

ホルスタイン種育成牛における XY 型真性半陰陽の 1 例

鈴木 圭¹⁾ 住吉俊亮^{1)†} 渡辺哲也²⁾ 近藤広孝¹⁾ 渋谷 久¹⁾
 岩佐真宏¹⁾ 大滝忠利¹⁾ 堀北哲也¹⁾

1) 日本大学生物資源科学部 (〒 252-0880 藤沢市亀井野 1866)

2) 千葉県農業共済組合連合会 (〒 260-0031 千葉市中央区新千葉 3-2-6)

(2019年3月7日受付・2019年9月23日受理)

要 約

間性が疑われるとの主訴で日本大学付属動物病院に来院したホルスタイン種育成牛について、雌雄判別を目的とした検査を行った。染色体検査では、95細胞のすべてがXY型であった。ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 負荷試験における血漿中テストステロン (T) 濃度は低値を示した。抗ミュラー管ホルモン (AMH) 濃度は0.02ng/mlであった。Sex-determining region Y (Sry) 遺伝子検査は陽性で、病理解剖検査では卵巢、子宮、子宮頸管及び膣が認められ、膣とこれに連続する外陰部が肛門より36cm下方に位置し、膀胱から連続した尿道は皮下を走行し外陰部に開口していた。左側卵巢様構造物には、小型の卵胞様構造物及び精細管様構造物が散在し、同右側は左側と同様の所見に加えて複数の大型嚢胞状構造物が認められた。以上より、本症例はXY/femaleの真性半陰陽と確定診断した。本症例のように、T及びAMH濃度が低くhCG負荷試験に反応しない場合には、機能的な精巣の存在は否定でき、無処置で肥育しても肉質が悪化する、雄性が発現し飼養管理が困難となるといった影響はないと考えられる。

——キーワード：ホルスタイン種育成牛，真性半陰陽。

-----日獣会誌 73, 140~145 (2020)

間性とは解剖学的に完全な雌雄の判別を示さず、両性の特徴を併せ持つ状態を示し、フリーマーチンと半陰陽に大別される。フリーマーチンは雄胎子と雌胎子の胎膜血管が互いに吻合し、両胎子間で血液の交流が起こることで、性染色体キメラを示すものである。半陰陽は、外部生殖器や2次性徴が示す性とは反対の生殖巣をもつ仮性半陰陽と1個体において卵巢と精巣の両生殖巣をもつか、あるいは両方の組織の混在した卵精巣をもつ真性半陰陽に細分できる。間性の牛は繁殖能力がない。外部生殖器が雌であっても間性である場合は妊娠が不可能であり、それに伴い泌乳牛としての生産性はなくなる。また、肥育素牛として飼育するうえでも問題となることが多い。性腺よりテストステロン (T) が産生される場合は雄性の発現による飼育管理の難化、及び肉質の悪化により肉牛としての生産性も低下する。

現在まで、牛における間性についてはフリーマーチン [1-4]、仮性半陰陽 [5, 6]、真性半陰陽 [7] について詳細な報告がある。臨床現場で間性を示す牛に遭遇した際の対処法としてT値及び抗ミュラー管ホルモン

(AMH) の測定が行われることが多いが、症例数が少なく、性染色体型、外貌、Sex-determining region Y (Sry) 遺伝子の有無、AMHの発現量等も含めて検査項目が多岐にわたるため、データの蓄積が重要である。

今回、雌性的な外部生殖器、性染色体がXY型、及びY染色体上のSry遺伝子が陽性のホルスタイン種牛を診断する機会を得たので、その概要について報告する。

材料及び方法

症例：本症例は2017年2月12日に千葉県館山市の農場で出生したホルスタイン種育成牛であった。来院時は9カ月齢で、体重は259kg、栄養状態は良好であった。本症例の特徴として、膣に連続する外陰部が肛門より36cm下部の乳腺組織付近に開口しており、この部位より排尿を認めた (図1)。また、直腸検査で左右の子宮角及び卵巢様構造物を触知した。超音波画像検査においても、子宮角及び左右の卵巢様構造物内に卵胞様構造物を認めた。雌雄判別のため、染色体検査、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 負荷試験、AMH濃度測定、

† 連絡責任者：住吉俊亮 (日本大学生物資源科学部獣医学科獣医産業動物臨床学研究室)

〒 252-0880 藤沢市亀井野 1866 ☎・FAX 0466-84-3488 E-mail: sumiyoshi.toshiaki@nihon-u.ac.jp



図1 外陰部の開口部
肛門より36cm下部の乳腺組織付近
に外陰部が開口している。

Sry 遺伝子検査, 病理解剖検査, 及び内部生殖器についての組織学的検査を行った。

染色体検査: 頸静脈よりヘパリンナトリウム加採血管を用いて採血し, 常法によりリンパ球の培養を行い, 染色体標本を作製 [8], 4%ギムザ液で染色後, 鏡検した。

hCG 負荷試験: 試験開始0日にhCG3,000IU (動物用ゴナドトロピン3000, あすかアニマルヘルス(株), 東京)を筋肉内投与した。試験開始後0日, 5日及び7日に尾静脈からヘパリンナトリウム加採血管を用いて採血し, 採血後直ちに4℃, 3,000回転で30分遠心分離を行い血漿を分離し測定まで-30℃で保存した。この血漿について, T濃度を測定した。T濃度の測定は民間の検査施設(富士フィルム VET システムズ(株), 東京)に依頼した。検査はシーメンス社のトータルテストステロンIIを用いた化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)で行われた。本測定法による最小検出限界は0.02ng/mlであった。

AMH 濃度測定: 前述したhCG負荷試験開始0日に採血した血液から分離した血漿を用いて, AMH濃度の測定を行った。AMH濃度の測定は, 民間の検査施設(エスアールエル(株), 東京)に依頼した。本検査はヒトの測定系であり, バックマン・コールター社のアクセスAMHを試薬として用いたCLEIAで行われた。AMH濃度の検出下限値は0.02ng/mlであった。

Sry 遺伝子検査: hCG負荷試験開始0日にプレーン採血管により採血した全血を用いて, ウシSry遺伝子検査を実施した。検査は民間の検査施設(カホテクノ(有,

福岡)に依頼した。検査はまず, ウシ全血より, 市販のキット(LaboPass Tissue Miniキット, Cosmogenetech, KOREA)を用い, ゲノムDNAの抽出を行った。ウシSry遺伝子検査検出用プライマーはPMID:25178292を用い, ウシ特異的プライマーはPMID:22061698を使用した。ポジティブコントロール, ネガティブコントロールには, 雄牛(組織), 雌牛(組織)をそれぞれ使用した。プレートとプライマーを組み合わせ, PCRを実施した。PCRには, 市販のキット(QuantiTect SYBR Green PCR Kit, キアゲン, 東京)を使用した。

病理解剖検査及び病理組織学的検査: 症例は初診から2カ月後(11カ月齢)に, 病理解剖検査及び病理組織学的検査を実施した。組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後, 常法に従いパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い鏡検した。

成 績

染色体検査: 培養白血球細胞における性染色体は95細胞すべてXY型を示し, 雄牛における典型的な分裂中期の所見を認めた。なお, 染色体数はすべての細胞で $2n=60$ であり異常は認められなかった(図2)。

hCG 負荷試験: hCG負荷試験の結果を, 図3に示した。T濃度は0日で0.19ng/ml, 5日で0.11ng/ml, 7日で0.07ng/mlであり, 上昇することなく試験期間を通して低値で推移した。

AMH 濃度測定: AMH濃度は0.02ng/mlであり, 測定可能濃度の下限の低値であったが検出された。

Sry 遺伝子検査: PCR検査の結果, 本症例の全血においてSry遺伝子の増幅産物が認められたため, Sry陽性であると判断した。

病理解剖検査及び病理組織学的検査: 病理解剖検査の結果, 内部生殖器は雌様の構造を示し, 子宮, 子宮頸及び卵管と思われる構造物が認められた(図4)。子宮の組織学的所見としては, 子宮内膜には固有の子宮腺及び間質が認められた(図5)。性腺は卵巣様で, 左側卵巣と考えられる構造物は $2.0 \times 1.0 \times 0.5$ cm, 暗赤色, 充実性, 右側卵巣と考えられる構造物は $2.5 \times 1.5 \times 1.0$ cm, 暗赤色, 嚢胞状であった(図6)。膀胱から連続した尿道は皮下を走行し, 外陰部に開口していた。

病理組織学的検査では, 左側卵巣様構造物では小型の卵胞様構造物及び精細管様構造物が散在していた。右側卵巣様構造物では, 左側と同様に卵胞様構造物及び精細管様構造物の所見が認められ, 加えて複数の大型嚢胞状構造物が認められた。また, 子宮様構造物では子宮内膜, 間質, 筋層及び漿膜の基本構造が認められた。したがって, 子宮様構造物では子宮に固有の組織構造が観察されたが, 卵巣様構造物では卵胞様構造物だけではなく精細管様構造物も散見された(図7)。

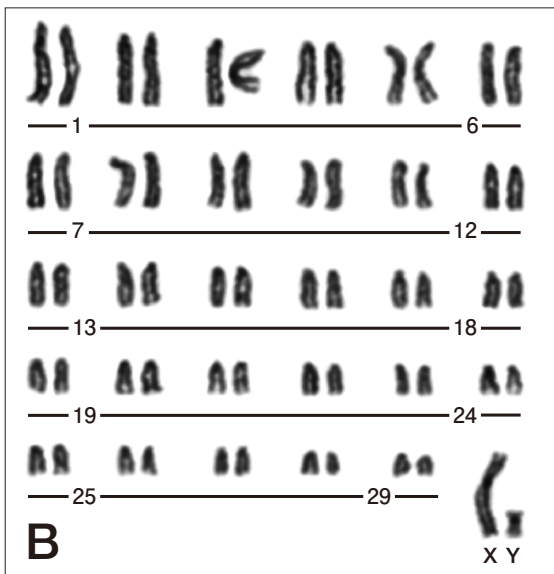
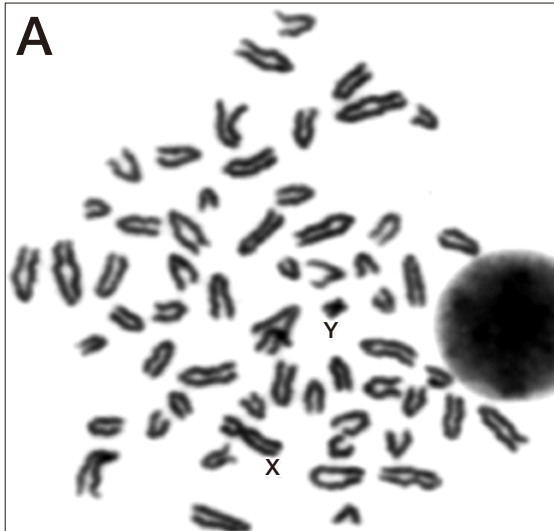


図2 症例のギムザ染色による染色体 (A: 分裂中期核板, B: 核型)
性染色体はXY型を示し、染色体数は $2n=60$ で異常は認められなかった。

以上、5つの検査結果から、本症例はXY/femaleの真性半陰陽であると診断した。

考 察

本症例では、内分泌学的検査としてhCG負荷試験を行った。hCG負荷試験において、機能的精巣が存在する場合、hCG投与後T濃度の上昇が認められることが知られている [9-11]。本症例において、T濃度はhCG反応性に上昇することはなく、低値で推移していた。つまり、低値ではあるが検出可能であったので、性腺のどこかにライディッヒ細胞もしくは内卵胞膜細胞が存在すると推定できた。また、AMH濃度も低値ではあるが検出可能レベルであったので、性腺のどこかに、セルトリ細胞もしくは顆粒層細胞が存在することが推定された。

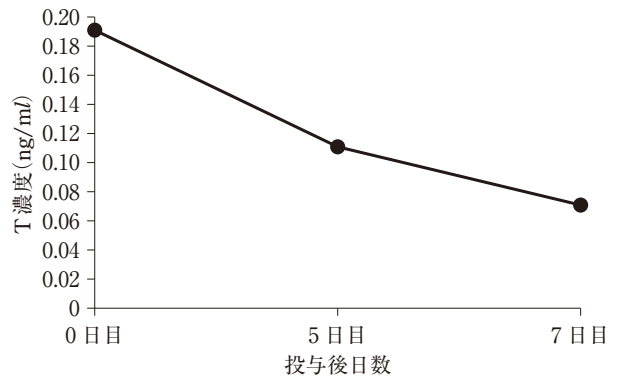


図3 hCG負荷試験における血漿中テストステロン (T) 濃度の変化

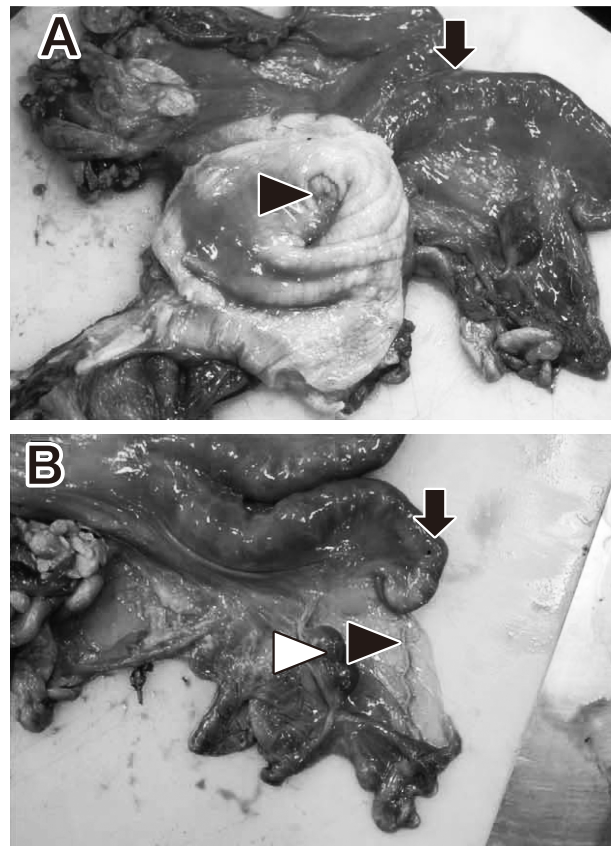


図4 内部生殖器の外観

- A: 外子宮口様構造物 (矢頭), 子宮様構造物は左右の子宮角に分岐 (矢印)
- B: 右側の卵巣様構造物 (白矢頭), 卵管構造物 (黒矢頭), 右側子宮角様構造物 (黒矢印)

なお、ライディッヒ細胞には幼獣型と成獣型が存在することが知られている [12]。幼獣型は、黄体形成ホルモン (LH) 非依存性にテストステロンの前駆物質であるアンドロステンジオンを合成し、これを基質としてセルトリ細胞内の 17β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (17β -HSD) によってTを産生する。一方、成獣型ライディッヒ細胞はLH依存性ではあるが、ライ

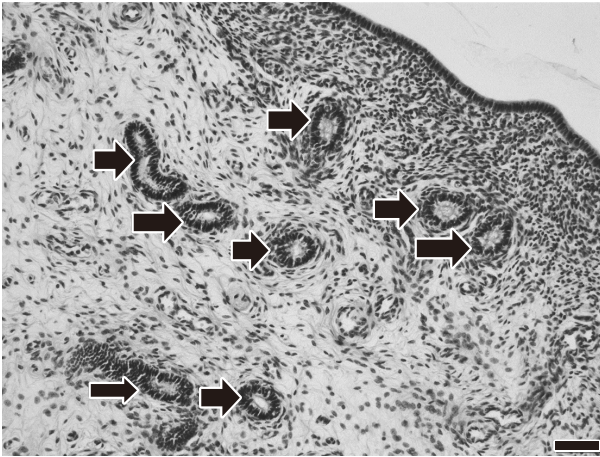


図5 子宮の組織像
子宮内膜には固有の子宮腺（矢印）及び間質が認められる。（Bar=50 μ m）



図6 右側卵巢様組織中の大型嚢胞状構造物の断面（右卵巢様組織全体の最大断面）

ディッツ細胞内に 17β -HSDをもつため、セルトリ細胞を介さずにTを合成することができる。本症例では、hCG 負荷試験において血漿中Tは上昇がみられないながらもわずかに検出され、またAMHは測定可能濃度の下限の低値であったが検出された。

以上のことを踏まえると、幼獣型ライディッツ細胞がhCG非反応性、つまりLH非依存性にアンドロステノンを産生し、わずかに存在するセルトリ細胞を介してTが産生されている可能性が高いと考えられる。また、内卵胞膜細胞を介してのT産生であった場合は、LH依存性にTが産生されるうえ、この経路ではTの前駆物質であるアンドロステノンの大部分は顆粒層細胞に拡散し、 17β -HSDによってTに変換されるが、卵胞刺激ホルモン（FSH）によるアロマターゼ活性によってエストラジオールに変換されるため、血漿中にT

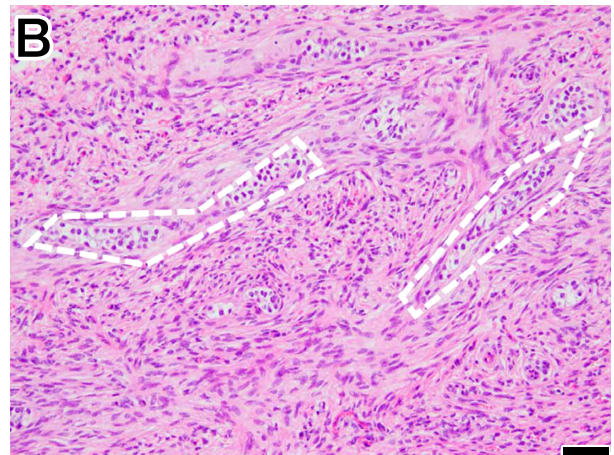
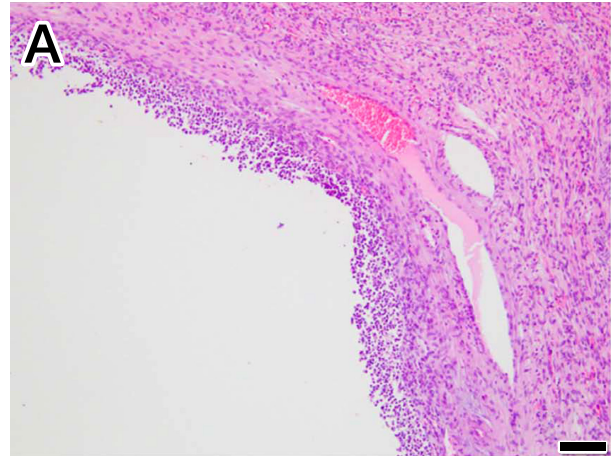


図7 内部生殖器の病理組織学的所見
A：大型嚢胞状構造物（図5）の嚢胞を内張りする顆粒層細胞様組織（Bar=100 μ m）
B：左側卵巢様構造物における精細管様構造（Bar=50 μ m）

として検出できるものは、非常に低値であると考えられる。

本症例では、AMH濃度は検出されたが低値であった。AMHは、セルトリ細胞及び顆粒層細胞で産生される[13]。雄牛血漿中のAMH濃度は 2.3 ± 0.1 カ月齢で最高値となり、その後漸減していくことが報告されている[14]。本症例が、検査時に9カ月齢であったことを考慮すると、セルトリ細胞のAMH産生能がすでに低下していた可能性と、そもそもセルトリ細胞の発達が悪く、出生後初期からAMH産生能が低かった可能性、及び両原因を併せもっていた可能性が考えられる。また、AMHは原始卵胞及び成熟卵胞の顆粒層細胞では産生されず、前胞状卵胞、胞状卵胞などの発達途中の卵胞の顆粒層細胞で産生されることが知られている[14]。したがって、左右卵巢様構造物中に散在していた胞状卵胞程度のサイズ（2~7mm程度）の卵胞様構造物で産生された可能性が考えられる。しかし、そのほか小さな原始卵胞及び右側卵巢様構造物中の大型卵胞様構造物で

AMHが産生された可能性は低いものと思われる。

本症例では発情や発情徴候は確認されず、直腸検査及び超音波画像検査においても卵巣の周期的変化は観察されなかったため、血中エストロゲン及びプロジェステロン濃度の測定は実施しなかった。他方、本症例と類似した症例に、外貌は雌であるが、Sry遺伝子検査は陽性で性染色体もXY型を示し、性分化疾患(DSD)と診断されたホルスタイン種の報告があり、卵巣組織に異常は認められず黄体及び卵胞が存在し、正常な卵巣周期をとっており、人工授精も行われていた[15]。本症例では黄体は確認されなかったが、右側卵巣様構造物に複数の卵胞様構造物が認められたことを考えると、卵胞様構造物の顆粒層細胞でエストロゲンが産生され、発情や発情徴候が発現する可能性はあったものと考えられる。

また、本症例は性染色体型がXYで、Y染色体上のSry遺伝子が陽性にもかかわらず、雌のような外部生殖器や、性腺に雌の所見が認められた。この理由として、Sry遺伝子は雄性決定遺伝子として知られているが、雄性決定カスケードの最上部であると考えられているため、そのカスケードの下流に異常がある場合はSry遺伝子が陽性でも正常な雄性化が行われず、肉眼的及び組織学的所見が雌性的なものとなる可能性が考えられる。また、本症例で実施したSry遺伝子検査は、PCRでSry遺伝子の増幅産物の存在を確認するものであり、Sry遺伝子が正常に機能しているかどうかは不明である。Sry遺伝子は存在していたが、塩基置換や欠失等の理由で遺伝子が正常に機能していなかったという可能性も考えられる。

牛における間性のデメリットとして、繁殖能力の欠如及びTが分泌されている場合は肉質の悪化の可能性が考えられ、肉牛としての生産性を向上させるために性腺摘出を検討する必要がある。しかし、本症例のようにAMH及びT濃度が低く、hCG負荷試験でもT濃度の上昇が認められない場合は、機能的な精巣もしくは卵精巣は存在しないと判断し、そのまま肥育素牛として飼育しても問題ないと考えられる。

一方、血中AMH及びT濃度が高く、hCG負荷試験においてT濃度の上昇が認められる場合には、機能的な精巣もしくは卵精巣の存在が示唆される。このような場合は、肥育素牛としての生産性を向上させるために、精巣もしくは卵精巣の存在を確認し、摘出することが必要になると思われる。また、間性であっても、卵巣組織には異常が認められない、あるいは卵巣様構造物に存在する卵胞様構造物からエストロゲンが分泌され、発情や発情徴候が認められるような症例では、通常の雌牛肥育と同様に発情による飼料摂取量の低下や乗駕によるストレス、事故の危険性について考慮する必要がある。

本症例の研究を行うに当たり、ご指導、ご鞭撻をいただいた

日本大学生物資源科学部獣医学科 獣医臨床繁殖学研究室 津曲茂久前教授並びに宮崎大学農学部獣医学科 産業動物臨床繁殖学研究室 北原 豪准教授に深謝する。

引用文献

- [1] Remnant JG, Lea RG, Allen CE, Huxley JN, Robinson RS, Brower AI : Novel gonadal characteristics in an aged bovine freemartin, *Anim Reprod Sci*, 146, 1-4 (2014)
- [2] 栢田博司, 和田 靖 : 牛の異性4仔に認められた性染色体のキメラ, *家畜繁殖誌*, 22, 115-117 (1976)
- [3] Satoh S, Hirata T, Miyake Y, Kaneda Y : The possibility of early estimation for fertility in bovine heterosexual twin females, *J Vet Med Sci*, 59, 221-222 (1997)
- [4] 北原 豪, 上村俊一, 浜名克己, 三宅陽一 : 単胎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, 494-497 (2002)
- [5] Moriyama C, Tani M, Nibe K, Kitahara G, Haneda S, Motozumi M, Miyake Y, Kamimura S : Two case of bovine male pseudohermaphrodites with different endocrinological and pathological findings, *J Vet Med Sci*, 72, 507-510 (2010)
- [6] Takagi M, Yamagishi N, Oboshi K, Kageyama S, Hirayama H, Minamihashi A, Sasaki M, Wijayagunawardane MPB : A female pseudohermaphrodite Holstein heifer with gonadal mosaicism, *Theriogenology*, 63, 60-71 (2005)
- [7] Bresciani C, Parma P, De Lorenzi L, Di Ianni F, Bertocchi M, Bertani V, Cantoni AM, Parmigiani E : A clinical case of an Sry-positive intersex/hermaphrodite Holstein cattle, *Sex Dev*, 9, 229-238 (2015)
- [8] 奈良信雄, 池内達郎, 吉田光明, 小原(斎藤)深美子, 東田修二 : 遺伝子・染色体検査学, 65-101, 医歯薬出版, 東京 (2002)
- [9] Padula AM : The freemartin syndrome: an update, *Anim Reprod Sci*, 87, 93-109 (2005)
- [10] Sunbdy A, Tollman R, Velle W : Long-term effect of hCG on plasma testosterone in bulls, *J Reprod Fertil*, 45, 249-254 (1975)
- [11] Sunbdy A, Velle W : Relationship between growth rate in bulls and human chorionic gonadotropin-induced plasma testosterone concentrations, *J Anim Sci*, 56, 52-57 (1983)
- [12] 嶋 雄一, 宮林香奈子, 松崎佐和子, 井上実紀, 諸橋憲一朗 : 出生後の精巣における胎仔型ライディッヒ細胞の細胞運命と生理機能の解明, *日本生殖内分泌学会雑誌*, 19, 45-50 (2014)
- [13] Holst BS : Diagnostic possibilities from a serum sample-clinical value of new methods within small animal reproduction, with focus on anti-Müllerian hormone, *Reprod Domest Anim*, 52, 303-309 (2017)
- [14] 北原 豪 : 産業動物分野における抗ミューラー管ホルモンの臨床応用, *家畜診療*, 65, 491-499 (2018)
- [15] De Lorenzi L, Arrighi S, Rossi E, Grignani P, Previderè C, Bonacina S, Cremonesi F, Parma P : XY (SRY-positive) ovarian disorder of sex development in cattle, *Sex Dev*, 12, 196-203 (2018)

Case of True Hermaphroditism with XY Karyotype in a Holstein Heifer

Kei SUZUKI¹⁾, Toshiaki SUMIYOSHI^{1)†}, Tetsuya WATANABE²⁾,
Hirotaka KONDO¹⁾, Hisashi SHIBUYA¹⁾, Masahiro A IWASA¹⁾,
Tadatoshi OHTAKI¹⁾ and Tetsuya HORIKITA¹⁾

1) *Nihon University College of Bioresource Sciences, 1866 Kameino, Fujisawa, 252-0880, Japan*

2) *Federation of Chiba Agricultural Mutual Aid Association, 3-2-6 Shinchiba, Chuo, Chiba, 260-0031, Japan*

SUMMARY

An examination aimed at sex determination was carried out at Nihon University Animal Medical Center for a Holstein heifer with suspected hermaphroditism. Cytogenetic analysis of blood cells confirmed the presence of the Y chromosome ($2n = 60, XY$) in 95 cells, and molecular analysis revealed the presence of the Sex-determining region Y (Sry) gene in blood cells. Plasma testosterone (T) level was found to be low in a human chorionic gonadotropin (hCG) blood test. The anti-Müllerian hormone (AMH) level was 0.02 ng/ml. In a pathological examination, the existence was confirmed for ovaries, a uterus, a cervix and a vagina. The animal exhibited external genitalia that continued from the vagina, located 36 cm below the anus. The left ovary-like structure was interspersed with small follicle-like structures and seminiferous tubule-like structures. On the right side, in addition to the same findings as the left side, multiple large cystic structures were observed. Based on these results, the cow was diagnosed with true hermaphroditism (XY/female). When the T and AMH levels are low and do not respond to the hCG blood test, as in this case, it can be judged that there is no functional testis, and it is considered that there is no adverse effect (such as the deterioration of meat quality, management becomes difficult due to the expression of male character) even if fattening is implemented without treatment.

— Key words : Holstein heifer, true hermaphroditism.

† *Correspondence to : Toshiaki SUMIYOSHI (Nihon University College of Bioresource Sciences)
1866 Kameino, Fujisawa, 252-0880, Japan
TEL · FAX 0466-84-3488 E-mail : sumiyoshi.toshiaki@nihon-u.ac.jp*

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 73, 140 ~ 145 (2020)