潜在精巣の診断マーカーとしてのAMHの有用性を検証することである。

## 材料および方法

### 供試動物

正常馬11頭(サラブレッド種、15.4 $\pm$ 6.4歳、平均値 $\pm$ SD)、セン馬6頭(サラブレッド種、11.2 $\pm$ 4.9歳)およびHCUC馬8頭(サラブレッド種4頭、ポニー2頭、クォーターホース1頭、ウエストファーレン種1頭、6.3 $\pm$ 3.2歳)を用いた。HCUC馬は去勢歴があり、外見上陰嚢内に精巣が認められないものの、雄性行動から潜在精巣を疑い、外科的に腹腔内に停留した精巣を確認した馬を対象とした。加えて、正常馬(サラブレッド種4頭、2.3 $\pm$ 0.5歳)に対して去勢術を実施し、術後の血中濃度の推移を調べた。本研究は日高育成牧場実験動物管理委員会の承認を得て実施した。

### 採血

正常馬とセン馬の採血は4月に行った。一方、HCUC馬は臨床獣医師から相談を受けた時期によって2, 3, 4, 7, 8月に採血した。去勢術は6月および10月に実施し、術前から術後4日目までは毎日、以後2日毎に採血した。血液は頸静脈から真空採血管を用いて採血し、4 $^{\circ}$ C、1880gにて10分間遠心分離された後、血清を分離し、測定まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

### 血中AMH濃度測定

血中AMH濃度の測定はサンドイッチ法を原理とする市販のELISAキット、AMH Gen II ELISA(#A73818、Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)を用いた。本測定系の測定下限値は0.16 ng/mLであり、本研究においてはそれ以下を0 ng/mLとした。全ての血清検体は2重測定を実施した。本測定系のアッセイ内およびアッセイ間変動係数はそれぞれ5.6%および5.4%以下であった。

## 免疫組織化学的染色

正常精巣は2歳サラブレッド種、雄の去勢手術時に採取し、潜在精巣は4歳ポニーの腹腔内から外科的に摘出した。精巣組織はパラフィン包埋し、4  $\mu$ mに薄切、免疫組織化学的染色(以下、免疫染色)を施した。AMHの発現を検出するため、過去にウマ精巣で報告されているアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法(ABC法)を用いた免疫染色を行った[6]。染色後、各スライドはヘマトキシリンで対比染色した。1次抗体には抗ヒトAMHヤギポリクローナル抗体(sc-6886, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)を用いた。陰性対照として、1次抗体をブロッキングペプチド(sc-6886P, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)と混合し(1:5; w:w)、4℃にて一昼夜おいたものを1次抗体の代わりに用いた。

## 統計解析

正常馬、HCUC馬、セン馬の血中AMH濃度の有意差を検定するため、一元配置分散分析を行った後、多重比較検定法としてTukey's HSD testを用いた。去勢術前後の血清濃度の変化を検定するために、Dunnett's testを用いた。有意水準は5%とし、 $p < 0.05$ で有意差ありと判断した。これらの検定はJMP software(SAS研究所日本株式会社、東京)を用いた。測定値は平均±標準誤差(Standard Error, SE)で表記する。

## 結果

### 正常馬、HCUC馬、セン馬の血中AMH濃度

セン馬の血中AMH濃度はいずれも検出限界以下( $< 0.16$  ng/mL)であったが、正常馬とHCUC馬の血中AMH濃度はそれぞれ $13.3 \pm 1.8$  ng/mL(1.7-21.9 ng/mL)、 $17.6 \pm 3.0$  ng/mL(3.1-28.2 ng/mL)であった(図2)。正常馬とHCUC馬の間に有意差は認められなかった。

### 正常馬における去勢術後の血中AMH濃度の推移

4頭の去勢前の血中AMH濃度はそれぞれ8.7、9.1、11.3および27.0 ng/mLであった。術後AMH濃度は有意に低下し、術前を100%とした際の推移は1日目 $79.9 \pm 4.7\%$ 、2日目 $60.2 \pm 4.0\%$ および3

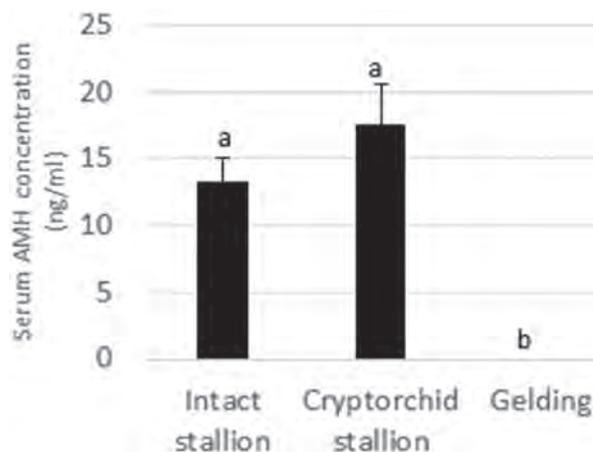


図2

正常馬、HCUC馬、去勢馬の血中AMH濃度。セン馬からは検出されなかった(0 ng/mL)。a, b:異なる文字間に有意差あり( $p < 0.05$ )。

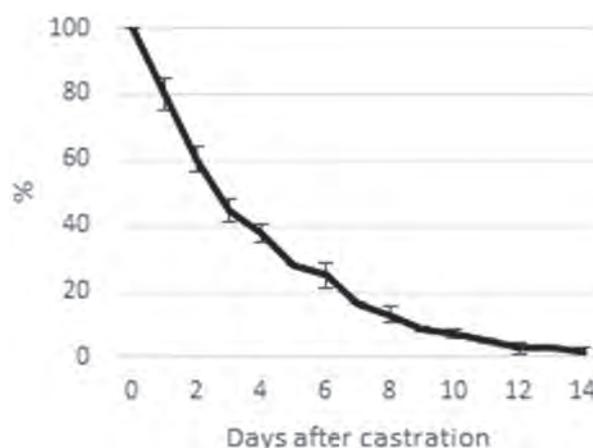


図3

去勢術後の血中AMH濃度。術前値を100%として術後の低下を示す。生物学的半減期はおよそ2.5日であった。アスタリスク(\*)は術前(0日)との有意差( $p < 0.05$ )を示す。

日目 $44.5 \pm 3.6\%$ であった。生物学的半減期はおよそ2.5日であった(図3)。

### 正常精巣および潜在精巣におけるAMH免疫組織化学的局在

潜在精巣は正常精巣と比べて精子形成細胞の層が薄く、精細管の直径が小さく、間質が広がった。免疫染色によりAMHの発現はセルトリ細胞で認められたが精原細胞では認められなかった(図4A, B)。

## 考察

本研究では血中AMH濃度がHCUC馬とセン馬の鑑別マーカーとして有用であるか検証した。

血中AMHはこれまでの報告[8]と同様、正常馬で

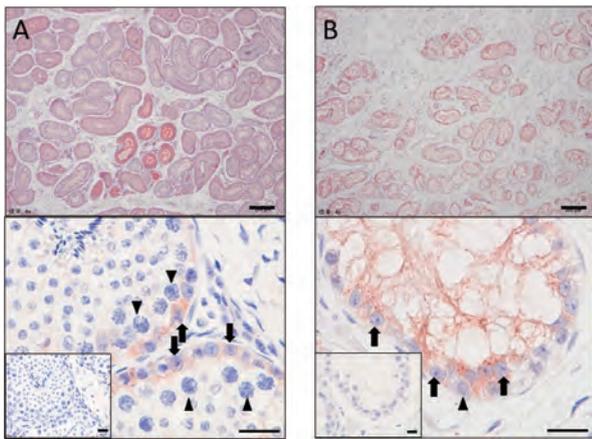


図4

正常精巣(A)および潜在精巣(B)におけるAMH免疫組織化学的染色。上段は弱拡大像を示す(Scale bars = 200  $\mu$ m)。潜在精巣では正常精巣と比べ、精細管径が小さく、間質が広い。また、精母細胞が少ない。下段は強拡大像を示す(Scale bars = 20  $\mu$ m)。セルトリ細胞(矢印)において好染が認められたが、精母細胞(矢頭)では認められない。ブロッキングペプチドを用いた陰性対照像を挿入図で示す。

検出され、セン馬では検出下限であり、検出されなかった。また、正常馬よりもHCUC馬の方が高い傾向にあったものの有意差は認められなかった。一方、DSL測定系The Active AMH ELISA(Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA)を用いたClaesらの報告では、正常馬は15 ng/mLであるのに対し、潜在精巣馬は33 ng/mLと有意に高い値を示した[8]。この違いの原因は、対側の精巣の存在と採血時期が異なるためと考えられる。本研究では対側の正常精巣がないHCUC馬を用いたのに対し、Claesらの報告[8]では正常精巣が残存するウマ、摘出されたウマ、潜在するウマが混在している。したがって本研究では正常精巣が存在しない分、AMH濃度が低くなったと考えられる。また、雄における血中AMH濃度は日照時間による影響を受け、長日期は短日期よりも約1.7倍高い[8]。本研究においては、正常馬が長日期の4月に採血したのに対してHCUC馬は短日期も含まれていたため、HCUC馬で低かったかもしれない。

従来の検査法である血中テストステロン濃度やエストロン濃度、hCG負荷試験などはセン馬と雄の測定値が交差するため、誤診するケースがある[3, 4, 9-11]。また、ホルモン濃度は測定系によって値が異なるため、結果の解釈には熟練を要する。一方、血中AMHはセン馬では検出されず、HCUC馬では検出されたことから、セン馬とHCUC馬の境界

は明瞭であった。このことから、AMHは既存の検査法よりも明確に精巣の有無を診断しうると考えられる。

血中AMH濃度が去勢術後に漸減し、2週間後には検出されなくなったことから、精巣がAMH分泌に関与していることを確認した。生物学的半減期は約2.5日であったが、ヒトにおいては $27.6 \pm 0.8$ 時間と報告されており[12]、今回の結果より短い。本研究と同じくセン馬を用いた調査においても1.5日と報告されているが[8]、この違いの理由については不明である。

また、免疫染色により潜在精巣セルトリ細胞においてAMH陽性を認めた。これは、ウマにおいてもセルトリ細胞で発現しているという従来の報告と同様であった[6]。去勢後に血中AMHが検出されなくなることから、精巣は雄におけるAMH分泌に必須であることを示しており、血中AMHが精巣の有無を明確に反映することを裏付けた。

以上のことより、本研究では雄におけるAMH分泌は精巣に依存しており、正常精巣のみならず潜在精巣においても分泌されていることから、血中AMH濃度が潜在精巣における簡便かつ確実な診断マーカーであることを明らかにした。

## 引用文献

1. Aksglaede, L., Sorensen, K., Boas, M., Mouritsen, A., Hagen, C.P., Jensen, R.B., Petersen, J.H., Linneberg, A., Andersson, A.M., Main, K.M., Skakkebaek, N.E., and Juul, A. 2010. Changes in anti-Mullerian hormone (AMH) throughout the life span: a population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 95: 5357-5364.
2. Almeida, J., Conley, A.J., Mathewson, L., and Ball, B.A. 2012. Expression of anti-Mullerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. *Theriogenology.* 77: 847-857.
3. Arighi, M. 2011. Testicular Descent. pp.

- 1099-1106. In: *Equine Reproduction*, Vol. 1, 2nd ed. (A.O. McKinnon, et al. ed.), Blackwell Publishing Ltd., West Sussex.
4. Arighi, M., and Bosu, W. 1989. Comparison of hormonal methods for diagnosis in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 9: 20-26.
  5. Baker, M.L., and Hutson, J.M. 1993. Serum levels of mullerian inhibiting substance in boys throughout puberty and in the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab*. 76: 245-247.
  6. Ball, B.A., Conley, A.J., Grundy, S.A., Sabeur, K., and Liu, I.K. 2008. Expression of anti-Mullerian hormone (AMH) in the equine testis. *Theriogenology*. 69: 624-631.
  7. Bergin, W.C., Gier, H.T., Marion, G.B., and Coffman, J.R. 1970. A developmental concept of equine cryptorchidism. *Biol Reprod*. 3: 82-92.
  8. Claes, A., Ball, B.A., Almeida, J., Corbin, C.J., and Conley, A.J. 2013. Serum anti-Mullerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology*. 79: 1229-1235.
  9. Cox, J.E. 1975. Experiences with a Diagnostic Test for Equine Cryptorchidism. *Equine Veterinary Journal*. 7: 179-183.
  10. Cox, J.E., Redhead, P.H., and Dawson, F.E. 1986. Comparison of the measurement of plasma testosterone and plasma oestrogens for the diagnosis of cryptorchidism in the horse. *Equine Vet. J*. 18: 179-182.
  11. Cox, J.E., Williams, J.H., Rowe, P.H., and Smith, J.A. 1973. Testosterone in normal, cryptorchid and castrated male horses. *Equine Vet. J*. 5: 85-90.
  12. Griesinger, G., Dafopoulos, K., Buendgen, N., Cascorbi, I., Georgoulas, P., Zavos, A., Messini, C.I., and Messinis, I.E. 2012. Elimination half-life of anti-Mullerian hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 97: 2160-2163.
  13. Guibourdenche, J., Lucidarme, N., Chevenne, D., Rigal, O., Nicolas, M., Luton, D., Leger, J., Porquet, D., and Noel, M. 2003. Anti-Mullerian hormone levels in serum from human foetuses and children: pattern and clinical interest. *Mol Cell Endocrinol*. 211: 55-63.
  14. Jann, H.W., and Rains, J.R. 1990. Diagnostic ultrasonography for evaluation of cryptorchidism in horses. *J Am Vet Med Assoc*. 196: 297-300.
  15. Josso, N., Cate, R.L., Picard, J.Y., Vigier, B., di Clemente, N., Wilson, C., Imbeaud, S., Pepinsky, R.B., Guerrier, D., Boussin, L., Legeal, L., and Carreeusebe, D. 1993. Anti-mullerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog Horm Res*. 48: 1-59.
  16. Jost, A. 1953. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res*. 8: 379-418.
  17. Lee, M.M., Donahoe, P.K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G.B., Best, S., Hasegawa, Y., Noto, R.A., Schoenfeld, D., and MacLaughlin, D.T. 1996. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 81: 571-576.
  18. Lee, M.M., Donahoe, P.K., Silverman, B.L., Hasegawa, T., Hasegawa, Y., Gustafson, M.L., Chang, Y.C., and MacLaughlin, D.T. 1997. Measurements of serum mullerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. *N Engl J Med*. 336: 1480-1486.
  19. Lee, M.M., Misra, M., Donahoe, P.K., and MacLaughlin, D.T. 2003. MIS/AMH in the assessment of cryptorchidism and intersex conditions. *Mol Cell Endocrinol*. 211: 91-98.
  20. P.O.E.mueller, and A.H.Parks. 1999. Cryptorchidism in horses. *Equine Veterinary*

*Education*. 11: 77-86.

21. Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C., and Bedecarras, P. 2003. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol*. 211: 21-31.
22. Stickle, R.L., and Fessler, J.F. 1978. Retrospective study of 350 cases of equine cryptorchidism. *J Am Vet Med Assoc*. 172: 343-346.
23. Williams, W.L. 1943. Diseases of the genital organs of domestic animals, 3rd ed., Ethel Williams Plimpton Publishing Co., Massachusetts.