

博士論文

雌牛の生殖器の先天異常に関する
臨床内分泌および病理学的研究

Research on Clinical Endocrinology and Pathology
on Congenital Disorders in Bovine Female
Reproductive Organs

森山千穂

山口大学大学院連合獣医学研究科
(宮崎大学)

山口大学

2009

目次

| | |
|------------------------------------|----|
| 第1章 緒論 | 3 |
| 1.雌の繁殖障害 | 4 |
| 2 生殖器の先天異常 | 5 |
| ① 染色体異常 | 5 |
| ② フリーマーチン | 6 |
| ③ 間性 | 7 |
| ④ 中腎傍管の部分的形成不全 | 8 |
| ⑤ 生殖器の先天異常 | 9 |
| 1-3. 本研究の目的 | 10 |
| 第2章 ホワイトハイファー病 (WHD) | |
| 研究の背景 | 11 |
| 試験1: 子宮の不完全形成と膈弁遺残を合併した WHD I 型の1例 | |
| 1-1. 材料と方法 | 11 |
| 1-2. 結果 | 12 |
| 1-3. 考察 | 12 |
| 試験2: 形態学的に3分類した WHD の臨床経過 | |
| 2-1. 材料と方法 | 17 |
| 2-2. 結果 | 10 |
| i)分娩月齢 | 17 |
| ii)人工授精による受胎例 | 18 |
| iii)胚移植による受胎例 | 19 |
| 2-3. 考察 | 21 |
| 第3章 間性 | |
| 内分泌学および病理組織学的に異なる病態を示す牛雄性仮性 | |

半陰陽の 2 症例

| | |
|----------------------|----|
| 3-1. 研究の背景 | 24 |
| 3-2. 材料と方法 | 24 |
| i) hCG 負荷試験 | 27 |
| ii) 血中性ホルモン濃度 | 28 |
| iii) 性染色体検査 | 28 |
| iv) Y 染色体特異的 DNA の検出 | |
| 29 | |
| v) 病理組織学的検査 | 30 |
| vi) 統計処理 | 30 |
| 3-3. 結果 | |
| i) 血中性ホルモン濃度 | 30 |
| ii) 性染色体分析 | 32 |
| iii) 病理所見および組織像 | 32 |
| 3-4. 考察 | 35 |

第 4 章 繁殖性を持つ牛の異性多胎の 3 症例

| | |
|------------|----|
| 4-1. 研究の背景 | 37 |
| 4-2. 材料と方法 | 37 |
| 4-3. 結果 | 42 |
| 4-4. 考察 | 45 |

第 5 章 総合考察

第 6 章 要約

謝 辞

文 献

第1章

緒 論

先天異常は、従来「出生時における形態や機能の異常」と定義されてきたが、今日ではさらに広く、「正常では染色体組成の遺伝情報の発現によって行われる時間的、空間的に均衡のとれた発育が何らかの原因によって障害され、出生時に既に正常からのひずみが方向づけられているもの」と定義されている。

この定義に含まれる異常には、受精障害や早期胚死滅、胎子死、流産、出生時の先天奇形、虚弱、機能および知能障害、先天性代謝異常、発育遅延、繁殖障害、並びに寿命の短縮がある。

一般に先天異常の原因は遺伝因子によるものと環境因子によるものに分けられ、遺伝的要因(Nicholas, 1996)には変異遺伝子と染色体異常がある。家計調査では、単一劣性遺伝と診断された顕著な形態や機能の異常の多くは、その後の選抜淘汰によりすでに消滅し、発生数が激減している。牛の先天異常に関しては、海外で優れた成書(Dennis, 1993, Leipold et al, 1986, Long, 2002, Noden et al, 1992, Roberts, 1986)や、総説(Greene et al, 1973, Leipold, 1980)が多く、また我が国にもいくつかみられる(浜名克己 2006、石川 恒 1967、望月 宏 1981)。

先天異常の分類は、原因学的分類が望ましいが、すべての原因を究明することは不可能であり、同様に影響を受けた胚の原基による分類も困難である。そこで今日では、異常の程度が最も著しい組織による器官系統別分類が一般的である(Leipold et al, 1986)。

Gilmore (Gilmore et al, 1969)によれば、8,627例の分娩のうち、5.49%が先天異

常を示し、その内訳は虚弱子(1.77%)、骨・関節・軟骨の異常(1.45%)、死産(2.66%)、神経と眼の異常(0.16%)、並びに上皮と生殖器の異常(0.19%)としている。一方、Fingerら(Finger et al, 1970)は 2,293 例の先天異常子牛のうち、泌尿生殖器の異常は 4.3%、わが国では平賀ら(平賀武夫ほか、1987)は北海道の先天異常 223 例のうち、雌生殖器(3.9%)や雄生殖器(3.1%)に異常をみている。

1. 雌の繁殖障害

繁殖が一時的または永続的に停止あるいは障害される繁殖障害は、その発現状況により次の4つに大別される。

- 1) 性成熟に達すべき時期を過ぎても卵巣が正常に機能せず、無発情あるいはその他の異常発情を示し、交配できないもの。
- 2) 発情は発現するが、卵巣や子宮などに異常があり、交配しても受精が成立しないもの。
- 3) 受精しても妊娠が維持されないもの。
- 4) 分娩経過中の異常および分娩後の異常。

一方、繁殖障害の原因としては、生殖器の解剖学的異常、ホルモンの分泌異常、飼養管理の不良、微生物感染、授精技術および臨床繁殖検査の技術の不良があげられる。その中で、生殖器の解剖学的異常は、その性状および程度により受胎の妨げとなり、それには先天性と後天性がある。

1) 先天異常

牛の異性多胎の雌ではフリーマーチンや間性がある。また、中腎傍管（ミューラー管）の発育不全による子宮角、子宮体、子宮頸、膣の部分的または完全欠損や子宮頸の重複もある。さらに、常染色体性単一劣性遺伝子による遺伝的な卵巣発育不全、並びに遺伝的要因による生殖子の異常や胚の死滅がある。

膣弁遺残は、膣前庭と膣の境界部にみられる膜状の膣弁が、本来は胎生期に消失するのに、出生後も遺残した状態を指す。膣検査により、膣鏡が深部まで

入らず、有孔または無孔の輪状膜として発見される。時には腔内に多量の粘液または膿が貯留している。肉柱は、中腎傍管の中隔が遺残したもので、腔深部において上下の腔壁を結ぶ垂直の索状物としてみられる。細かいヒモ状から幅5cm 以上のものまであり、授精や分娩の障害となる場合もあるが、外科的に切断する。

2) 後天異常

分娩や難産、あるいは人工授精および子宮や卵巣処置の失宜に継発する卵巣、卵管、子宮、子宮頸、腔などの損傷、癒着、狭窄または閉塞がある。

繁殖障害の発生状況として、空胎牛の割合は、乳牛で10～20%、肉牛では20%前後とされ、原因の器官別内訳では卵巣疾患および子宮疾患が繁殖障害の主体を占める。繁殖障害の診断としては、病歴、問診、視診を行い、繁殖機能検査として、①腔検査、②直腸検査、③子宮洗浄、④超音波検査、⑤乳汁中や血中の性ホルモン濃度の測定、⑥子宮の細菌・組織・頸管粘液の精子受容性検査、⑦卵管疎通性検査などがある。

2. 生殖器の先天異常

生殖器の先天異常は、遺伝的要因や染色体異常、発生過程における分化や発育の異常などにより起こる。中腎傍管の部分的形成不全を除き、多くの場合、受精、妊娠の維持および妊娠期間の満了が望めず、不妊症となる。

① 染色体異常

哺乳類では、性染色体がホモ(XX)の場合が雄、ヘテロ(XY)の場合が雌で、牛では29対の常染色体と1対の性染色体の合計60個(60, XY;60)である。染色体に異常のある卵子や精子による受精、および胚の卵割時における染色体分離の異常などにより染色体異常がおこると、致死的異常により大半の個体は死

滅し、吸収または流産や死産が起こる。出生した個体でも、その多くは不妊症や習慣性流産を示す。一方、性染色体異常では、一般に生殖細胞形成能を欠き、絶対的不妊症となる。また、染色体に形態的異常はみられないが、表現型の性あるいは性腺の性と性染色体に一致がみられない異常(間性：XX 雄、XY 雌)では、生殖器の異常や生殖細胞の欠如などによる不妊症を示す。染色体の構造異常としてキメラがあり、これは一個体内に異なる受精卵や細胞に由来する細胞が混在する状態で、牛の異性多胎の場合、フリーマーチンとなる。



図 1-1. 正常雄 (XY,左) と正常雌 (XX,右) の性染色体

②フリーマーチン

牛の異性多胎の場合、雌胎子の約 92~93%は正常な性の分化が起こらず、生殖器に先天異常を起こし、不妊症を示すフリーマーチンとなる。この原因として、雄胎子と雌胎子の胎膜血管が互いに吻合して両胎子間で血液の交流が起こるためであり、性染色体キメラ(XX/XY)を示す。多くの症例で、内部生殖器の発達は極めて悪いが、外部生殖器は正常な雌とほぼ同様である。一方、卵巢の精巢化がさまざまな程度にみられ、1つの生殖巣に卵巢と精巢の組織が混在する卵精巣や雌雄両性の内部生殖器をもつ例などさまざまである。同腹の雄も性染色体キメラを示す。単胎の雌子牛でも、妊娠途中で雄胎子が死亡した場合、キメラとなり、不妊症となる場合がある(北原 豪ほか、2002)。また、ホルスタイン種乳牛の三つ子にみられたフリーマーチンの報告もある(水野 恵ほ

か、2003)。

成因として、雄由来の Y 染色体上に位置する性決定領域 (SRY) が未分化な雌の卵巣原基を雄性化して、アンドロジェンの分泌を起こすことによると考えられている。症状として、卵巣は発達せず、中腎傍管から発生する生殖器部分 (子宮、子宮頸、膣) の発達が極めて悪い。膣前庭や外陰部は通常正常であるが、肥大した陰核や長い房状の陰毛がみられる。

臨床診断の基準として、膣前庭以外は形成不全であるため、膣の長さが正常牛の 1/3 以下であり、長さ 20cm の試験管を挿入することにより、膣の長さを推定できる。直腸検査が可能な月齢では、発育不良な生殖器の触診により診断が可能となり、また培養白血球の染色体検査による XX/XY のキメラや、PCR 法による Y 染色体由来の雄特異的バンドの検出法がある。

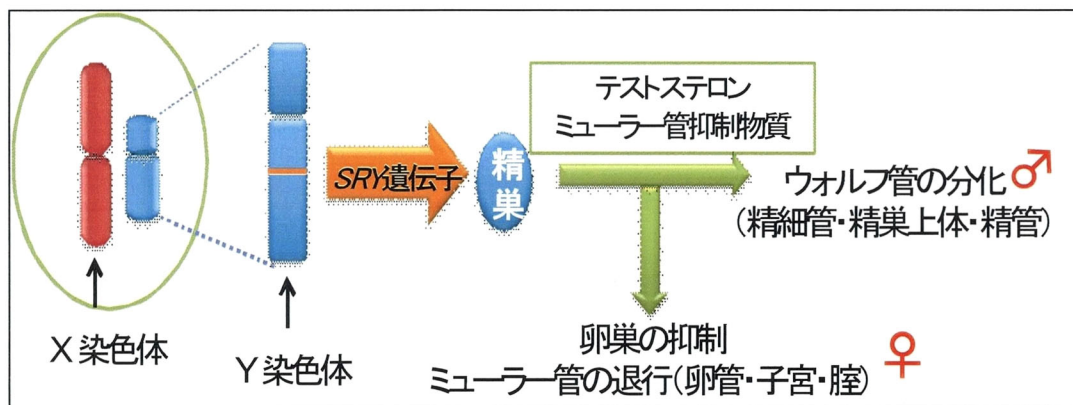


図 1-2. フリーマーチンのメカニズム

③間性

性はその成り立ちから、遺伝的性、生殖腺の性および表現型の性に分けられ、正常ではこれらの性がすべて一致している。しかし、それらが一致せず、種々の病態を示す性の混乱が起こる場合を間性という。解剖学的に完全な雌型または雄型を示さず、両性の特徴を併せ持つ状態で、代表例として半陰陽があり、フリーマーチンも含まれる。

真性半陰陽は、一個体において卵巢と精巣の両生殖巣をもつか、両方の組織の混在した卵精巣をもつ症例で、性染色体キメラやモザイクを示す。仮性半陰陽は、外部生殖器や第二次性徴が示す性とは反対の生殖巣を持つもので、雄性仮性半陰陽では、外見上は雌に似るが精巣をもち、雌性仮性半陰陽では逆に外見上は雄に似るが、卵巢をもつ (Lott DF et al;1993, Mayers Wallen VN;1999)。内部の性腺のホルモン産生能を検査する方法として、hCG(人絨毛性性腺刺激ホルモン)投与による負荷試験がある。正常牛では、hCG 投与後、精巣のライディヒ細胞からはテストステロンが、卵巢の内卵胞膜細胞や顆粒層細胞からはプロジェステロンが分泌される。

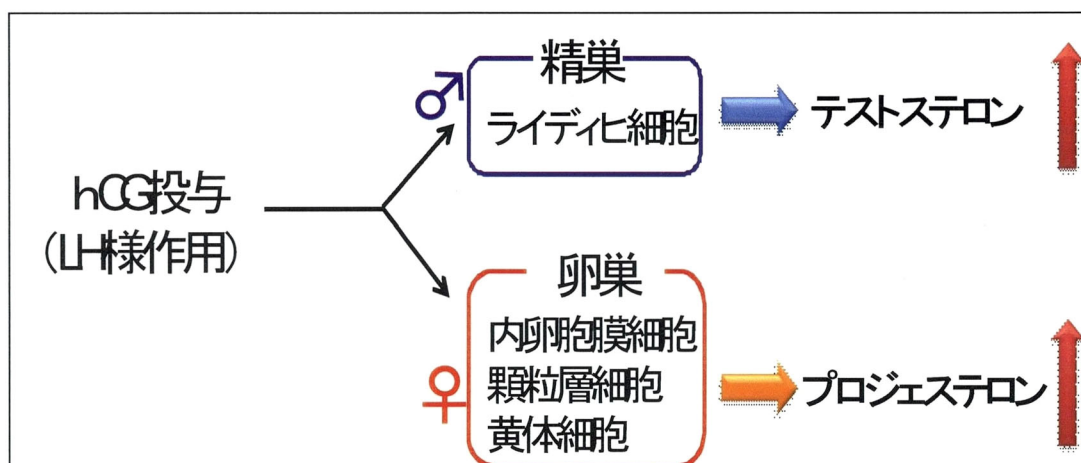


図 1-3. 性腺のホルモン分泌能力を調べる hCG 負荷試験

④中腎傍管の部分的形成不全

卵管や子宮、子宮頸あるいは膣の発育が部分的に抑制されるもので、卵管形成不全、卵管間膜嚢胞、ホワイトヘイファー病がある。

ホワイトヘイファー病は、先天的な卵管、子宮頸、膣などの管状生殖器の部分的形成不全で、白色被毛のショートホーン種の雌で最初に発見された。本

症は、白色被毛遺伝子と関連した常染色体劣性遺伝子によって発現することがわかっており、ホルスタイン種での発生も報告されている(Ahlers D et al; 1984, Oelschlaeger A et al;1981,Morris LH et al; 1999, Szabo,1989)。本症では、子宮角の大部分を欠き、子宮体、子宮頸、膣が欠如するⅠ型、一側の子宮角を欠如する単角子宮のⅡ型、膣より頭側の生殖器は正常に形成されるが、膣弁が遺残するⅢ型に分けられる(Hamori 1983, Jubb et al, 1993)。生殖器の形成不全部分には、線維性の紐状ないし膜状構造物が認められる。本症では、卵巣は正常で、性成熟に達すると発情周期が発現し、管状生殖器は分泌活動を営み、無形成部位より卵巣側の管腔には分泌物が貯留して拡張する。

重複子宮は、中腎傍管の中隔が子宮体と子宮腔部に遺残し、外子宮口から子宮角まで左右が分離された状態をいう。二重頸管は、頸管部にのみ中隔が遺残したものである。重複外子宮口は、中腎傍管の癒合不全により起こるが、授精や分娩の障害となることはない。

⑤雄生殖器の先天異常

正常な生殖器の発達には、精巣と生殖道（精巣上体、精管、尿道）が適切な時期に、正常の場所に発達することが必須である。雄では中腎管が発達して、精巣上体、精管、精嚢腺が形成され、尿生殖洞から尿道、前立腺、尿道球腺、膀胱が形成され、生殖結節は陰茎、前庭嚢は陰嚢へ分化する。

精巣が胎子期に陰嚢内に下降しないで出生する潜在精巣は、1～10%の発生率で、多くは一側性で、左精巣が潜在化しやすい。両側性では繁殖性を欠くが、一側性では正常から障害されたものまで多様である。潜在精巣は胎生期の精巣の移動であり、腎臓の後極から鼠径管まで様々な場所に位置し、腹壁皮下に存在することもある。本症は、単一の常染色体上の劣性の性関連遺伝子による遺伝とされるが、不完全な優性遺伝子と劣性遺伝子を区別することは困難である。直接的な発生要因としては中腎傍管抑制物質、テストステロン、陰部大腿神経

が関与するとされている。本症では、間質細胞やセルトリ細胞の機能が障害され、造精機能を欠く。潜在精巣は、遺伝的な要因も疑われ、治療の対象とせず、繁殖には供用しないことが求められる。

生殖器の発生に関与する要因と機構は非常に複雑であり、正常な発達には、卵巢と生殖道(卵管、子宮、膣)が適切な時期に正常の場所で発達することが必須である。胎生期におけるこれらの不一致は、出生後の生殖器の表現型の異常となる。発生早期では、雌雄共通の組織・器官によって構成される性未分化期を経過後、それぞれの生殖器は分化する。牛では胎生初期に形成される一对の生殖隆起に受精後約 26 日頃に原始生殖細胞が出現し、胎長 30mm となる 40~50 日ころに性の分化が起こる。このころ、雌では中腎傍管が発達して、卵管、子宮、膣が形成され、尿生殖道から膣前庭、尿道、膀胱が形成される。また、生殖結節は陰核となり、前庭襞は陰唇となる。遺伝子や染色体の異常、胎子期の内分泌の異常により、発生過程に乱れが生じ、さまざまな異常が出現する。

生殖器の先天異常の病態は多様であり、従来、臨床現場では精査されることなく淘汰される事が多い。生殖器の先天異常の多くは直接不妊症となり、自然あるいは人為的に淘汰される。しかし、染色体、特に性染色体の異常は間性を生じ、さまざまな形態異常をもたらす。

本研究では、臨床現場で遭遇する雌牛の生殖器の異常について、臨床繁殖学的な機能診断を行い、予後不良で用途変更を勧めるもの、あるいは逆に適切な処置により、繁殖性を見出す症例について検討した。

今回、雌牛の生殖器の先天異常に関する臨床内分泌学および病理学的検討をホワイトハイファー病(第2章)や雄性仮性半陰陽(第3章)、フリーマーチン(第4章)について行った。

第2章

ホワイトハイパー病

研究の背景

中腎傍管の部分的形成不全であるホワイトハイパー病（WHD）は、性腺である卵巢機能は正常であり発情徴候が発現するが、膣長が異常に短いため人工授精時に発見される事が多い。一方、WHD は子宮角、子宮頸管および膣の形態的で大きく 3 つに分類され、両子宮角欠損で絶対不妊症である I 型を除いて、II 型および III 型では繁殖供用への可能性が残されている。しかし、これらの事を理解している臨床獣医師や人工授精師は必ずしも多くない。今回、WHD と診断された牛において、I 型の絶対不妊症と II 型および III 型の受胎例について、臨床内分泌学および病理学組織的に検討した。

試験 1：子宮の不完全形成と膣弁遺残を合併した WHD I 型の 1 例

1-1. 材料と方法

症例は 14 カ月齢のホルスタイン雌で無発情の病歴であった。発育は良好で外陰部の大きさは正常であったが、膣鏡は膣前庭部の約 10cm までしか挿入できなかった。直腸検査で子宮頸管はやや肥大し、内部感を認めたが、ひだ様構造は確認できず、さらに左子宮角は非常に小さく、右子宮角は触知できなかった。そこで 7.5MHz のリニア型探触子を装着した携帯型超音波装置（SonoSite® 180 Plus, SonoSite, WA, USA）を用いて経直腸超音波検査を実施した。

1-2. 結果

膣検査では、膣前庭部に直径 1 cm 程度の孔 1 カ所を持つ閉鎖性の膣弁を認めた。さらに経直

腸超音波検査で膈部の2カ所に隔離された膈弁を認めた。膈内は3つに仕切られ、エコージェニックな分泌液が貯留しており、これを超音波ガイド下で穿刺・吸引したところ、白濁粘液 30ml を回収した。また、卵巣の大きさは、右卵巣が30×35mm、左卵巣が25×28mm と正常様であり、右卵巣に17mmの主席卵胞と8mmの内腔をもつ直径22×20mmの囊腫様黄体が確認された。

1-3. 考察

症例は両子宮角の欠損と膈弁遺残を合併したI・Ⅲ混合型 WHD であり、絶対不妊症のため肥育転用となった。I型では両子宮角が欠損しているため絶対不妊症であるが、卵巣は正常に発育し、直腸検査において卵巣の触診のみでは見逃してしまう可能性がある。

未経産牛の臨床検査では卵巣所見のみならず、子宮角や子宮頸管の触診や膈検査も含めて検診する必要がある。

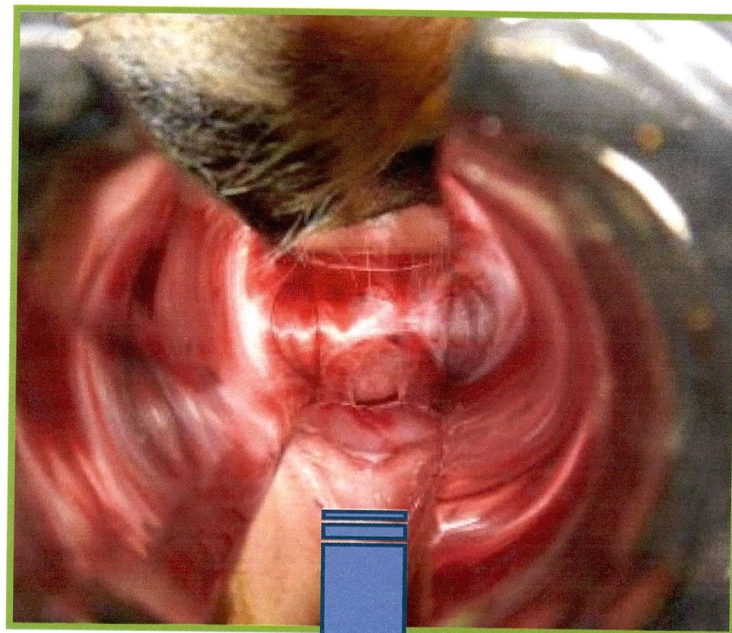


症例の外観



図2-1. 腔鏡挿入時の様子

腔検査



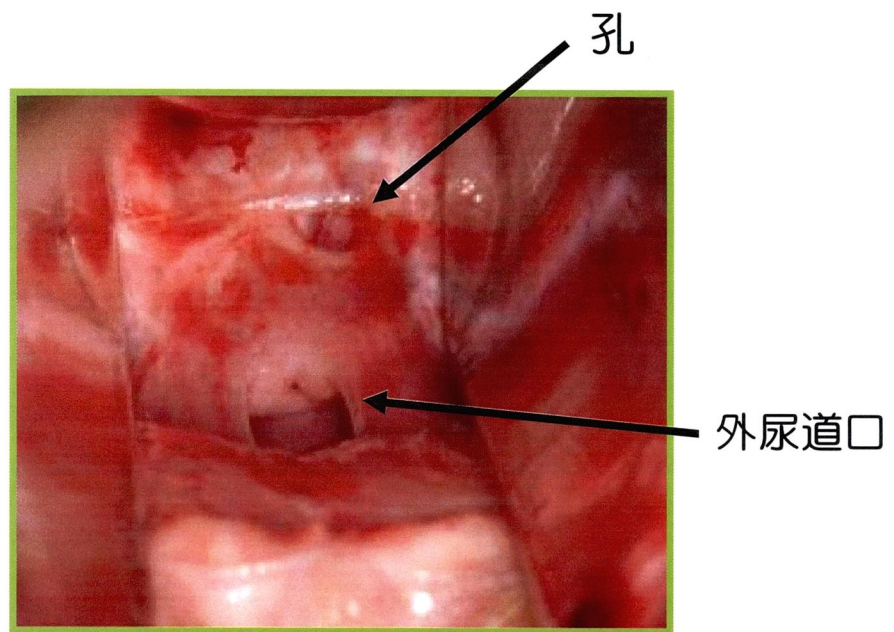


図2-2. 孔一か所を持つ膀胱

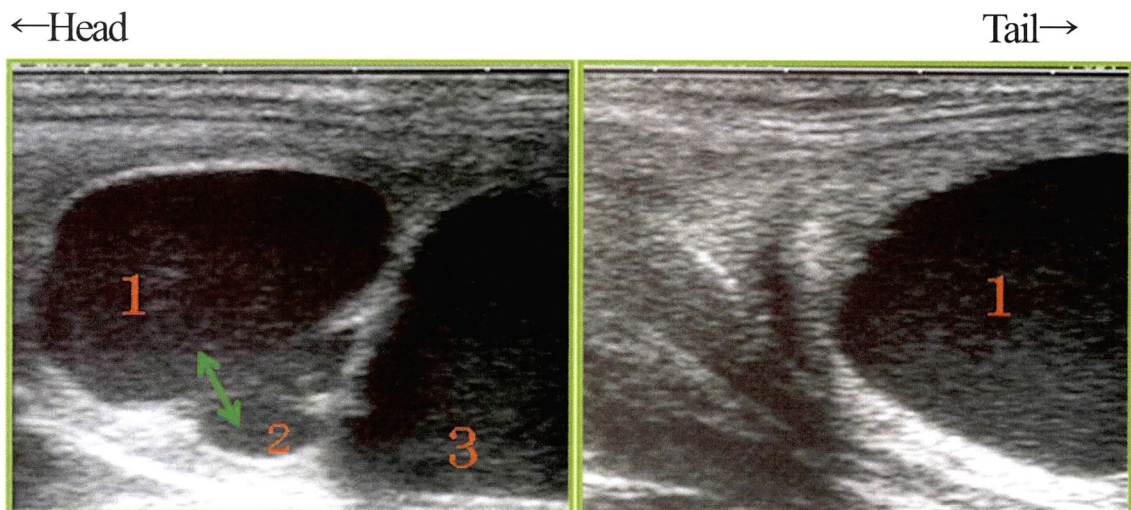


図2-3. 膀胱は膀胱により3つに仕切られており、1と2は交流がある(左)。内部にはエコージェニックな分泌液で満たされている。

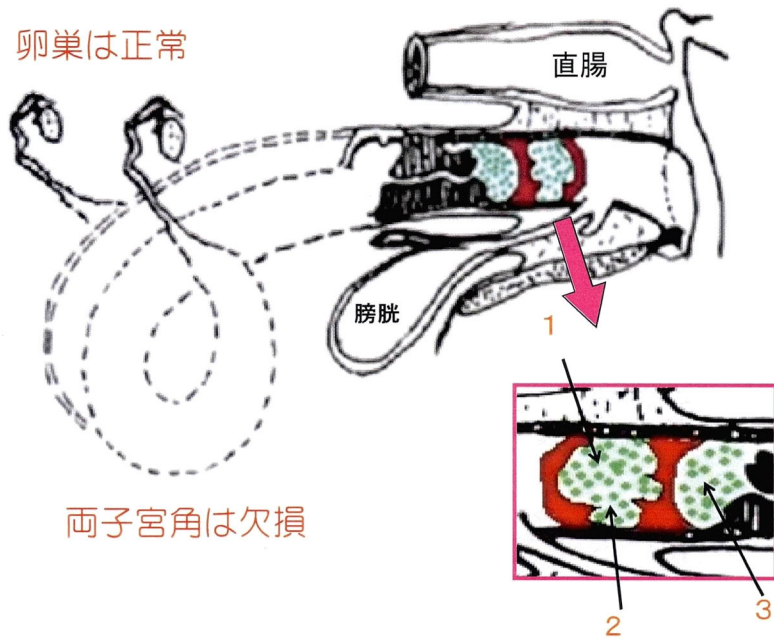
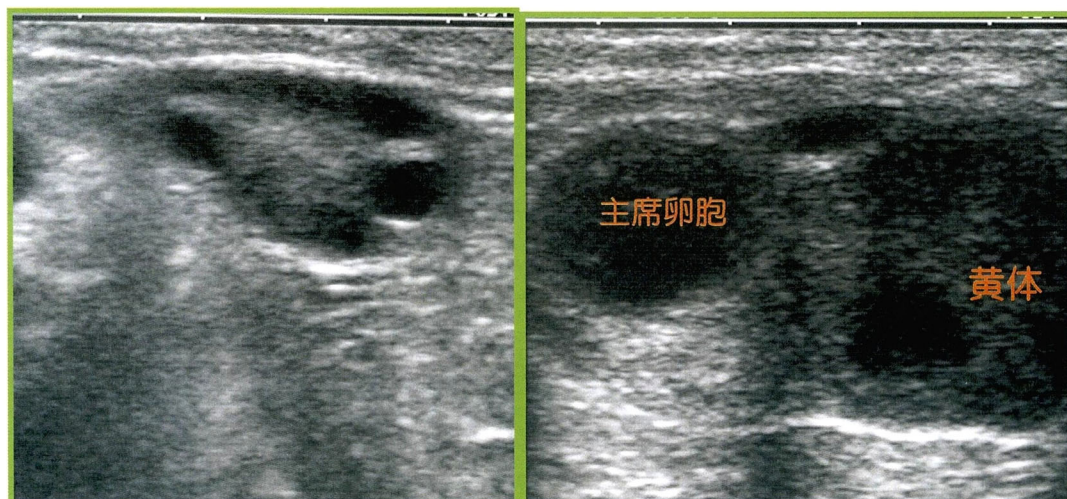


図2-4. 症例の生殖器の模式図



腔内に貯留していた白濁の分泌液 (約30ml)

卵巢所見



左卵巢

右卵巢

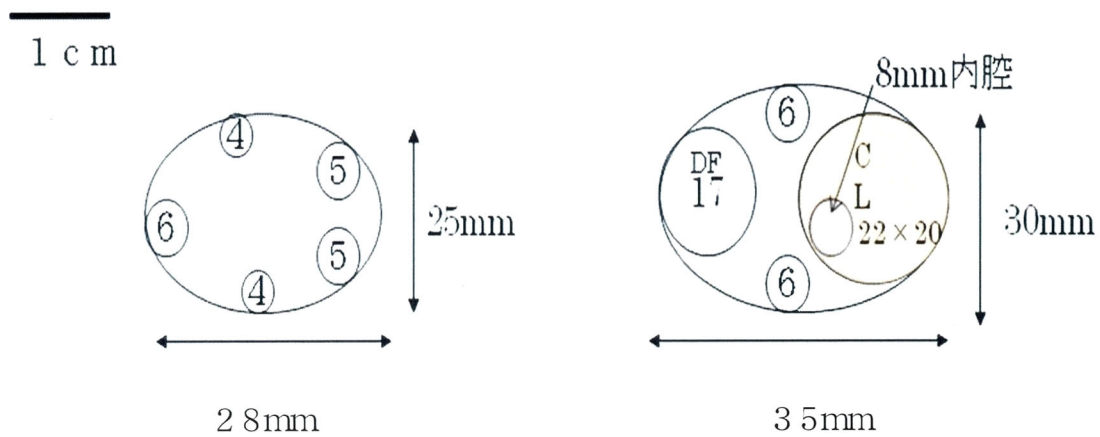


図2-5. 症例の卵巢所見

試験 2：形態学的に 3 分類した WHD の臨床経過

2-1. 材料と方法

2002～2008 年に宮崎県、熊本県、鹿児島県、および北海道において、経直腸超音波検査で WHD と診断されたホルスタイン雌牛 18 頭について形態学的に 3 分類した。さらにⅡ型と診断された症例について臨床経過を追跡調査した。

2-2. 結果

WHD と診断された 18 頭の形態学的な分類は、Ⅰ・Ⅲ混合型が 2 頭、Ⅱ型が 15 頭、Ⅲ型が 1 頭でありⅠ型のみ症例はなかった。Ⅱ型に分類された 15 頭すべてが繁殖に供用されており、その内訳は人工授精が 10 頭、胚移植が 5 頭であった。その後、15 頭中 6 頭は不受胎により廃用となった。

i) 分娩月齢

今回供試した WHD 牛と一般牛の分娩月齢を比較した。なお、一般牛の分娩月齢は、平成 17 年度宮崎県牛群検定情報を基に設定した。初回人工授の授精月齢は一般牛が 16.3 カ月齢、WHD 牛が 15.3 カ月齢でほぼ同等であり、初産月齢は一般牛が 25.8 カ月齢、WHD 牛では 27.2 カ月齢であった。しかし、産次が進むにつれて分娩月齢が延長し、2 産時月齢は一般牛の 41.5 カ月齢に対し、WHD 牛は 44.4 カ月齢であった。さらに 3 産時月齢は一般牛が 57.3 カ月齢であるのに対し、WHD 牛では 61.5 カ月齢となり、その差は 4.2 カ月で、人工授精回数に換算すると約 6 回分延長している結果となった。

Ⅱ型(15頭)の臨床経過

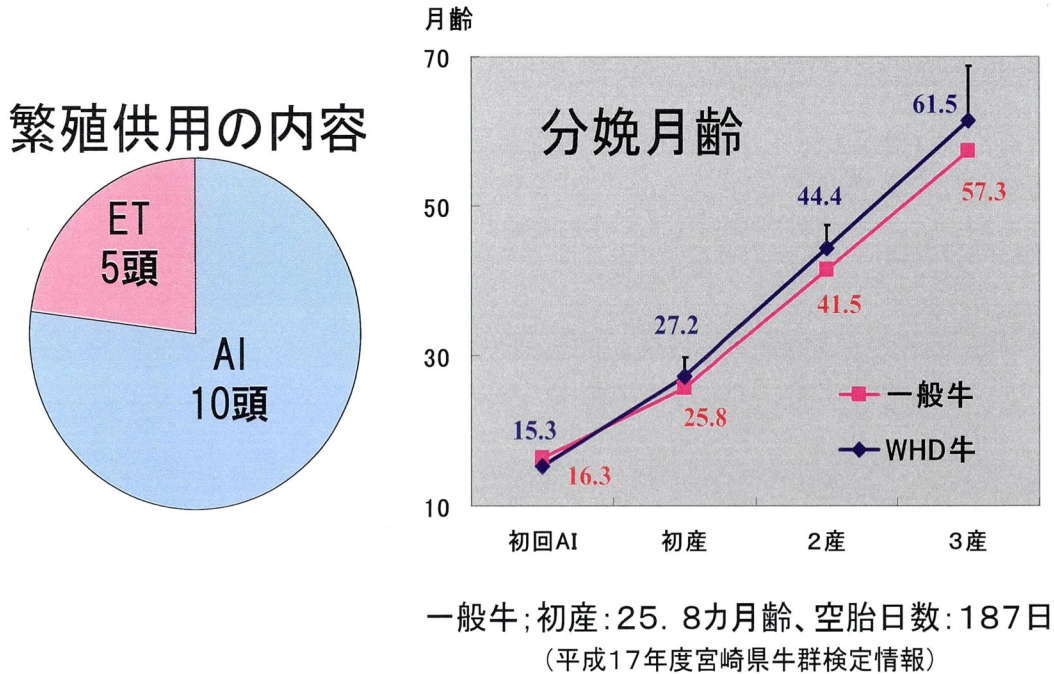


図2-6. Ⅱ型(15頭)の繁殖状況(左)と分娩月齢の推移(右)

ii) 人工授精による受胎例 (症例1)

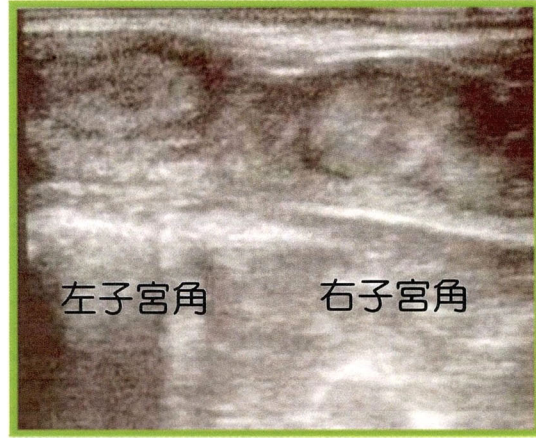
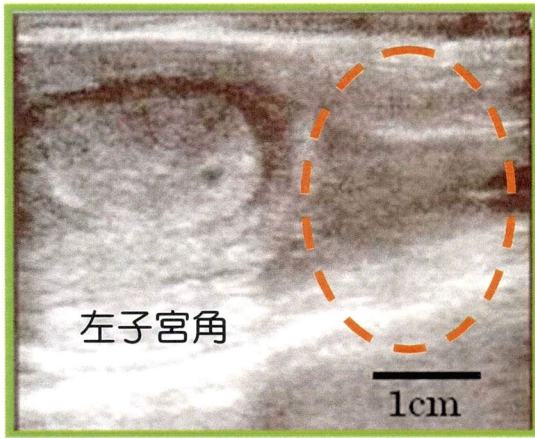
症例1は2.8歳齢の初産ホルスタイン雌で、初産時は雄牛との自然交配で受胎し、正常子牛を分娩した。分娩後、発情時に2度人工授精を実施したが、不受胎であった。その後、経直腸超音波検査により右子宮角が欠損していることが判明した。欠損側の右子宮角は、基始部から約5cmが索状に発育不全を示し、その先端は盲端となっており分泌液で満たされていた。4カ月後、発情時に左卵巢の卵胞に対して人工授精を実施し、受胎した。

iii) 胚移植による受胎例 (症例2)

症例2は生後18カ月齢の未経産ホルスタイン雌で、発育や外陰部の大きさは正常であった。膣検査時に膣弁の存在を認めたが、膣鏡の挿入で容易に破れた。発情時に3度の人工授精を実施したが不受胎であった。人工授精を実施した際、発情周期は26日、28日および33日と通常よりも延長していた。直腸検査および経直腸超音波検査により、右子宮角の欠損を確認した。右卵巢に直径16mmの主席卵胞が存在した発情日から7日後に、正常な左子宮角に凍結胚を移植した。胚移植から42日後、経直腸超音波検査によって右卵巢に直径22mmの黄体と、左子宮角に羊水中に浮遊する30×12mmの生存した胚を描出し、受胎を確認した。その後、275日の妊娠期間を経て正常子牛を分娩した。



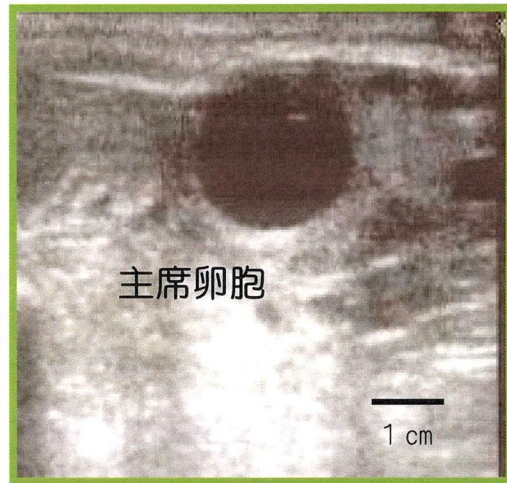
症例2の外観



症例 2 (右子宮角欠損)

正常牛 (対照)

図 2 - 7. 症例 2 の外観と子宮の超音波画像



左卵巣

右卵巣

図 2 - 8. 症例 2 の卵巣所見

2-3. 考察

WHD のⅡ型と診断された 15 症例は全て繁殖に供用されたが、その分娩間隔は正常牛に比べ延長する傾向にあった。一側子宮角のみを持つⅡ型では、残存子宮角側の卵巣に主席卵胞が形成された場合は、通常的人工授精や胚移植を実施できる。一方、欠損子宮側の卵巣に主席卵胞が形成された場合は、排卵後に形成された黄体を活かし、胚移植を実施する事で受胎の機会を得られる。症例 2 は右子宮角が欠損しており、黄体は右卵巣に存在したが、左子宮角で妊娠を維持し、分娩にまで至った。めん羊での報告では、非妊娠時、子宮内膜にオキシトシンレセプターが発現することで、アラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) が活性化される。そして、黄体退行因子であるプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) が合成され、黄体が退行する(Hafez ESE et al;2000, Guzeloglu A et al; 2004, Oelschlaeger A et al; 1981, Pineda MH et al; 2003, Spencer TE et al; 2004)。左子宮角欠損のホルスタイン種雌牛の卵巣所見を追跡調査した論文によると、欠損子宮角側の左卵巣に形成された黄体は縮小しながらも 20 週間左卵巣に存在し続け、その間に形成された卵胞は排卵することなく退行した (Warfield SJ et al;1986)。母畜で妊娠が認識されると、受胎から 10 日目より 21~25 日まで受胎産物 (胚や胎子、さらに関連する余剰胚膜) の単核細胞と栄養外胚葉からインターフェロン τ (IFN- τ) が合成、分泌される(Oelschlaeger A et al; 1981)。IFN- τ は胚などの受胎産物から分泌される唯一の子宮内膜における黄体退行阻害因子であり、その分泌量は受胎後 14~16 日目で最大となる (Hafez ESE et al;2000)。IFN- τ は、子宮内膜におけるエストロゲンレセプター α (ER α) 遺伝子の転写とオキシトシンレセプター遺伝子の発現を直接的に抑制し、黄体からのプロジェステロンの分泌を維持する(Hafez ESE et al;2000, Oelschlaeger A et al; 1981, Spencer TE et al; 2004)。発現するオキシトシンレセプター数の減少と黄体に対するオキシトシンの作用が低下する結果、PGF $_{2\alpha}$ のパルス状の分泌レベ

ルは低く抑えられる。症例 2 では、右子宮角が欠損しているため、子宮内膜から $\text{PGF}_{2\alpha}$ の産生がなく、右卵巢に存在する黄体が退行せず、さらに左子宮角からの胚由来 $\text{IFN-}\tau$ の産生も反対側の子宮角での妊娠維持に寄与したと推測された。

症例 2 は、右子宮角欠損と膣弁遺残を合併したⅡ・Ⅲ混合型 WHD で、左子宮角への胚移植により反対側卵巢の黄体形成でも妊娠した。臨床的に、WHD の発生は少なくないと推測されるが、その病態は様々であり、一角子宮のⅡ型では、残存した正常子宮角への人工授精や胚移植により繁殖への供用が可能であった。

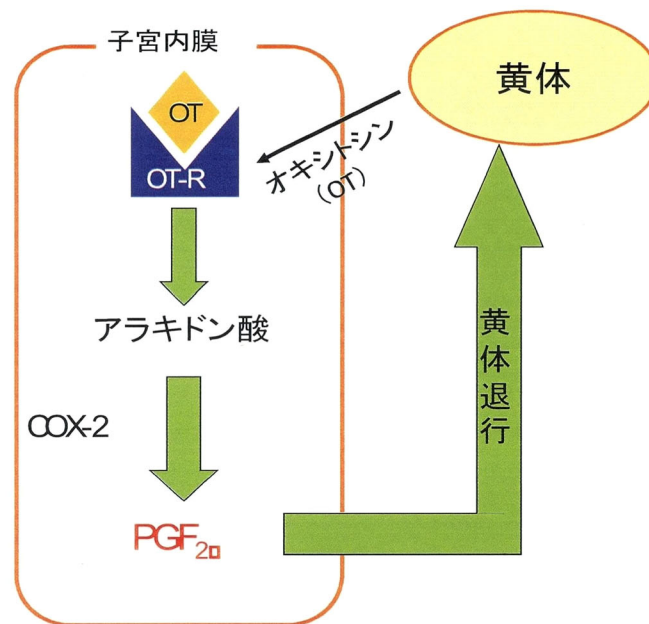
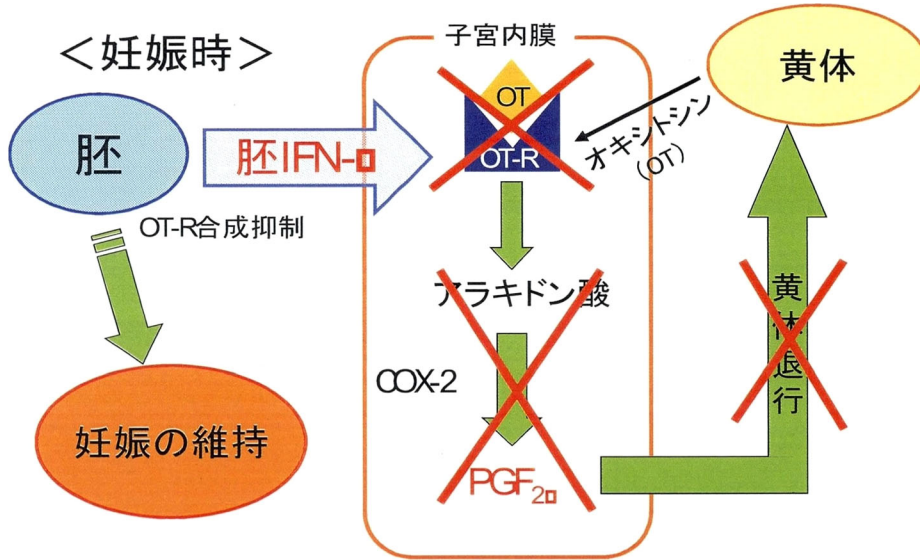
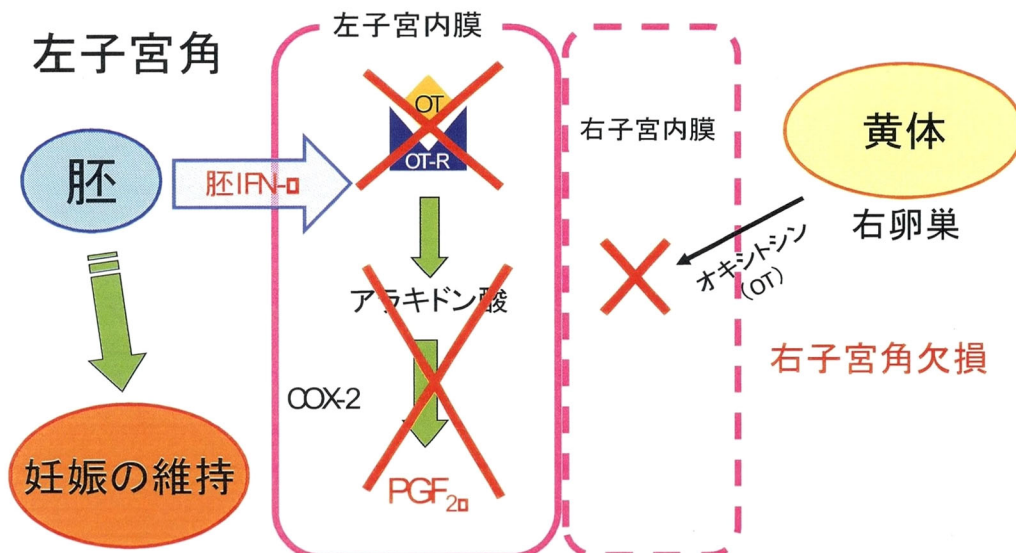


図. 発情周期 15~17 日目の子宮内膜のホルモン分泌。非妊娠時にはアラキドン酸カスケードを介して $\text{PGF}_{2\alpha}$ が合成・分泌され、黄体が退行する。

子宮内膜における妊娠成立機構



本症例の妊娠成立機構



第3章 間性

内分泌学および病理組織学的に異なる病態を示す牛 雄性仮性半陰陽の2症例

3-1. 研究の背景

仮性半陰陽はヒトを含む様々な動物種で報告されており、臨床的に牛での発生は珍しくないが、淘汰対象になる場合が多いため、獣医学分野における詳細な報告は少ない。本研究では、牛雄性仮性半陰陽と診断された2症例について、超音波診断装置を用いた生前の生殖器検査を行い、また正常な雌雄子牛を対照として内分泌学的検査や性染色体検査、並びに解体後の病理組織学的検査を実施し、生前から解体後までの一連の病態解明を試みた。

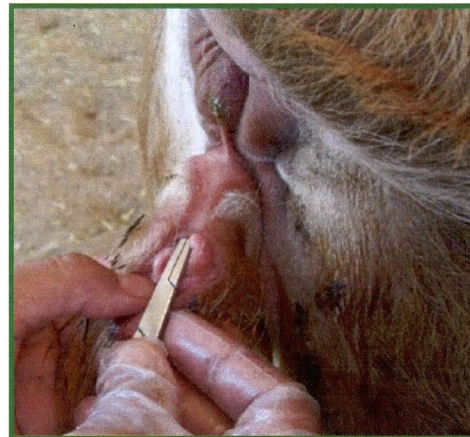
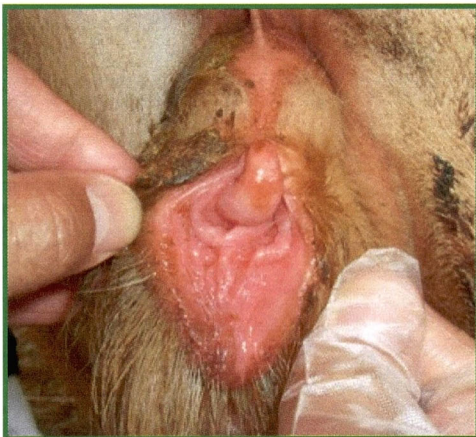
3-2. 材料と方法

症例1

生後10カ月齢の褐毛和種で、出生時には雄子牛との双子であった。外部生殖器は雌様であったため、飼主はフリーマーチンとの認識で飼養していたが、月齢の経過とともに症例の体型が雄性化してきた。また、排尿時には尿を斜め上方へ排出していた。外陰部検査では、肛門下約10cmのところに腔とは異なる深さ1cm程度の開口部があり、直腸検査では骨盤腔内に子宮や卵巣と思われる構造物は触診できなかった。一方、7.5MHzのリニア型単触子を装着した携帯型超音波装置（SonoSite®180 Plus, SonoSite, WA, USA）を用いた経直腸超音波検査において、肛門下に4×3cmのねじり棒状の構造物が画像化された。



図 3-1. 症例 1 の外貌と排尿時の様子



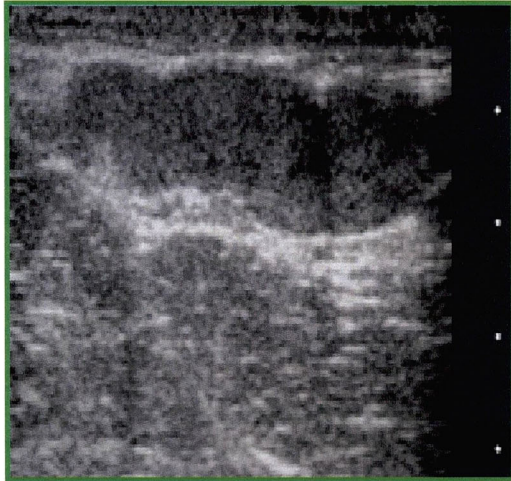


図3-2.
肛門下の開口部(左上)
深さ約1cm(右上)
ねじり棒状構造物の超音波画像(左)

症例 2

生後 18 カ月齢の黒毛和種で、発育は良好だが、生来無発情であった。外部生殖器は雌に類似し、外陰部検査で膣長は 13cm であった。また、直腸検査では骨盤腔内に子宮や卵巣と思われる構造物は触診できなかった。一方、経直腸超音波検査において縦隔構造を持つ 1 対の精巣様構造物(5×3cm)が描出された。



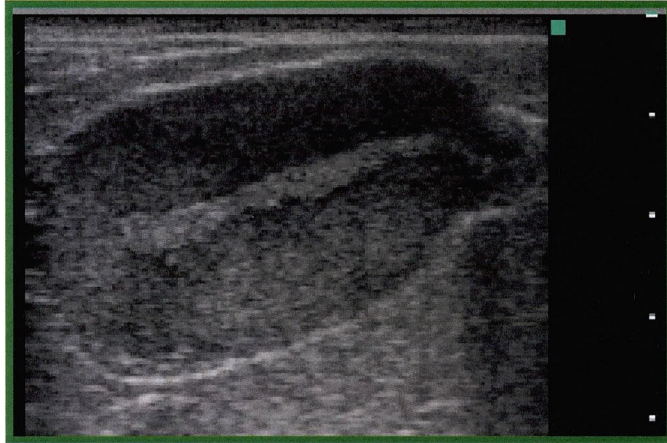


図 3-3. 症例 2 の外貌と精巣様構造物の (5×3cm) の超音波画像

i) hCG 負荷試験

症例における血中性ステロイドホルモンの産生性を調べる目的で、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG ; プベローゲン[®]三共、東京) 3000 I U を筋肉内に投与した。hCG 投与日を 0 日(d0)とし、5 日目(d5)および 7 日目(d7)に頸静脈よりヘパリン加血として採取した。採取した血液は冷却遠心分離機にて 3000 回転、15 分間で血漿を分離し、血中性ホルモン濃度の測定まで -20℃ で保存した。なお、症例 1 および 2 の対照として、6 カ月齢の黒毛和種雄子牛 (以下、正常雄) 4 頭と 10 カ月齢の黒毛和種雌子牛 (以下、正常雌) 4 頭を供試し、同様の負荷試験を行った。

iv) Y 染色体特異的 DNA の検出

Y 染色体特異的 DNA の検出には牛胚性判別試薬キット (Loopamp[®]、栄研化学、東京) を用い、loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法にて検出した。測定では、サンプルを *Bst*DNA ポリメラーゼを含む溶液に添加・反応させ、濁度計が 0.2 目盛に達するまで溶液が白濁した場合を陽性とした。さらに、症例 2 では、PCR 法にて Y 染色体の *SRY* 領域を検出した。*SRY* 領域である 480bp を増幅させるためのプライマーは 5' -CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC-3' upstream および 5' -GCACAAGAAAGTCCAGGCTCTAAGC-3' downstream を用いた。PCR 法は 0.2mL のマイクロチューブを用いて、5 μ l のサンプルを 15 μ l の反応液と 2 μ M のプライマーに添加した。95 $^{\circ}$ C、1.5 分でのアクチベーション後、増幅は 94 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒間、57 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒間、および 72 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒間を 40 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C \cdot 5 分間伸長して終了した。PCR 後、3%TAE アガロースゲルを用いた電気泳動にて特有のバンドを確認した。

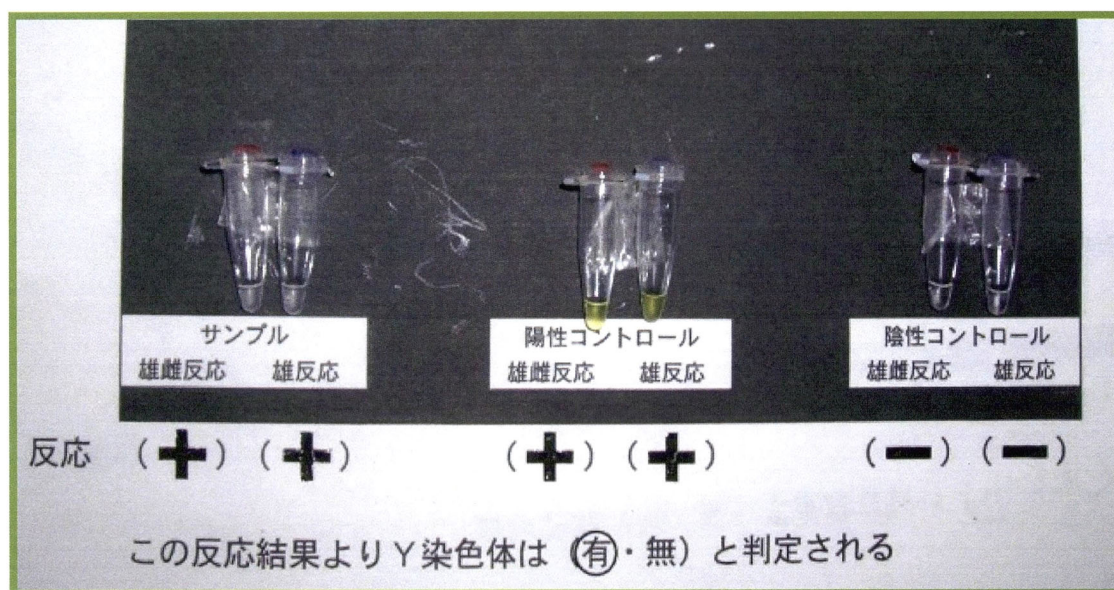


図 3-5. LAMP 法による Y 染色体特異的 DNA の検出

v) 病理組織学的検査

症例 1 は 12 カ月齢で安楽殺後、病理解剖を行い、症例 2 は 24 カ月齢まで肥育飼養後、食肉センターにて解体した。両症例の尿生殖器を回収後、それぞれの組織は 10%ホルマリンにて固定し、4 μ m で薄切後、ヘマトキシリン・エオジンで染色し、観察した。

vi) 統計処理

収集されたデータの統計処理には、反復測定による分散分析法を用いた。hCG 負荷試験における性ホルモン濃度の牛群間の比較は、d0、d5 および d7 でそれぞれ行い、統計処理はスチューデントの *t* 検定を用いた。また、2 症例の XX または XY 染色体、および *SRY* 遺伝子の検出における正常子牛との比較には、Fisher の直接確立検定 (Fisher's exact probability test) を用いた。

3-3. 結果

i) 血中性ホルモン濃度

症例 1 の血中 T 濃度は、8.9ng/ml (d0)、11.0ng/ml (d5) および 11.3ng/ml (d7) と hCG 投与前から高い値で推移し、hCG 投与による反応はみられなかった。一方、症例 2 の血中 T 濃度は d0 から d7 まで 0.4ng/ml 以下で推移した。また、血中 P₄ 濃度は、両症例ともに d0 から d7 まで 0.5ng/ml 以下であった。対照である正常雄子牛(n=4)の血中 T 濃度は、d0 が 14.5 ± 4.3 ng/ml、d5 が 54.7 ± 3.3 ng/ml、

ならびに d7 が $32.4 \pm 8.2 \text{ ng/ml}$ であり、hCG 投与後一過性の上昇を示したが、血中 P₄ 濃度は 0.5 ng/ml 以下であった。また、正常雌子牛(n=4)の血中 T 濃度は、d0 から d7 まで 0.4 ng/ml 以下であり、血中 P₄ 濃度は d0 が $4.8 \pm 2.4 \text{ ng/ml}$ 、d5 が $11.6 \pm 3.5 \text{ ng/ml}$ 、ならびに d7 が $10.6 \pm 3.0 \text{ ng/ml}$ (d7) と高い値で推移した ($P < 0.01$)。

表 3-1. hCG 負荷試験による血中テストステロン濃度(ng/ml).

| | D0 | D5 | D7 |
|----------|----------------|----------------|----------------|
| 症例1 | 8.9 | 11 | 11.3 |
| 症例2 | <0.4 | <0.4 | <0.4 |
| 正常雄(n=4) | 14.5 ± 4.3 | 54.7 ± 3.3 | 32.4 ± 8.2 |
| 正常雌(n=4) | <0.4 | <0.4 | <0.4 |

表 3-2. 血中プロジェステロン濃度(ng/ml).

| | D0 | D5 | D7 |
|----------|---------------|----------------|----------------|
| 症例1 | <0.5 | <0.5 | <0.5 |
| 症例2 | <0.5 | <0.5 | <0.5 |
| 正常雄(n=4) | <0.5 | <0.5 | <0.5 |
| 正常雌(n=4) | 4.8 ± 2.4 | 11.6 ± 3.5 | 10.6 ± 3.0 |

ii) 性染色体分析

症例1の性染色体はXX/XYキメラを示し、その比は31:19であった。一方、症例2の性染色体は全てXYの雄型を示した。また、LAMP法によるY染色体特異的DNAは症例1、2ともに陽性であり、さらに症例2ではSRY領域が確認された。

表 3-3.性染色体と Y 染色体特異的 DNA

| | 性染色体(XX:XY比) | Y染色体特異的DNA |
|----------|--------------|------------|
| 症例1 | XX/XY(31:19) | 陽性 |
| 症例2 | XY(0:50) | 陽性 |
| 正常雄(n=4) | XY(0:50) | 陽性 |
| 正常雌(n=4) | XX(50:0) | 陰性 |

iii) 病理所見および組織像

症例1では、骨盤腔内に精巣上体を持つ一対の矮小な精巣（重量 17g、18g）、精管および精嚢腺が存在し、肛門下にねじり棒状の陰茎（4×3cm）が認められた。症例2では、骨盤腔内に一対の矮小な精巣（重量 35g、37g）が存在したが、精巣上体と精嚢腺は存在しなかった。また精管とは別に左精巣につながる 2 本

の未分化な生殖管が認められたが、途中で盲端となり消失していた。これらの生殖管は1～数層の上皮細胞で構成されており、ミューラー管様を示していると思われた。症例1と2の精巣組織像は類似しており、小型の精細管が存在し、精細管間質ではライディヒ細胞が代償性に増加していた。また、精細管においてセルトリ細胞は正常に保持されていたが、精粗細胞や精子形成は認められなかった。

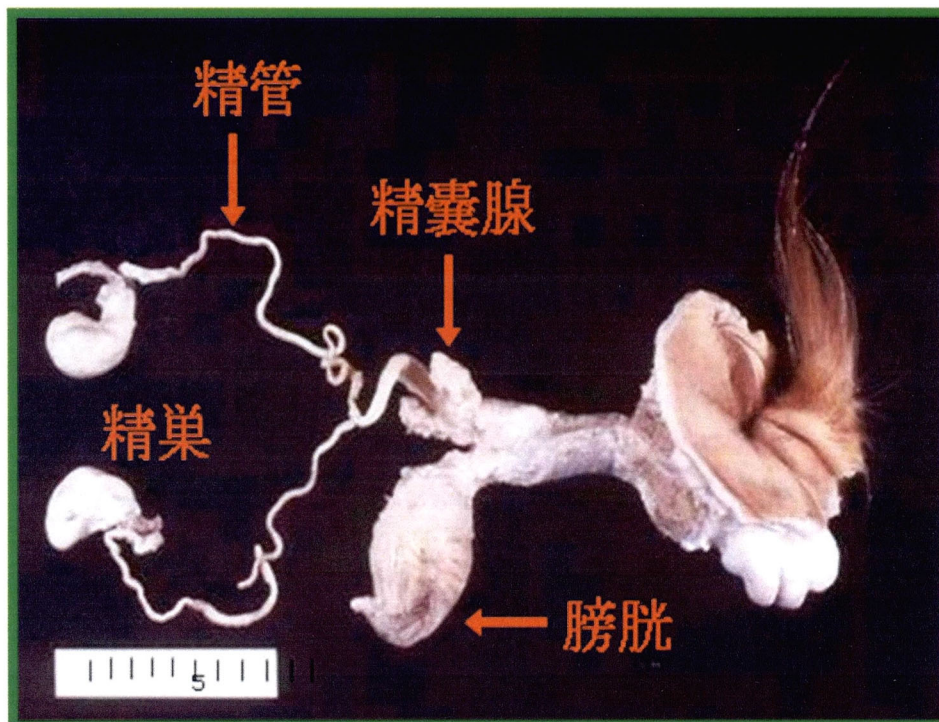


図3-6. 症例1の尿生殖器の病理解剖写真

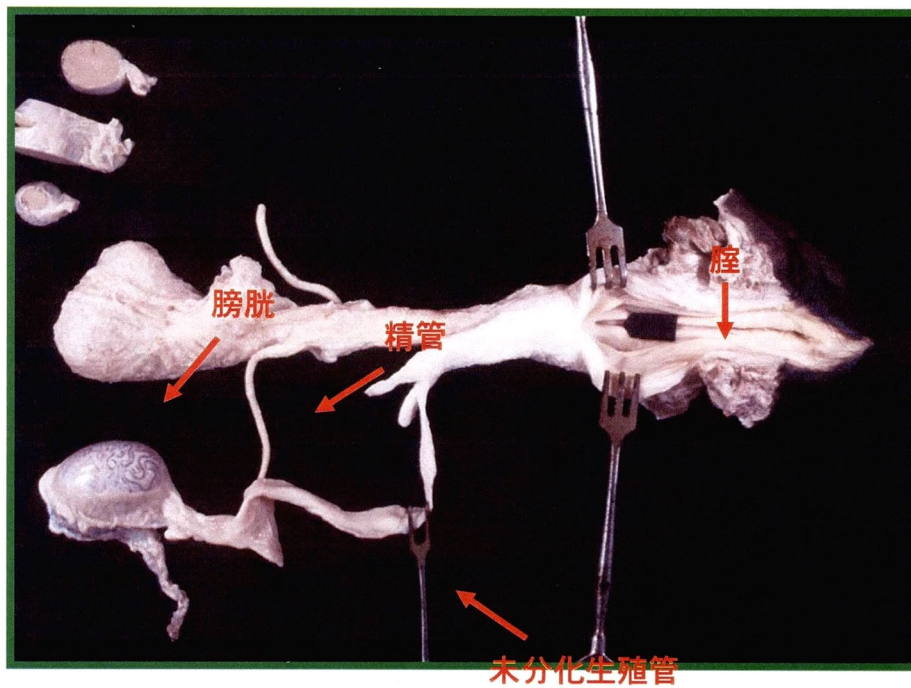


図 3-7. **精巢** 2 の尿生殖器の病理解剖写真

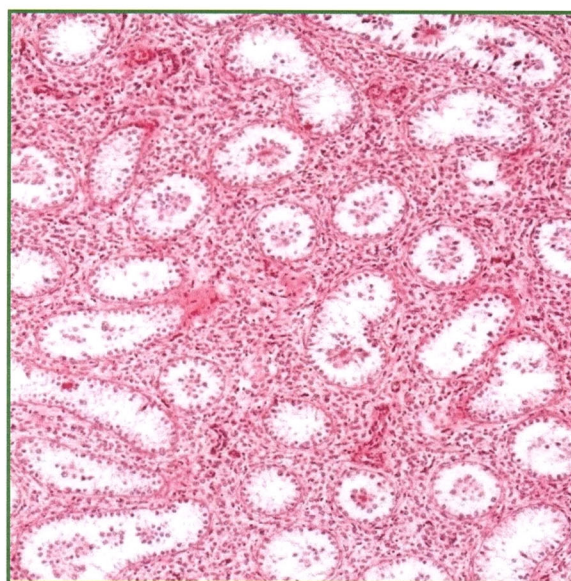


図 3-8. 症例 1 の精巢組織像

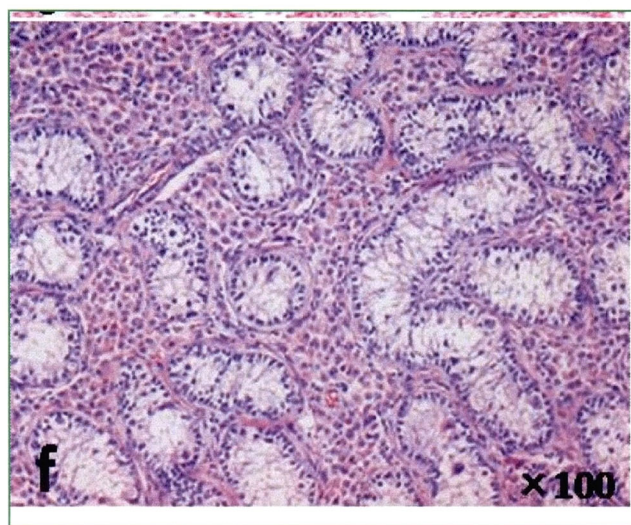


図3－9．症例2の精巣組織像

3-4. 考察

症例1および2は、外観は雌様だが、体内に精巣を持つことで、雄性仮性半陰陽と診断された。通常の臨床検査において、臨床現場での膣長の測定は雌の生殖器異常を診断する上で有効である。正常な雌牛の膣長は、通常30cm以上であるが、フリーマーチンなどのような間性の子牛の膣長は通常15cm以下である(Cavaliere J et al; 1999, Padula A. M; 2005)。

牛雄性仮性半陰陽において、精巣からのテストステロン産生は通常正常であるが、細胞内ではアンドロゲン感受性が低下しているため、中腎管周辺の発達に障害が出るとと思われる(Steenholdt C.W; 2007)。hCGの投与により、ライディヒ細胞からのテストステロン放出が刺激されることが知られている(Padula A. M; 2005, Sundby A et al; 1975, Sundby A et al; 1983, Takagi M et al; 2005)。今回、症例1、2ともに矮小な精巣が存在し、ライディヒ細胞の増生が認められたが、症例1ではhCG投与に関係なくd0から高いテストステロン産生がみられ、

一方症例 2 では正常雌と同等レベルの低値で推移した。この理由は明確ではないが、ステロイドホルモンに対するレセプター感受性の低下などが関与している可能性が考えられた。

家畜の性染色体分析において、PCR 法による Y 染色体特異的 DNA の検出はよく用いられる検査法である(Daneau I et al; 1995, Hirayama H et al; 2007)。症例 1 では雄子牛との双胎でありながら性染色体が XX/XY キメラであった。この理由として、症例は妊娠初期に雌胚・胎子を含む 3 つ子であり、雌胚・胎子が途中で死滅した可能性が推察された。3 つ子の場合、全頭が生存して生まれる確率は非常に低く、0.6% 以下であるという報告がある(Padula A. M; 2005)。

正常雄では、Y 染色体関連の *SRY* 遺伝子の発現は雄の性分化に関与する(Cheng H et al; 2001, Payan-Carreira R et al; 2008)。一方、XY female 症の場合、*SRY* 遺伝子の変異が確認されている(Just W et al; 1994, Kawakura K et al; 1996, Kawakura K et al; 1997, Veitia RA et al; 2001)。今回、症例 2 は雌様の外部生殖器を持ち、性染色体は全て XY の雄型であったため、当初 XY female 症を疑ったが、精巣の存在と *SRY* 遺伝子が検出されたことによりその可能性は否定された。

第 4 章

繁殖性を持つ牛の異性多胎の症例

4-1. 研究の背景

牛の異性多胎では、通常性染色体は XX/XY のキメラを示し、雌子牛の 90% 以上は性腺の分化が起こらないフリーマーチンで不妊症となる (Marcum JB;1974)。今回、異性双子でありながら膣長が正常であるホルスタイン種未経産牛 3 例に対して、性染色体検査と卵巢負荷試験を実施し、内分泌学的解析および妊孕性を追跡調査した。

4-2. 材料と方法

症例 1 は 2007 年 3 月に無形無心体とともに娩出され、同年 4 月の性染色体検査で XX/XY キメラと診断されたホルスタイン種雌牛で、生後 30 日目において膣長は 18cm で正常雌子牛と同程度であった。

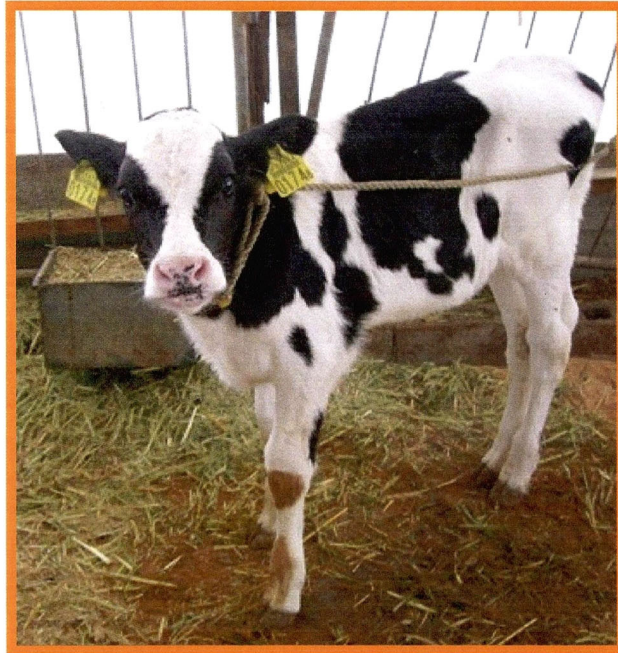


図4-1. 症例1の外観



図4-2.同時に娩出された無形無心体

症例2は2007年8月に雄胎子とともに娩出されたホルスタイン雌牛で、フリーマーチンとの認識で飼養されていた。しかし、2008年8月に膈長が35cmであることが判明し、性染色体検査を実施したところすべてXXの雌型であった。その際、経直腸超音波検査による生殖器の観察で、正常に発育した左右子宮角

と、右卵巢に直径 20mm の開花期黄体が描出された。その後、両症例に対して性腺刺激ホルモン投与による卵巢負荷試験を実施するとともに、LAMP 法による Y 染色体特異的 DNA の分析を行った。

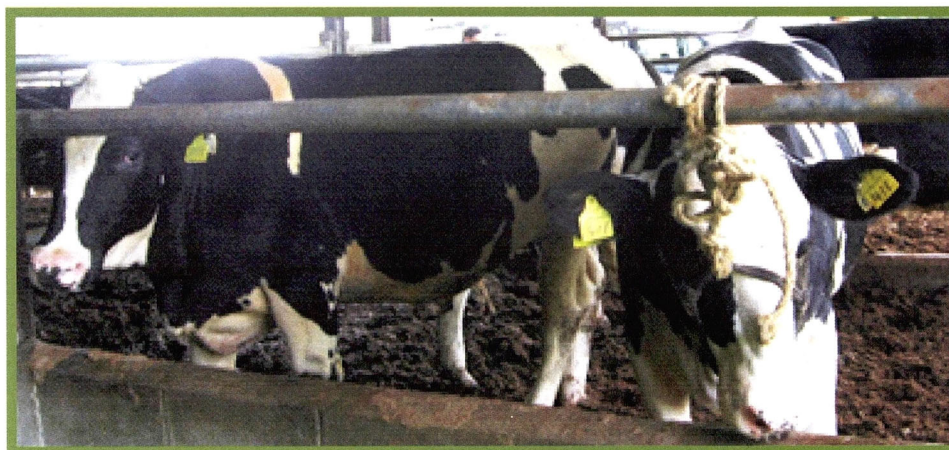
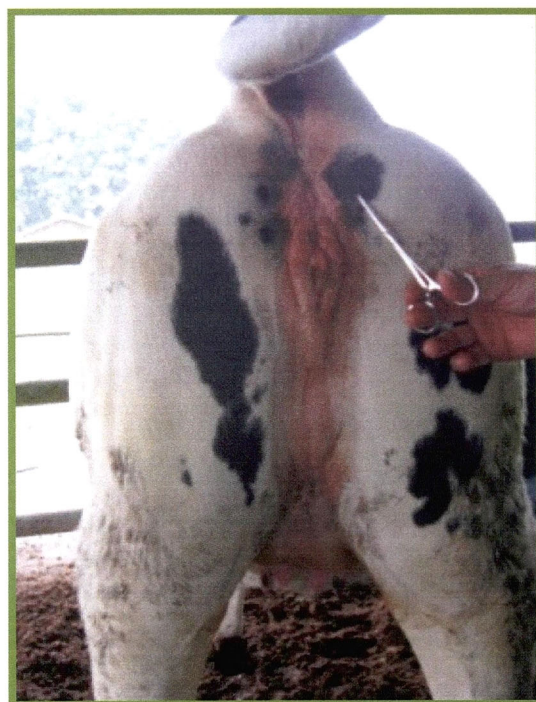
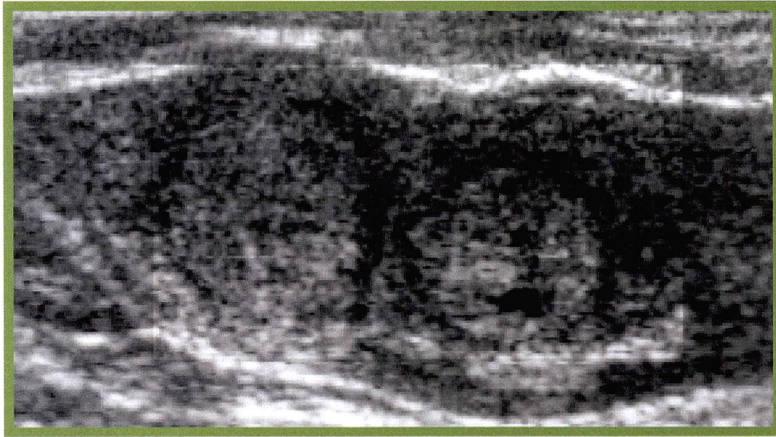


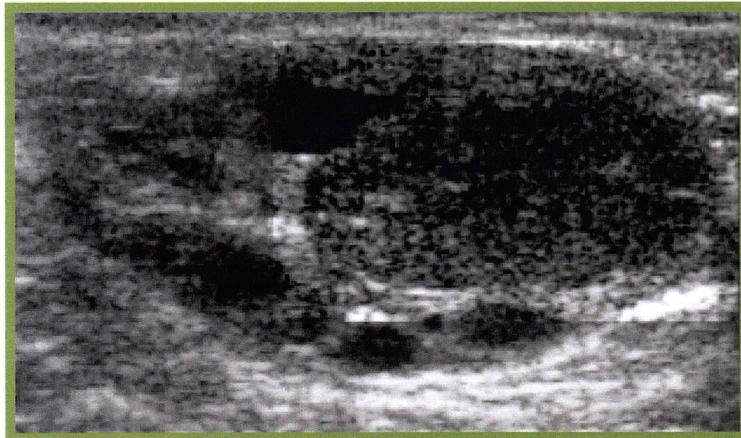
図 4-2. 異性双子(左：雄、右：雌の症例 2)



症例 2 の外陰部



症例2の左右子宮角

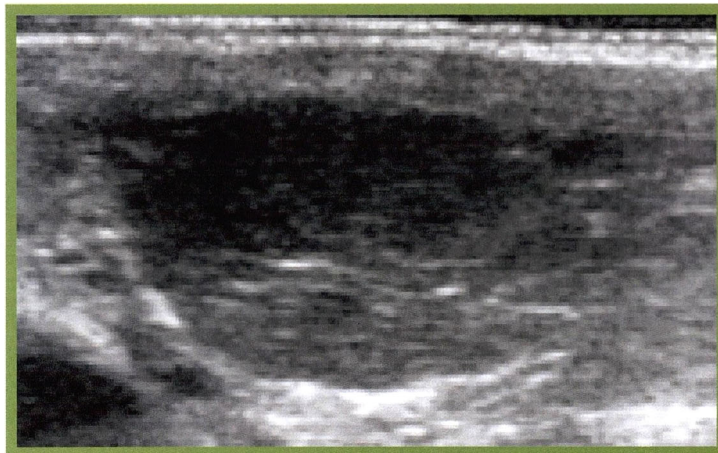


症例2の右卵巣の黄体

症例3は2007年9月に雄胎子（生後直死）とともに娩出されたホルスタイン雌牛で、フリーマーチンとの認識で黒毛和種雄牛と同じパドックで飼養されていたが2008年9月に発情が発現し、その後、同年12月肥育転用前に直腸検査を行ったところ妊娠と診断された。



図 4-4. 症例 3 の外観



左卵巢の妊娠黄体

症例 1 と 2 の卵巢負荷試験は Satoh ら (1997) の方法に従い、負荷試験開始日 (Day0) に妊馬血清性性腺刺激ホルモン (eCG) 1000IU を、Day2 にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 1500IU をそれぞれ筋肉内投与し、Day0、2、6、10 に頸静脈より採血を行い、EIA により血中エストラジオール (E_2) 濃度と血中プロジェステロン (P_4) 濃度を測定した。血中 E_2 濃度は自動免疫蛍光装置 (miniVIDAS®, Japan bioMérieux, Tokyo, Japan) を用い、酵素免疫測定法 (EIA)

法（VIDAS®Testosterone, Japan bioMérieux, Tokyo, Japan）で測定した。また、血中 P₄ 濃度は EIA キット（KMK[®]、川崎三鷹、神奈川）を用いて測定した。2 症例の対照として 4 カ月齢の黒毛和種雌子牛 4 頭（以下、正常雌）と 7 カ月齢の黒毛和種フリーマーチン子牛 3 頭（以下、FM）に同様の卵巢負荷試験を実施した。症例 1 はその後 14 カ月齢にいたるまで無発情であったため、CIDR を 10 日間挿入し、除去 2 日後に発情徴候がみられたため人工授精を実施した。また、症例 2 は 2008 年 10 月に胚移植を実施した。



図 4-5. 卵巢負荷試験のプロトコール

4-3. 結果

卵巢負荷試験における血中 E₂ 濃度は、Day6 において正常雌 (158.4±27.3pg/ml) と症例 1 (86.5pg/ml) で一過性に増加した。また、血中 P₄ 濃度は Day10 において正常雌 (4.8±2.7ng/ml) と症例 2 (7.2ng/ml) で増加した。しかし FM は性腺刺激ホルモン投与に反応せず血中 E₂ (14.9±0.7pg/ml) および P₄ 濃度 (0.5ng/ml 以下) とともに低値で推移した。

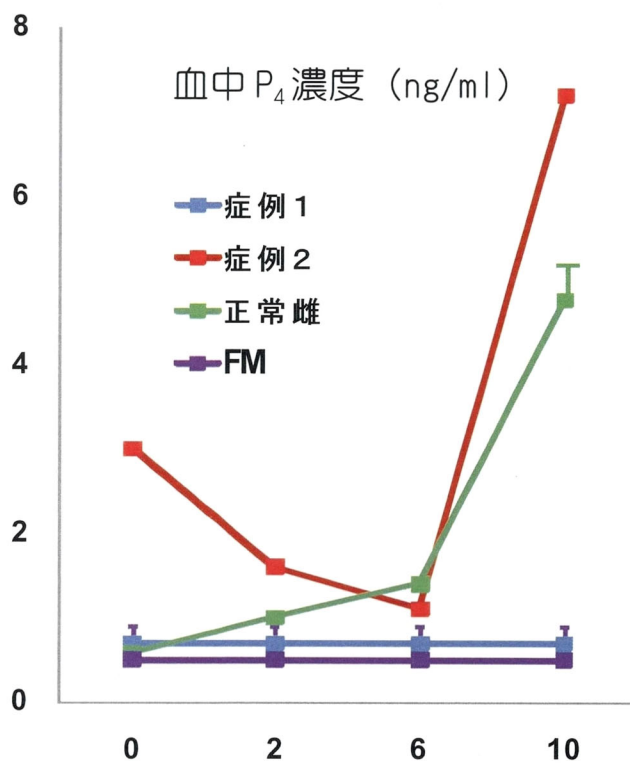
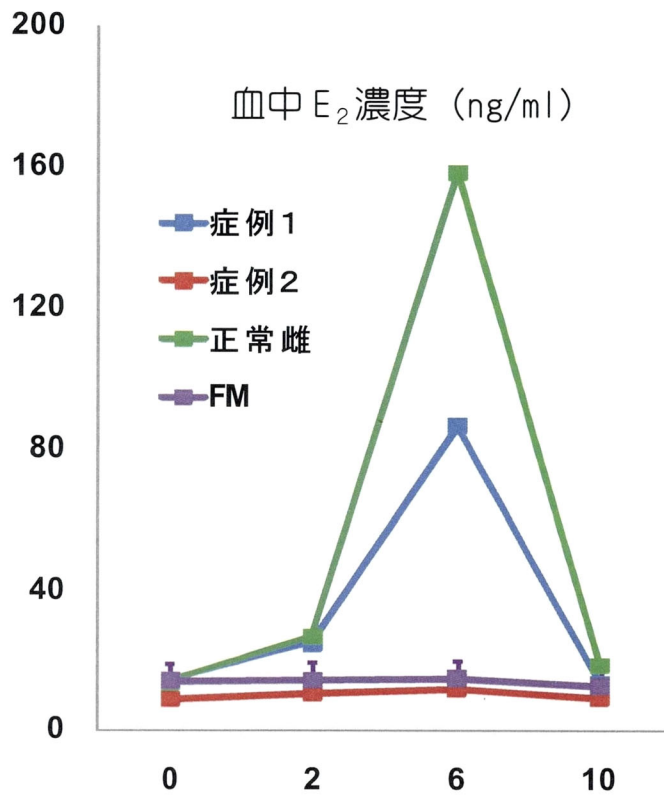


図 4-6. 負荷試験後の血中性ホルモン濃度

症例 1 の膣長の推移は 1 カ月齢 18cm (正常雌 16.6±1.9cm)、4 カ月齢時 23cm (正常雌 21.5±1.7cm)、12 カ月齢 28.7cm (正常雌 25.1±4.8cm) であったが、FM は 10cm 以下で推移した。症例 1 の Y 染色体特異的 DNA の分析は 3 回の検査すべてで陽性となった。

症例 2 は 12 カ月齢で膣長が 35cm で、性染色体はすべて 60、XX の雌型であり Y 染色体特異的 DNA は陰性であった。また、症例 2 と同腹の雄牛の性染色体はすべて 60、XY の雄型であり、Y 染色体特異的 DNA は陽性であった。症例 1 における人工授精後 7 日目の血中 P₄ 濃度は 10ng/ml 以上であり、人工授精後 28 日目に超音波検査にて妊娠鑑定を行い、右卵巢に 20×18mm の妊娠黄体とカラー Doppler で子宮内に 10×8mm の胎子とその心血流を描出し、受胎を確認した。さらに、妊娠 60 日に超音波検査による胎子の性判別を行い、生殖結節が尾の付着部に認められ、雌と判定された。その後妊娠 276 日目に正常分娩でホルスタインの雌子牛を娩出した。

| | 1 カ月齢 | 4 カ月齢 | 12 カ月齢 |
|------|------------|------------|------------|
| 症例 1 | 18cm | 23cm | 28.7cm |
| 症例 2 | — | — | 35cm |
| 症例 3 | — | — | 32cm |
| 正常雌 | 16.6±1.9cm | 21.5±1.7cm | 25.1±4.8cm |
| FM | 7.7±3.7cm | 8.4±1.3cm | (平均±SD) |

表 4-1. 膣長

| | 性染色体比 | Y 染色体特異的 DNA | |
|--------|--------|--------------|----|
| 症例 1 | 2 カ月齢 | XX:XY=77:2 | 陽性 |
| | 12 カ月齢 | XX のみ | 陽性 |
| | 14 カ月齢 | XX:XY=51:2 | 陽性 |
| 症例 2 | XX のみ | 陰性 | |
| (異性双子雄 | XY のみ | 陽性) | |
| 症例 3 | XX のみ | 陰性 | |

表 4-2. 性染色体と Y 染色体特異的 DNA

症例 3 は、脛長が 32cm、Y 染色体特異的 DNA は陰性で、性染色体はすべて 60、XX の雌型であった。また胎子の超音波検査では、体長が 9cm、生殖結節の位置から雄胎子と判定された。

4-4. 考察

胎子性腺の分化は胎齢約 40 日頃までに完了するとされている (Jost A et al;1972)。異性双胎では胎盤絨毛膜血管の吻合により雄胎子の Y 染色体上に存在する H-Y 抗原が雌胎子の性腺の分化を抑制することでフリーマーチンとなる (Lillie F;1917, Ohno S et al;1976)。また、胎生期に雄胎子の精巣のセルトリ細胞から分泌される高濃度の抗ミュラー管ホルモン (AMH) が雌胎子の生殖管の発達を阻害することでフリーマーチンでは短い脛長や子宮の形成不全を引き

起こす (Rota A et al; 2002, Vigier B et al;1984, Vigier B et al; 1987)。症例 1 は性染色体キメラを保有しているにも関わらず膈長が正常で CIDR 除去後の人工授精で受胎した。そのことから、症例 1 では性腺が雌へと分化した胎齢 40 日目以降に雄胎子と胎盤絨毛膜血管が吻合し、そのため性染色体キメラを保有しながら正常な繁殖能を保持していると思われた。これまで、異性双子として生まれた雌牛で、性染色体キメラを有するものの妊孕性を有するものは 4 例報告されているが (Eldridge FE et al; 1977,Smith GS et al;1977,Miyake Y-I et al ; 1980, Miyake Y-I et al;1982, Fujishiro A et al 1994)、人工授精で正常分娩まで至った例はないと思われる。

症例 2 と 3 は異性双子であるにも関わらず膈長が正常で、性染色体キメラを持たず、症例 3 は自然交配で受胎した。この理由として、症例 2 と 3 は妊娠中に雄胎子との胎盤絨毛膜血管の吻合が起こらず、性染色体は雌型を示し、正常な繁殖能を保持していると考えられた。

今後の臨床的な対応として、出生した雌子牛が異性双子でも膈長が正常で卵巣負荷試験に反応する場合は、受胎する可能性があり、獣医師や農家に対する啓蒙が必要と思われる。

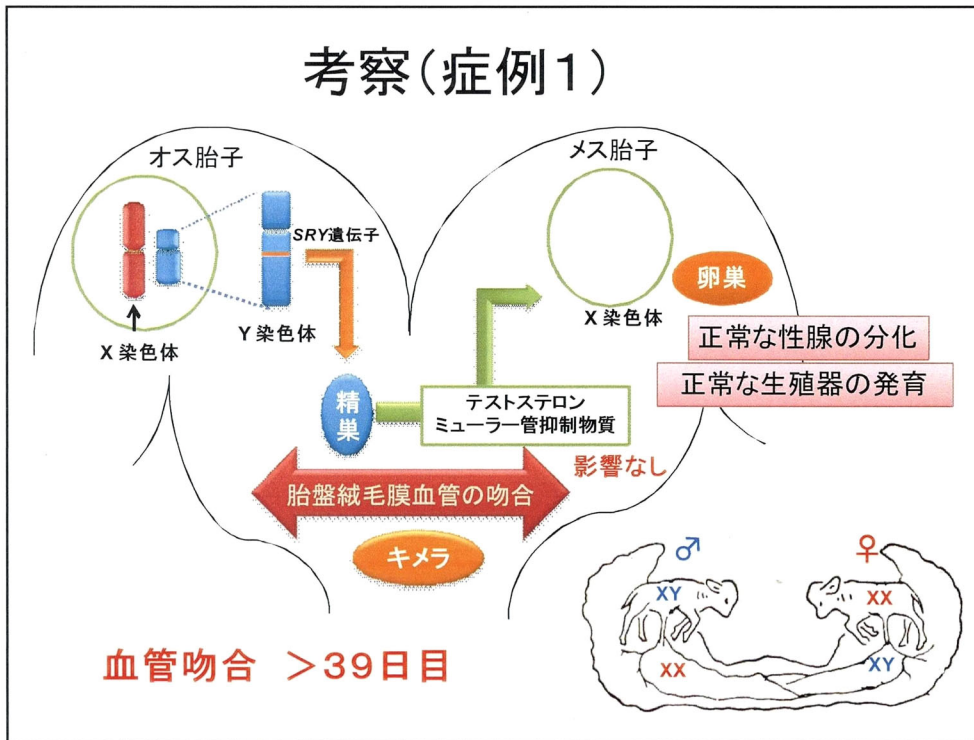


図4-7. 症例1の胎盤絨毛膜血管の吻合時期の遅延

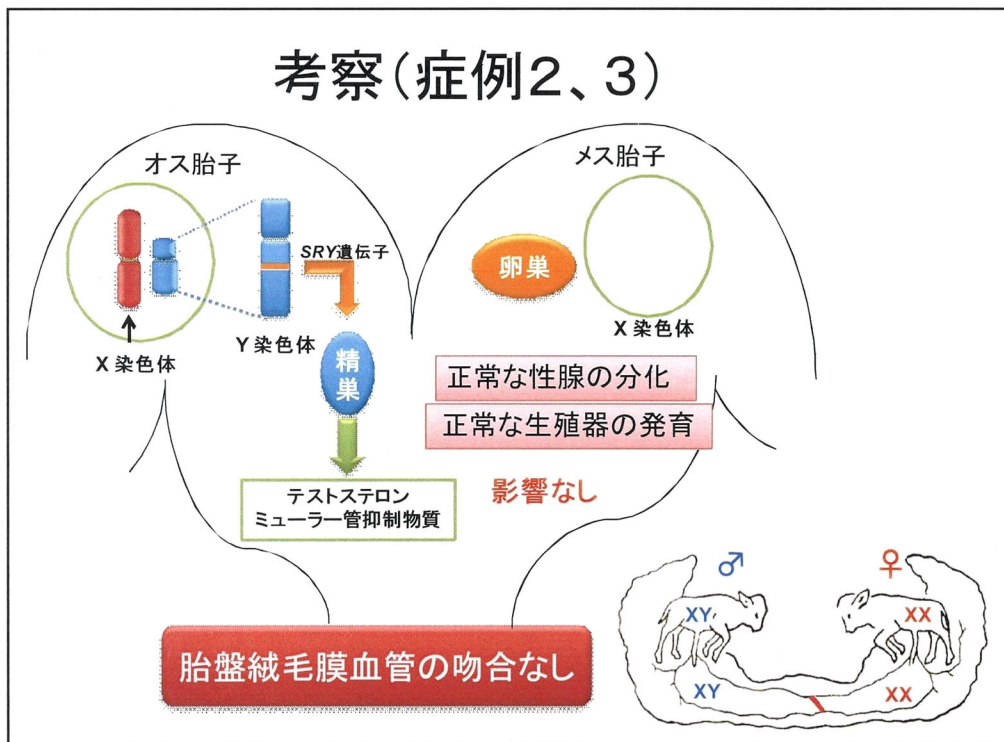


図4-8. 症例2, 3の胎盤絨毛膜血管の吻合なし

2カ月齢子牛の膣長

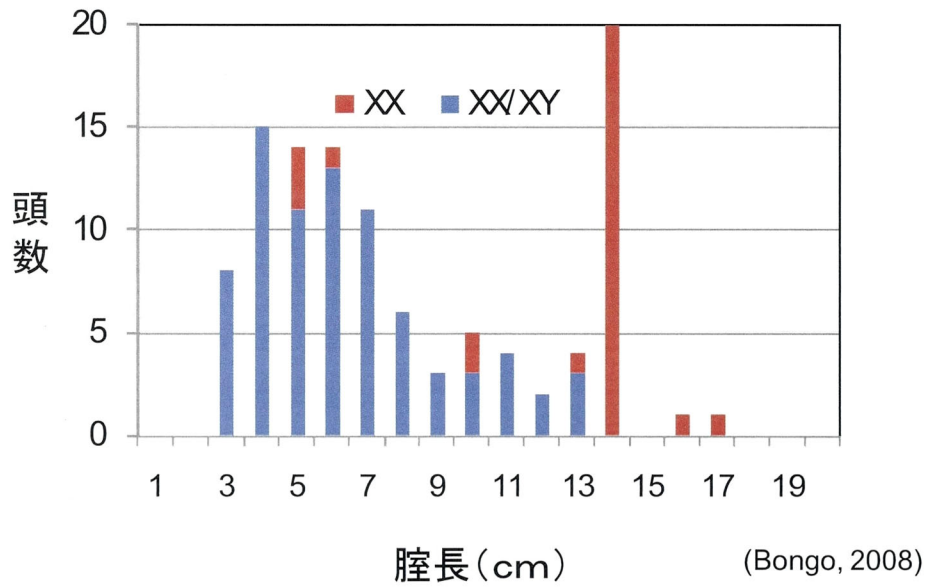


図4-9. 2カ月齢正常雌子牛と性染色体キメラ子牛の膣長

第5章

総合考察

牛では一般に初回授精時の受胎率は50～60%であり、30～40%の受精障害と早期胚死滅が常に生じている。この要因として、生殖器の先天的な形態異常、精子や卵子内の遺伝子の異常、染色体異常があり、また胚や子宮内膜への微生物感染、内分泌異常などがある。先天異常があると、受精障害や早期胚死滅による不妊症の増加、流早死産の多発、出生子牛の体型異常、虚弱、発育不良の増加となり、畜産農家は直接的な損害を受ける。不妊症への対応としては、日常的な診断に基づく予防、治療を実施するが、特に未経産牛では先天的な異常が重要となる。これらには染色体異常、間性、フリーマーチン、中腎管傍管の部分的形成不全、肉柱、膣弁遺残などがある。

染色体異常には大別して、数的異常と構造異常があり、染色体構成の異常としてモザイクとキメラがある(三宅陽一 1990)。同一個体の体内に2種類以上の核型の異なる細胞群が存在する場合、1個の接合子に由来するものをモザイク、異なった接合子に由来するものがキメラである。今回調査した、半陰陽の症例にモザイクが、フリーマーチンの多くにキメラが認められる。

試験1では卵管や子宮、子宮頸あるいは膣の発育が部分的に抑制されるホワイトヘイファー病について、臨床内分泌学的に検索した。

症例1(14カ月齢)は膣鏡検査で膣前庭部に膣弁を認め、子宮腔部や子宮頸管を経由する薬液注入棒の挿入は困難であった。直腸検査で子宮頸はやや肥大し、内部管を認めるがヒダ様構造は確認できず、子宮角は非常に小さく、右子宮角は触知できなかった。超音波検査で膣内は3つに仕切られ、分泌液が貯留して

おり、膣弁を穿刺すると、白濁した液体 30ml を吸引できた。

症例 2 (18 カ月齢)は、膣検査で膣前庭部を3分の2ほど覆う膣弁が存在したが、膣鏡挿入時に容易に破れた。直腸検査では、子宮頸、子宮体および左子宮角は触知したが、右子宮角は触知できず、左右卵巣は正常大であった。2度の人工授精でいずれも不受胎であり、再診時、人工授精を行わず、発情後 7 日目に左子宮角に凍結胚を移植した。

症例 1 は、両子宮角の欠損と膣弁遺残を合併した I・Ⅲ混合型 WHD であり、生殖道を欠く絶対不妊症のため、肥育用へ用途変更した。症例 2 は、右子宮角欠損と膣弁遺残を合併した II・Ⅲ混合型 WHD で、左子宮角への胚移植により反対側卵巣の黄体形成でも妊娠した。

臨床的に、WHD の発生は少なくないと推測されるが、その病態は様々であり、一角子宮の II 型では、残存した正常子宮角への人工授精や胚移植により繁殖への供用が可能である。

試験 2 では解剖学的に完全な雌型または雄型を示さず、両性の特徴を併せ持つ半陰陽を臨床内分泌学的に検索した。

症例 1 (10 カ月齢)は褐毛和種で、外部生殖器は雌様であり、月齢の経過とともに体型が雄性化してきた。排尿時に尿を斜め上方へ排出し、外陰部検査では、肛門下約 10 cm に深さ 3 cm 程度の開口部があり、直腸検査では子宮や卵巣は触診できなかった。一方、経直腸超音波検査において、肛門下に 4×3cm のねじり棒状の構造物が画像化された。

症例 2 は、黒毛和種(18 カ月齢)で、生来無発情で、外部生殖器は雌に類似し、外陰部検査で膣長は 13cm であった。また、直腸検査では子宮や卵巣は触診できず、経直腸超音波検査において縦隔構造を持つ 1 対の精巣様構造物(5×3cm)が描出された。

両症例にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 3000IU を筋肉内に投与し、ホルモン産生能を調べ、対照として、6 カ月齢の黒毛和種雄子牛 4 頭と 10 カ月齢の黒毛和種雌子牛 4 頭を供試した。また、性染色体キメラの検出と Y 染色体特異的 DNA を LAMP 法にて検出した。症例 1 は 12 カ月齢で安楽殺後、症例 2 は 24 カ月齢で食肉センターにて解体し、病理組織学的検査を行った。

症例 1 の血中テストステロン濃度は、Day0 で 8.9ng/ml と hCG 投与前から高い値で推移し、症例 2 は Day0 から Day7 まで 0.4ng/ml 以下で推移した。また、血中 P₄ 濃度は、両症例ともに 0.5ng/ml 以下であった。対照である正常雄子牛の血中 T 濃度は、Day5 が 54.7±3.3ng/ml と hCG 投与後一過性の上昇を示し、血中 P₄ 濃度は 0.5ng/ml 以下であった。また、正常雌子牛(n=4)の血中 T 濃度は、0.4ng/ml 以下であり、血中 P₄ 濃度は hCG 投与後 11.6±3.5ng/ml と高い値で推移した。症例 1 の性染色体は XX/XY キメラを示し、症例 2 は全て XY の雄型を示した。また、LAMP 法による Y 染色体特異的 DNA は症例 1、2 ともに陽性であり、さらに症例 2 では SRY 領域が確認された。

組織学的検査では、症例 1 の骨盤腔内に精巣上体を持つ一対の矮小な精巣 (17g、18g)、精管および精嚢腺が存在し、肛門下にねじり棒状の陰茎 (4×3cm) が認められた。症例 2 では、骨盤腔内に一対の矮小な精巣 (重量 35g、37g) が存在したが、精巣上体と精嚢腺は存在しなかった。症例 1 と 2 の精巣組織像は類似しており、小型の精細管が存在し、精細管間質ではライディヒ細胞が代償性に増加していた。また、精細管においてセルトリ細胞は正常に保持されていたが、精粗細胞や精子形成は認められなかった。

牛雄性仮性半陰陽において、精巣からのテストステロン産生は通常正常であるが、細胞内ではアンドロゲン感受性が低下しているため、中腎管周辺の発達に障害が出ると思われる。今回、症例 1、2 ともに矮小な精巣が存在し、ライディヒ細胞の増生が認められたが、症例 1 では hCG 投与に関係なく Day0 から高いテストステロン産生がみられ、一方症例 2 では正常雌と同等レベルの低値

で推移した。この理由は明確ではないが、ステロイドホルモンに対するレセプター感受性の低下などが関与していると考えられた。

試験 3 では、異性双胎ながら正常な膣の長さを示すホルスタイン種未経産牛 3 例に対して、性染色体検査と卵巢負荷試験を実施し、内分泌学的解析および妊孕性を追跡調査した。

症例 1 は無形無心体とともに娩出され、性染色体検査で XX/XY キメラと診断され、生後 30 日目において膣長は 18cm で正常雌子牛と同程度であった。症例 2 は雄胎子とともに娩出され、フリーマーチンとの認識で飼養されていたが、膣長が 35cm であり、性染色体検査を実施したところすべて XX の雌型であった。その後、両症例に対して性腺刺激ホルモン投与による卵巢負荷試験を実施するとともに、LAMP 法による Y 染色体特異的 DNA の分析を行った。症例 3 は雄胎子（生後直死）とともに娩出され、フリーマーチンとの認識で黒毛和種雄牛と同じパドックで飼養されていたが、肥育転用前に直腸検査を行ったところ妊娠していた。

症例 1 と 2 の卵巢負荷試験における血中エストロゲン(E_2) 濃度は、Day6 において正常雌 ($158.4 \pm 27.3 \text{ pg/ml}$) と症例 1 (86.5 pg/ml) で一過性に増加した。また、血中 P_4 濃度は Day10 において正常雌 ($4.8 \pm 2.7 \text{ ng/ml}$) と症例 2 (7.2 ng/ml) で増加した。しかし、フリーマーチン(FM)は性腺刺激ホルモン投与に反応せず、血中 E_2 ($14.9 \pm 0.7 \text{ pg/ml}$) および P_4 濃度 (0.5 ng/ml 以下) とともに低値で推移した。

症例 1 の膣長の推移は 12 カ月齢 28.7cm (正常雌 $25.1 \pm 4.8 \text{ cm}$) であったが、FM は 10cm 以下で推移した。症例 1 の Y 染色体特異的 DNA の分析は 3 回の検査すべてで陽性となった。AI 後 28 日目に超音波検査にて妊娠鑑定を行い、 $10 \times 8 \text{ mm}$ の胎子とその心血流を描出し、受胎を確認した。

症例 2 は 12 カ月齢で膣長が 35cm で、性染色体はすべて 60、XX の雌型であり Y 染色体特異的 DNA は陰性であった。また、症例 2 と同腹の雄牛の性染色体

はすべて 60、XY の雄型であり、Y 染色体特異的 DNA は陽性であった。症例 3 は、膣長が 32cm、Y 染色体特異的 DNA は陰性で、性染色体はすべて 60、XX の雌型であった。

症例 1 では性腺が雌へと分化した受胎後 39 日目以降に雄胎子と胎盤絨毛膜血管が吻合し、そのため性染色体キメラを保有しながら正常な繁殖能を保持していると思われた。症例 2 と 3 は異性双子であるにも関わらず膣長が正常で性染色体キメラを持たず、症例 3 は自然交配で受胎した。この理由として、症例 2 と 3 は妊娠中に雄胎子との胎盤絨毛膜血管の吻合が起こらず、性染色体は雌型を示し、正常な繁殖能を保持していると考えられた。

今後の臨床的な対応として、出生した雌子牛が異性双子でも膣長が正常で卵巣負荷試験に反応する場合は、受胎する可能性があり、獣医師や農家に対する啓蒙が必要と思われる。

临床上、先天異常のすべてを知ることは困難であり、日ごろから獣医師や人工授精師、畜産指導員、種雄牛センター、家畜登録協会、家畜改良事業団などとの連携が必要である。身体検査として、X 線検査や超音波検査、内視鏡検査、血液検査、染色体、遺伝子検査などがあり、普段から検査材料の保存、蓄積が必要である。

予後判定と淘汰基準として、先天異常の正確な診断と原因の解明は困難な場合が多く、特に外見的な異常がなく、ある程度の発育が認められる症例の診断は難しい。そのため、外見上異常がなくても結果的に予後不良となる場合、臨床獣医師のきめ細かい観察、診断が必要である。外部生殖器の異常が激しい場合(間性)、出生時に発見されるが、一般に生殖器の異常は牛の健康状態に影響しないため、多くは性成熟期や繁殖供用時に発見される。すなわち、第二性徴の異常、無発情、授精不能や授精困難が病歴となる。

生殖器の形態的な異常の多くは、治療不能または困難であるが、膣内の肉柱

や軽度の膣弁閉鎖は治療の対象となり、産道の狭窄では帝王切開術が代替法となる。しかし、繁殖可能であっても染色体異常をキャリアとして持つ雌牛は将来的には繁殖牛から淘汰すべきである。

結論：先天異常子牛の研究では、遺伝学、発生学、解剖学、生化学、分子生物学、ウイルス学、中毒学、薬理学、繁殖生理学など幅広い分野が関連している。一方、臨床獣医師は従来のように単に治療不能な I 症例として短絡に処分するのではなく、常に原因の追及を心がけ、繁殖性の診断を行い、畜産農家に対し、専門的な立場から十分な助言と指導をすることが求められる。

第6章

要約

雌牛の生殖器奇形についての報告は少なくないが、その病態は多様であり特に臨床現場では精査されることなく淘汰される事が多い。本研究では、ホワイトヘイファー病（WHD）、雄性仮性半陰陽および妊孕性を持つ異性双子について臨床内分泌学および病理学的に検索した。

【試験1】WHDは中腎傍管の部分的形成不全であり、形態学的に子宮角先端部分のみを形成するⅠ型、一側子宮角のみを有するⅡ型、および生殖器は正常で膣弁を有するⅢ型に分類される。

今回、2002～2008年に宮崎県、熊本県、鹿児島県、および北海道の1道3県において超音波検査でWHDと診断されたホルスタイン雌牛18例について形態的に分類し、Ⅱ型の臨床経過を検討した。18例中Ⅰ型は2例、Ⅱ型は15例、Ⅲ型は1例であった。Ⅱ型と診断された15例全てが繁殖に供用され、その内訳は人工授精が10例、胚移植が5例であった。また、3例は欠損子宮側の黄体に対する胚移植で受胎し、分娩した。WHDは3つの型に分類され、Ⅱ型は繁殖供用が可能であるがその分娩月齢は延長する傾向にあることが示された。

【試験2】外部生殖器は雌の様相を示しながら精巣を持つものを雄性仮性半陰陽という。

今回、雄性仮性半陰陽と診断された牛2例について生前に経直腸超音波検査、正常雌雄子牛を対照としたhCG負荷試験による内分泌学的検査、性染色体検査を行い、解体後病理組織学的検査を行った。症例1は10カ月齢の褐毛和種で雄子牛との双子であった。斜め上方に排尿し、月齢の経過とともに体型が雄性化

してきた。経直腸超音波検査により子宮や卵巣はなく、ねじり棒状の構造物を確認した。症例2は18カ月齢の黒毛和種で無発情であった。直腸検査で子宮や卵巣は触知せず超音波検査で精巣様構造物を描出した。hCG3000IUを投与した負荷試験により症例1の血中テストステロン(T)濃度は8.9、11.0、11.3ng/mlと高く、症例2の血中T濃度は0.4ng/ml未満であった。また血中プロジェステロン(P₄)濃度は両症例ともに0.5ng/ml未満であった。性染色体検査で症例1はXX/XYキメラ(31/19)を示し、症例2はすべてXYであった。またLAMP法によるY染色体特異的DNAの検出では、両症例ともに陽性であった。解体後、症例1は1対の発育不全の精巣、精管、精嚢腺および渦巻状の陰茎を持ち、精巣組織は精細管が小型で、間細胞と結合組織の増生が認められた。症例2は精巣上体を欠く1対の精巣が存在し、左精巣から続く未分化な生殖管2本は盲端に終わっていた。精巣組織は代償性に間細胞が増加し、精子形成は認められなかった。雄性仮性半陰陽と診断された2症例の病態は異なっており、生前から解体後に至る一連の検索過程は臨床現場への還元に寄与するものと思われる。

【試験3】牛の異性多胎の場合、通常性染色体はXX/XYのキメラを示し、雌子牛の92-93%以上は正常な性腺の分化が起こらないフリーマーチンで不妊症となる。今回、異性双子でありながら膈長が正常であったホルスタイン種未經産牛3例に対して、性染色体検査と卵巣負荷試験を実施し、内分泌学的解析および妊孕性を追跡調査した。

症例1は無形無心体とともに娩出され、性染色体検査でXX/XYキメラと診断され、生後30日において膈長は18cmで正常雌子牛と同程度であった。症例2は雄胎子とともに娩出され、肥育目的で飼養されていたが膈長が35cmであることが判明し、性染色体検査を実施したところすべてXXの雌型であった。症例3は雄胎子とともに娩出されたが、12カ月齢時に雄牛と同居中に発情が発現し、その後15カ月齢時に実施した妊娠診断で受胎が確認された。性染色体は全てXYを示

し、12カ月齢時の脛長は32cmであった。

症例1および2に対して卵巢負荷試験を実施するとともに、LAMP法によるY染色体特異的DNAの検出を行った。卵巢負荷試験はDay 0にeCG1000IUを、Day 2にhCG1500IUを投与し、Day 0、2、6、10に採血を行い血中エストラジオール (E_2)濃度と血中 P_4 濃度を測定した。さらに対照として、4カ月齢の黒毛和種雌子牛4頭（以下、正常雌）と7カ月齢の黒毛和種フリーマーチン子牛3頭（以下、FM）に同様の卵巢負荷試験を実施した。症例1はその後14カ月齢まで無発情で経過したため、脛内プロジェステロン製剤（CIDR）を10日間挿入し、除去2日後に発情徴候がみられたため人工授精（AI）を実施した。血中 E_2 濃度は、Day 6において正常雌（ 158.4 ± 27.3 pg/ml）と症例1（86.5pg/ml）で一過性に増加した。また、血中 P_4 濃度はDay 10において正常雌（ 4.8 ± 2.7 ng/ml）と症例2（7.2ng/ml）で増加した。しかしFMは性腺刺激ホルモン投与に反応せず、血中 E_2 （ 14.9 ± 0.7 pg/ml）および P_4 濃度（0.5ng/ml以下）ともに低値で推移した。症例1の脛長の推移は1カ月齢18cm、4カ月齢23cm、12カ月齢28.7cmであったが、FMは10cm以下で推移した。

症例1のY染色体特異的DNAの分析は3回の検査すべてで陽性となった。症例2は12カ月齢で脛長が35cm、症例3は12カ月齢で脛長が32cmであり、症例2と3の性染色体はすべてXXの雌型であり、Y染色体特異的DNAは陰性であった。症例1はその後順調に妊娠を継続し雌子牛を分娩した。胎子性腺の分化は受胎後39日頃までに完了するとされている。症例1では性腺が雌へと分化した受胎後39日目以降に雄胎子と胎盤絨毛膜血管が吻合し、そのため性染色体キメラを保有しながら正常な繁殖能を保持していると推察された。症例2および3は妊娠中に雄胎子と胎盤絨毛膜血管の吻合が起こらなかったため、性染色体は雌型を示し、正常な繁殖能を保持していたと考えられた。

出生した雌子牛が異性双子でも、脛長が正常で卵巢負荷試験に反応する場合は、受胎する可能性があり、獣医師や農家に対する啓蒙が必要と思われる。

Summary

Not a few cases were reported concerning the abnormal development of the reproductive organs, on the other hand, many such cases abandoned without detail patho-physiological examination. **In the present study, we investigated congenital reproductive organs, i.e. White heifer disease, Male pseudohermaphrodite, and Fertile co-twin female cows based on the clinical endocrinology and pathology findings.**

Experimental 1: White heifer disease

White heifer disease (WHD) is a segmental aplasia of the paramesonephric duct. WHD is categorized into three types which shows complete aplasia of both sides of the uterine horn (Type I), unicorn horn of the uterus (Type II), and normal genitalia with a retained hymen (Type III). **In the present study, we investigated 18 Holstein females which were diagnosed as WHD by ultrasonography in Miyazaki, Kumamoto, Kagoshima prefectures and Hokkaido from 2002 to 2008.**

As a result, out of 18 cases they were categorized as 2/18 (Type I), 15/18 (Type II) and 1/18 (Type III). Every cows in Type II were subjected for reproduction by Artificial insemination (AI) or Embryo transfer (ET). Out of them, 3 cases of Type II became pregnant by ET at contralateral corpus luteum in the ovary. Type I is entire sterility and Type II could use for reproduction, however their delivery age tended to be delayed compared with normal female cows.

Experimental 2: Male pseudohermaphrodite

Male pseudohermaphrodite (PH) has testis and external genitalia resembling the normal female cows. **In the present study, two cases of bovine male PH were subjected for clinical investigation with transrectal ultrasonography, endocrinological examination and adoption of hCG-stimulation test.**

Cytogenetics with analysis of sex chromosome and Y-specific DNA were determined and finally histological examination was conducted.

A 10-month old Japanese brown (Case 1) was born to male calf co-twins, and possessed female like external genitalia showing urination toward upper direction. Coat and skin in neck region seemed to be masculine as the animal had grown. Both of uterus and ovary were lacked and spiral stick-like structure was observed with transrectal ultrasonography. An 18-month old Japanese black (Case 2), which had normal female-like external genitalia, but lacked estrous behavior in life. Neither uterus nor ovary was detected with rectal palpation, however a pair of testis like organs was depicted with transrectal ultrasonography.

Plasma testosterone (T) concentrations of Case 1 were high (8.9, 11.0 and 11.3ng/ml), and Case 2 were low (<0.4ng/ml). Plasma progesterone (P₄) concentrations of Case 1 and 2 were low (<0.5ng/ml). Sex chromosome analysis of Case 1 was detected XX/XY chimera (31/19), and Case 2 was detected only XY karyotype. Moreover, detection of Y-specific DNA by LAMP was positive in both cases. In the pathological findings in

Case 1, a pair of atrophied testes with epididymides, seminal duct, seminal vesicles and spiral formed penis was detected.

In Case 2, a pair of atrophied testes was detected without epididymis, and there was two undifferentiated genital ducts connected to the left testis which ended with cecum. The number of Leydig cells was increased in the interstitium, however spermatogenesis was not observed in both of Case 1 and 2. Two cases of male PH were different in pathological findings each other. Accumulation of pathophysiological data and constructing the clinical investigation protocol for male PH would contribute the veterinary medicine.

Experimental 3: Fertile co-twin female cows

Generally, bovine heterosexual twins possess XX/XY chimeras and therefore almost 92-93% female calves become infertile and as freemartin. **In the present study, we investigated endocrinological survey in three Holstein heifers, which were born as heterosexual twins, whereas showed normal vagina length.**

Case 1 was born with an acardius amorphous, which possessed XX/XY chimera, however vagina length was normal (18cm) at day 30 after birth. Case 2 was born as twins with a male calf. The calf was raised as freemartin by the owner, but vaginal length showed normal (35cm) at 12-month old, and possessed only XY karyotype. Case

3 was born as twins with a male calf. At 12-month old, the calf showed estrous behavior, and the bull mated with her, and then she became pregnant. Vagina length of such calf was 32cm and possessed only XX karyotype.

We investigated the ovarian resistant-test in Case 1 and 2, and detection of Y-specific DNA by LAMP method was conducted in all cases. Ovarian resistant-test was carried out with injection of eCG 1000IU (Day 0), and hCG 1500 IU (Day 2), while blood samples were collected on Day 0, 2, 6 and 10. Plasma estradiol (E_2) concentration and P_4 concentration were measured. In comparison with heterosexual twins, 4-month old Japanese black female calf (normal females; n=4) and 7-month old Japanese black freemartin calf (FM; n=3) were conducted with same endocrinological investigation.

Because estrous behavior was not observed, Case 1 was inserted CIDR for 10 days and two days after CIDR out, the calf showed estrous behavior, and AI was conducted. Plasma E_2 concentration were increased in Normal females (158.4 ± 27.3 pg/ml) and Case 1 (86.5 pg/ml) . Plasma P_4 concentration were increased in Normal females (4.8 ± 2.7 ng/ml) and Case 2 (7.2 ng/ml) , whereas neither plasma E_2 nor P_4 were responded to gonadotropin in FM (E_2 ; 14.9 ± 0.7 pg/ml, P_4 ; <0.5 ng/ml) . Vagina length increased 18cm (1-month old), 23cm (4-month old), and 28.7cm (12-month old) in Case 1. In Case2, the length showed 35cm length at 12-month old, and 32cm length at 12-month old. On the other hand, FM was under 10cm throughout the examination.

Detection of Y-specific DNA was positive in Case 1, whereas negative in Case 2 and 3. Case 1 delivered normal female calf afterwards. Generally, differentiation of gonad in fetus completes until 39 days after conception. It is suggested that placenta-chorion blood vessels anastomose after the complete differentiation to female. Therefore Case 1 had fertilization while possess XX/XY chimeras. **It has been suggested that placenta-chorion blood vessels were not anastomosed in Case 2 and 3, therefore they possessed only XY karyotype and showed normal fertilization.**

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました宮崎大農学部獣医臨床繁殖学講座の上村俊一教授と北原 豪助教、ならびに山口大学農学部獣医外科学研究室の田浦保穂教授、宮崎大学農学部獣医寄生虫病学研究室内の堀井洋一郎教授、同大学獣医内科学研究室の片本 宏教授、同大学獣医生理学研究室の村上 昇教授に深謝いたします。

供試牛の病理解剖をご指導いただきました宮崎大学農学部獣医解剖学研究室の村上隆之教授および那須哲夫准教授に深謝いたします。

供試牛の染色体検査のご協力および論文指導を賜りました、帯広畜産大学獣医臨床繁殖学研究室の三宅陽一教授に深謝いたします。

供試牛の病理組織学検索にご協力とご指導をいただきました、宮崎大学農学部人獣共通感染症教育プロジェクトチームの二瓶和美助教に深謝いたします。

供試牛を快く提供していただき、繁殖検診への同伴および病態解明にご協力いただきました、熊本市たくま家畜診療所の谷 峰人獣医師と谷 千賀子獣医師に深謝いたします。

本研究に終始ご協力いただいた宮崎大学農学部附属住吉フィールドの福山喜一先生、小林郁夫助教、逸見広一郎技術職員、ならびに同大学農学部獣医臨床繁殖学研究室の卒業生と専攻学生の皆様に深謝いたします。

最後に、大学院在籍中、本研究の活動に際して全面的にご協力いただきました西諸県農業共済組合の海蔵俊一前基幹診療所長、釜崎 誠現基幹診療所長、および臨床獣医師の皆様、職員および組合員の皆様に衷心より御礼申し上げます。

山口大学大学院連合獣医学研究科在籍中、学費を援助頂き、日夜励ましていただいた宮崎県綾町在住の両親、兄夫婦に心から御礼と感謝を申し上げます。

引用文献

1. Ahlers D, Heuwieser W Zaremba W. 1984. Segmental aplasia of the uterus in a cow of the “German Black Pied” breed(brief clinical report). *Tierarztl Prax* **12**:431-434.
2. Behringer, R.R. 1995. The mullerian inhibitor and mammalian sexual development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. Biol. Sci.* **350**: 285-258.
3. Cabianca, G., Rota, A., Cozzi, B. and Ballarin, C. 2007. Expression of AMH in female fetal intersex gonads in the bovine. *Anat. Histol. Embryol.* **36**: 24-26.
4. Campagnoli, C., Fisk, N., Overton, T., Bennett, P., Watts, T. and Roberts, I. 2000. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. *Blood* **95**: 1967-1972.
5. Cavalieri, J. and Farin, P.W. 1999. Birth of a Holstein freemartin calf co-twinning to a schistosomus reflexus fetus. *Theriogenology* **52**: 815-826.
6. Cheng, H., Shi, H., Zhou, R., Guo, Y., Liu, L., Liu, J., Jiang, Y., Kudo, T. and Sutou, S. 2001. Characterization of Bovidae sex-determining gene SRY. *Genet. Sel. Evol.* **33**: 687-694.
7. Daneau, I., Houde, A., Ethier, J.F., Lussier, J.G. and Silversides, D.W. 1995. Bovine SRY gene locus: cloning and testicular expression. *Biol. Reprod.* **52**: 591-599.
8. Dennis SM, ed. 1993. Congenital Abnormalities. In The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice. *WB Saunders, Philadelphia.*1-222.
9. Eldridge, F.E. 1985. Fertility as affected by chromosomes.75-92.*In: Cytogenetics of Livestock.* AVI Publishing Company, INC, Connecticut.
10. Eldridge, F.E. and Blazak, W.F. 1977. Chromosomal analysis of fertile female heterosexual twins in cattle. *J. Dairy Sci.* **60**: 458-463.
11. Ennis, S. and Gallagher, T.F. 1994. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Anim. Genet.* **25**: 425-427.
12. Ennis,S.,Vaughan, L. and Gallagher, T.F. 1999. The diagnosis of freemartinism in cattle using sex-specific DNA sequences. *Res. Vet. Sci.* **67**: 111-112.
13. Finger KH, Herzog A, Rieck GW.1970. Jahresbericht 1969 fuer das Forschungsvorhaben Rinderanomalies. *Giessener Beitrage zur Erbpathologie*

- und Zuchthygiene.* 1/2, 60-73,
14. Freeman, G. 2007. Explanation the freemartin; Tandler and Keller vs. Lillie and the question of priority. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* **308B**: 105-112.
 15. Fujishiro, A., Kawakura, K., Miyake Y-I. and Kaneda ,Y. 1995. A fast, convenient diagnosis of the bovine freemartin syndrome using polymerase chain reaction. *Theriogenology* **43**: 883-891.
 16. Fujishiro, A., Miyake, Y-I., Gotoh, T. and Kaneda ,Y. 1994. A fertile case of bovine heterosexual twin female with sex chromosomal chimerism (XX/XY). *Tohoku J. Vet. Clin (Jpn. with English summary)*. **17**: 31-32.
 17. Gilmore LO, Fechheimer NS.1969 Congenital abnormalities in cattle and their general etiologic factors. *J Dairy Sci.* **11**:1831-1836.
 18. Greene HJ, Leipold HW, Huston K, Noordsy JL, Dennis SM.1973.Congenital defects in cattle. *Irish Vet J.***27**:37-45,
 19. Guzeloglu A, Michel F, Thatcher WW. 2004. Differential effects of interferon-tau on the prostaglandin synthetic pathway in bovine endometrial cells treated with phorbol ester. *J Dairy Sci.* **87**:2032-2041.
 20. Hafez ESE, Hafez B. 2000.*Reproduction in Farm Animals*, 7th ed. Lippincott Williams and Willkins, Maryland.pp.134-139.
 21. 浜名克己 2000. 牛の先天異常. 「生産獣医療における牛の生産病の実際」、内藤善久、浜名克己、元井嘉子編、文永堂出版、東京、195-206.
 22. 平賀武夫、阿部光雄、岩佐憲二、竹花一成 1987.過去 11 年間に北海道で観察されたウシの先天異常に関する形態学的研究. *酪農大紀要*. 12, 1, 257-268,
 23. Hirayama, H., Katagiri, S., Kageyama, S., Minamihashi, A., Moriyasu, S., Sawai, K., Onoe, S. and Takahashi, Y. 2007. Rapid sex chromosomal chimerism analysis in heterosexual twin female calves by Loop-mediated Isothermal Amplification. *Anim. Reprod. Sci.* **101**: 38-44.
 24. 石川 恒：自験例からみた牛の異常妊娠. 1967. *家畜繁殖誌*. 12, 5, 23-28,
 25. Jost, A., Vigier, B. and Prepin, J. 1972. Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. *J. Reprod. Fert.* **29**: 349-379.

26. Just, W., De Almeida, C.C., Goldshmidt, B. and Vogel, W. 1994. The male pseudohermaphrodite XX polled goat is Zfy and Sry negative. *Hereditas* **120**: 71-75.
27. Kastli, F. 1978. Cattle twins and freemartin diagnosis. *Vet. Rec.* **102**: 80-83.
28. Kawakura, K., Miyake, YI., Murakami, RK., Kondoh, S., Hirata, TI. and Kaneda, Y. 1996. Deletion of the SRY region on the Y chromosome detected in bovine gonadal hypoplasia (XY female) by PCR. *Cytogenet. Cell. Genet.* **72**: 183-184.
29. Kawakura, K., Miyake, YI., Murakami, RK., Kondoh, S., Hirata, TI. and Kaneda, Y. 1997. Abnormal structure of the Y chromosome detected in bovine gonadal hypoplasia (XY female) by FISH. *Cytogenet. Cell. Genet.* **76**: 36-38.
30. 北原 豪、上村俊一、浜名克己、三宅陽一. 2002. 単体フリーマーチンの染色体および組織・内分泌学的解析. *日獣会誌*. **55**, 8, 494-497,
31. Leipold HW. 1980. Nature, cause and frequency of congenital defects in cattle. *Bovine Practice*. **1**, 1, 21-40,
32. Leipold HW, Dennis SM. 1986. Congenital defects affecting bovine production. In Current Therapy in Theriogenology, 2. Morrow DA ed, WB Saunders, Philadelphia, 177-199,
33. Lillie, F. 1917. The freemartin: a study of the action of sex hormones in the foetal life of cattle. *J. Exp. Zool.* **23**: 371-452.
34. Long S. 2002. Abnormal development of the conceptus and its consequences. In Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8th ed, Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW eds, Saunders-Elsevier, Edinburgh, .119-143,
35. Lott, D.F., Benirschke, K., McDonald, J.N., Stormont, C. and Nett, T. 1993. Physical and behavioral findings in a pseudohermaphrodite American Bison. *J. Wildl. Dis.* **29**: 360-363.
36. Marcum, J.B. 1974. The freemartin syndrome. *Anim. Breed. Abstr.* **42**: 227-242.
37. Meyers-Wallen, V.N. 1999. Inherited disorders in sexual development. *J. Hered.* **90**: 93-95.
38. Miller, J.R. and Koopman, M. 1990. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from the bovine gene. *Anim. Genet.* **21**: 77-82.

39. 三宅陽一. 1990. 家畜の染色体異常. 「獣医学 1990」、清水悠紀臣、高橋よし雄編、近代出版、東京、148-157,
40. Miyake, Y-I., Ishikawa, T., Abe, T., Komatsu, M. and Kodama, Y. 1980. A fertile case of a bovine heterosexual twin female with sex-chromosomal chimerism. *Zuchthyg.* **15**: 103-106.
41. Miyake, Y-I. Ishikawa, T. and Kawata, K. 1980. The relationship between sex chromosomal chimerism and vaginal length in bovine heterosexual twin females. *Japan J. Anim. Reprod.* **26**: 9-31.
42. Miyake, Y-I. Ishikawa, T., Yoshida, M., Abe, T. and Komatsu, M. 1982. An additional case of fertile bovine heterosexual twin female with sex-chromosomal chimerism (XX/XY). *Japan J. Anim. Reprod.* **28**: 105-108.
43. Miyake, Y-I. Kaneda, Y. and Kanagawa, H. 1987. A new type of freemartinism born co-twin with acardius amorphus. *Japan J. Anim. Reprod.* **33**: 41-43.
44. 望月 宏、橋本善之. 1981. 家畜における先天異常. *先天異常*, 21, 1, 25-52,
45. Morris LH, Fairles J, Chenier T, Johnson WH. 1999. Segmental alpsia of the left paramesonephric duct in the cow. *Can Vet J.* **40**:884-885.
46. Newcombe JR. 1997. Uterus unicornis in two mares. *Vet Rec.* 141:21.
47. Nicholas FW: Introduction to Veterinary Genetics. Oxford Univ Press, 1996 (訳書-鈴木勝士.1999. 監訳: 「獣医遺伝学入門」. 学窓社、東京、1-317,)
48. Noden DM, DeLahunta A. 1985. The Embryology of Domestic Animals. Developmental Mechanisms and Malformations. Williams & Wilkins, Baltimore, 1-367, (訳書-牧田登之.1992. 監訳: 「家畜発生学. 発生のメカニズムと奇形」. 学窓社、東京、1-385,)
49. Oelschlaeger A, Gibson DF, Scanlon PF, Veit HP. 1981. Segmental aplasia in the uterus of a European wild pig (*Susscrofa*). *Theriogenology* **15**:157-159.
50. Ohno, S., Christian, L.C., Wachel, S.S. and Koo G.C. 1976. Hormonal-like role of H-Y antigen in bovine freemartin gonad. *Nature* **261**: 597-599.
51. Padula, A.M. 2005. The freemartin syndrome: an update. *Anim. Reprod. Sci.* **87**: 93-109.

52. Payan-Carreira, R., Pires, M.A., Quaresma, M., Chaves, R., Adegas, F., Guedes Pinto, H., Colaço, B. and Villar, V. 2008. A complex intersex condition in a Holstein calf. *Anim. Reprod. Sci.* **103**: 154-163.
53. Roberts SJ. 1986. Anomalies of development, teratology. *In Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology)*. Published by the Author, Woodstock, Vermont, 51-92.
54. Rota, A., Ballarin, C., Vigier, B., Cozzi, B. and Rey, R. 2002. Age dependent changes in plasma anti-Mullerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **129**: 39-44.
55. Satoh, S., Hirata, T-I., Miyake, Y-I. and Kaneda, Y. 1997. The possibility of early estimation for fertility in bovine heterosexual twin females. *J. Vet. Med. Sci.* **59**: 221-222.
56. Smith, G.S., Van Camp, S.D. and Basrur, P.K. 1977. A fertile female co-twin to a male calf. *Can. Vet. J.* **18**: 287-289.
57. Spencer TE, Bazer FW. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* **2**:49.
58. Steenholdt, C.W. 2007. Infertility Due to Noninflammatory Abnormalities of the Tubular Reproductive Tract. pp. 383-385. *In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Eds. Youngquist, R.S., Threlfall, W.R. Saunders Elsevier., St. Louis, MI.
59. Sundby, A., Tollman, R. and Velle, W. 1975. Long-term effect of hCG on plasma testosterone in bulls. *J. Reprod. Fert.* **45**:249-254.
60. Sundby, A. and Velle, W. 1983. Relationship between growth rate in bulls and human chorionic gonadotropin-induced plasma testosterone concentrations. *J. Anim. Sci.* **56**: 52-57.
61. Szabo, K.T. 1989. Congenital Malformations in Laboratory and Farm Animals. pp. 227-239. *In: Urogenital System. Academic Press, Inc., San Diego.*

62. Takagi, M., Yamagishi, N., Oboshi, K., Kageyama, S., Hirayama, H., Minamihashi, A., Sasaki, M., and Wijayagunawardane, M.P.B. 2005. A female pseudohermaphrodite Holstein heifer with gonadal mosaicism. *Theriogenology* **63**: 60-71.
63. Veitia, R.A., Salas-Cortés, L., Ottolenghi, C., Pailhoux, E., Cotinot, C. and Fellous, M. 2001. Testis determination in mammals: more questions than answers. *Mol. Cell. Endocrinol.* **179**: 3-16.
64. Vigier, B., Tran, D., Legeai, L., Bezard, J. and Josso, N. 1984. Origin of anti-mullerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J. Reprod. Fert.* **70**: 473-479.
65. Vigier, B., Wartin, F., Tran, D. and Josso, N. 1987. Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development* **100**: 43-55.
66. Watanabe, S., Takahashi, S., Konishi, H., Imai, H., Awata, T., Takahashi, H., Matsuda, H. and Yasue, H. 1992. An attempt of embryo sexing using polymerase chain reaction in cattle. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)* **63**: 715-720.
67. Warfield SJ, Seidel GE, Jr Farrand GD. 1986. Lack of natural luteolysis associated with uterine horn aplasia in a heifer. *J Am Vet Assoc.* **189**:1585-1586.
68. Wilkes, P.R., Wijeratne, W.V.S. and Munro, I.B. 1981. Reproductive anatomy and cytogenetics of freemartin heifers. *Vet. Rec.* **108**: 349-353.

