

# ナキウサギ(*Ochotona rufescens rufescens*)における生理的過剰排卵および生理的過剰黄体形成

誌名	明治大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Meiji University
ISSN	04656083
著者名	太田,昭彦 矢橋,寛之 鈴木,善祐
発行元	明治大学農学部
巻/号	134号
掲載ページ	p. 19-28
発行年月	2003年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



論文

ナキウサギ (*Ochotona rufescens rufescens*) における  
生理的過剰排卵および生理的過剰黄体形成

太田昭彦・矢橋寛之\*・鈴木善祐\*\*

2003 年 2 月 12 日受理

Physiological multi-ovulation and multi-corpora lutea formation  
in the Pika (*Ochotona rufescens rufescens*).

Akihiko OHTA, Hiroyuki YAHASHI, Yoshisuke SUZUKI

Summary

This study aims to the investigate female reproductive function of the pika (*Ochotona rufescens rufescens*); a new experimental animal. The pika was a persistent estrous-induce ovulator under artificially illuminated condition. The average duration of gestation was  $26.5 \pm 0.5$  days. The progesterone levels in plasma already increased at Day 4 of the pregnancy and increased to reach a peak at Day 22. Thereafter, the progesterone levels abruptly decreased to the basal level immediately after parturition. Bilateral ovariectomy at any stage of pregnancy resulted in failure of implantation, abortion, stillbirth or parturition death and suddenly reduced the plasma progesterone levels, showing that ovarian progesterone is essential throughout pregnancy. The mean number of ova shed was  $27.5 \pm 2.0$  much more than the mean of the number of ovo-implantation  $6.7 \pm 0.5$  and the mean number of litter size  $5.1 \pm 0.5$ . Furthermore, the mean number of pregnant corpore lutea  $38.5 \pm 1.8$  was significantly more than that of the ova shed. These results show that the pika possesses unique characteristics, such as multi-ovulation and natural multi-corpora lutea formation. Thus, the pika is a valuable animal model in the field of female reproductive physiology.

緒 言

ナキウサギは、ウサギ目ナキウサギ科ナキウサギ属に属する動物で、アジアおよび北米大陸の山岳地帯等に 20 種類以上が生息している。1969 年フランスにおいて、アフガニスタン中央高地に生息するナキウサギ Afghan Pika (*Ochotona rufescens rufescens*) の室内飼育、繁殖が成功し、初めて、ナキウサギの実験動物としての可能性が検討された。その結果、ナキウサギは小型、早熟で周年繁殖が可能であることに加えて、ラットや家兎など他の実験動物とは異なり、母親による流・

\* 中外製薬 安全性研究部

\*\* 東京大学名誉教授

死産仔の子食いをしないことから、催奇形性実験への有用性が示唆された[1-2]。1974 年、日本に導入され、現在に至るまで、実験動物としての有用性が検討されている[3-7]。しかしながら、大半が催奇形性や、疾患モデルとしての研究に主眼がおかれており、この動物の生殖機構についての研究はほとんど行われてきていない。本研究ではメスにおける排卵と妊娠に関する実験を中心としてナキウサギの生殖機能の特色を追究し、生殖生理学における新しい実験動物としての有用性を検討した。

## 材料と方法

### 動物

実験動物中央研究所（川崎）より入手、またはそれらを当研究室で継代繁殖した未経産の成熟メス（3-7ヶ月齢）116 匹および交配用の成熟オス（3-7ヶ月齢）15 匹を実験に用いた。動物は、 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、人工照明下（14 時間明期：10 時間暗期、5：00 点灯）において、ラット用プラスチックケージに個別に飼育し、ナキウサギ専用飼料（CLER-117 日本クレア 東京）と水道水を自由摂取させた。

### 交配

メスをオスのケージに入れ、交尾行動（メスの lordsis とオスの intromission）を確認した後、1 時間以上同居させた。同居後、5 分以内に交配が確認できなかつたときには、オスを他の個体に交換し再度交配を試みた。例外的に 3 度交配を試みても交配が確認できなかつたメスは実験より除外した。交配後経時的に体重測定と採血を行った。

### 採卵

交配後、10-12、18、22、28 時間および 96 時間において、動物をエーテル（日本薬局方 麻醉用エーテル 昭和製薬）過剰麻醉により死亡させ、卵管を摘出、生理食塩水で灌流を行い、卵を回収した。交配後 96 時間の実験においては、卵管に加えて、子宮についても生理食塩水による灌流を行い卵を回収した。回収した卵は、直ちに実体顕微鏡にて採卵数を算定し、さらに卵の形態と発達段階を観察した。

### 卵巣除去

妊娠各期において、エーテル麻醉下で、正中切開法により開腹し、子宮の形態、胎児数、着床痕を観察したのち、卵巣動静脈を結紮、卵巣のみを摘出した。腹部を縫合し、覚醒の後、動物をケージに戻した。卵巣除去手術を受けた動物は、手術後 4 日または 6 日後に、また、流産や分娩死がおこった場合は直ちに剖検を行い、子宮の形態、胎児数、着床痕を観察した。

## 卵巣組織検査

採卵、卵巣除去に用いた卵巣の一部は、ホルマリン固定、パラフィン包埋後、6 $\mu$ mの連続切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色を施した。30 $\mu$ mおきの切片を顕微鏡用スクリンに拡大、組織像をトレースし、それらの組織像を重ね合わせて、卵巣に存在する全ての破裂（排卵）卵胞数、未破裂（未排卵）大胞状卵胞（直径400 $\mu$ m以上）数、黄体数を算定した。

## 採血

動物をエーテル麻酔し、ヘパリナイズした注射器を用いて心臓穿刺にて0.6mlの血液を採取した。血液は直ちに3000rpm、10分間、遠心後、血漿を分離、ホルモン測定時まで-20℃で保存した。

## ホルモン測定

血漿をジエチルエーテルで2回抽出後、プロジェステロンに特異的な抗体[8]を用いた Radio immuno assay によりプロジェステロン濃度を測定した。

## 統計処理

数値は原則として平均値±標準誤差で表した。数値間の差の有意性は Student's t-test により検定し、危険率が5%未満のとき有意であると評価した。

# 結 果

## 交配後の妊娠経過と血中プロジェステロンレベル

任意の時間における雌雄の同居によってほとんど交配が成立した。さらに交配日を妊娠0日として分娩日までを妊娠日数とすると、妊娠期間は26.5±0.5日であった。このように交配成立から分娩までの日数がほぼ斉一であること、さらには後述するように交配後一定時刻に排卵が起こることから、ナキウサギは、人工照明下（14時間明期：10時間暗期）において、連続発情、交尾排卵を示す動物であることが強く示唆された。また産仔数は5.1±0.5であり、剖検または卵巣除去時に観察された着床数6.7±0.5より有意に少なかった（表1）。したがって、着床後に胎仔の

表1. ナキウサギの着床数、産仔数

着床数	産仔数
6.7±0.5 (31)	5.1±0.5* (48)

( ) 内は例数 \*p<0.05

一部が損耗することが示唆された。妊娠における体重増加は妊娠 8 日より顕著となり分娩前日まで増加した (図 1)。また血中プロゲステロンレベルは、妊娠 4 日には有意 ( $P < 0.05$ ) に上昇を始め、妊娠 10 日から 20 日までゆるやかな上昇傾向を示した後、22 日を頂値として以後は減少に転じた。さらに分娩直後において、血中プロゲステロンレベルは、基底値付近まで急激に減少した (図 2)。

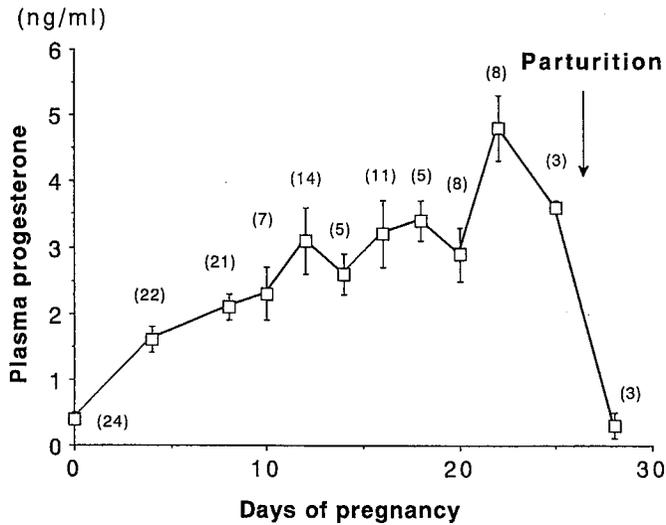


図 1. ナキウサギの妊娠期間における増体重の変化  
[平均値±標準誤差], ( ) は例数

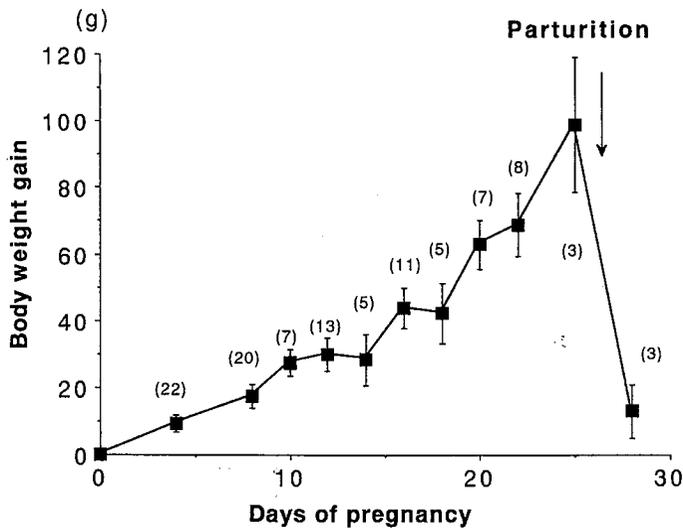


図 2. ナキウサギの妊娠期間における血中プロゲステロンレベルの変化  
[平均値±標準誤差], ( ) は例数

## 卵巣摘出の妊娠への影響

妊娠の成立・維持における卵巣の役割を検討するため、妊娠各期における卵巣摘出を行った。その結果、着床前、妊娠4日での卵巣除去においては、着床が起こらず妊娠が成立しなかった。さらに、妊娠10日の1例、その後の妊娠中期、および後期の卵巣除去においては、卵巣摘出後、数日以内に、流産、死産または母親の分娩死がおり、妊娠を正常に維持した例はなかった(表2)。また、これらの卵巣除去後における動物の血中プロゲステロンレベルは、測定感度以下 (< 0.05ng/ml) まで急速に低下した。

表2. 妊娠各期における卵巣摘出の影響

卵巣摘出時期	例数	転帰 (動物数)
初期 (4-10日)	4	未着床 (3) 流産 (1)
中期 (14-18日)	3	流産 (3)
後期 (22日)	7	流産 (1) 死産 (2) 分娩死 (4)

## 排卵経過および排卵数

交尾後の周排卵期における卵管からの採卵の結果(表3)より、排卵は交配後10-12時間に始まり、交配後18時間の採卵数は、交配後22-28時間の採卵数と同等であった。しかし、交配後18時間の卵巣組織においては、なお排卵途上の卵胞が認められた(図3)。しかしながら、交配後22時間以降の卵巣組織にはこのような排卵途上の卵は認められなかったことから、交配後22時間には排卵が終了すると推定され、交配後22-28時間の採卵数を排卵完了後における採卵数とした。排卵完了後における採卵数は $27.7 \pm 2.0$ 個におよび、産仔数の $5.1 \pm 0.5$ に比べはるかに大きな値となることが注目された ( $p < 0.001$ )。また交配後28時間における卵巣には、ほぼ採卵数に見合う数の排卵卵胞が認められた(表4)。また、これらの卵巣を含めて交配後18時間以降の卵巣には、退行した卵を含み、卵胞壁の細胞層が肥厚し黄体化の兆候を示す未排卵の大卵胞が相当数観察された(図3, 表4)。

表3. 交配後の時間経過による採卵数の変化

交配後経過時間 (時間)	排卵動物率 排卵動物数/例数 (%)	回収卵数 / 動物
10-12	2/5 (40)	$0.4 \pm 0.3$
14	3/3 (100)	$3.3 \pm 1.9$
18	6/6 (100)	$28.5 \pm 3.5$
22	3/3 (100)	$27.7 \pm 2.0$
24	3/3 (100)	
28	14/14 (100)	

表4. 交配後28時間における卵巢の排卵卵胞数, 未排卵大卵胞数

例数	排卵卵胞数	未排卵大卵胞数	排卵卵胞数 + 未排卵大卵胞数
3	25.3±2.7	10.6±1.9	36.0±2.3

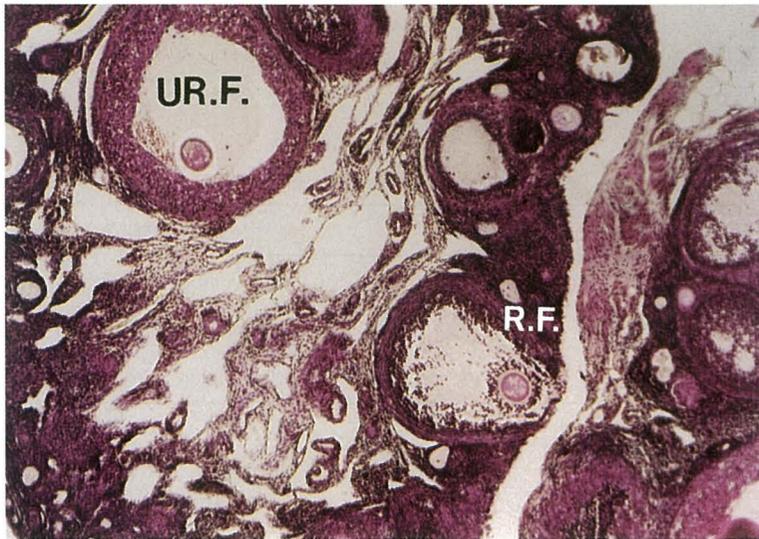


図3. 交配後18時間の卵巢組織像(×41 H-E染色)右下に排卵中の卵胞(R.F.), 右上に退行した卵を含み, 卵胞壁に黄体化の兆候のある未破裂卵胞(UR.F)が存在する.



図4. 妊娠18日の卵巢組織像(×23 H-E染色) この組織に20個の妊娠黄体(C.L.)が存在する.

## 卵の発達

交配後 28 時間の卵においては、第二極体を放出した卵が 16.1%，すでに二細胞期に達した卵が 54.0%存在した（表 5）。また、交配後 96 時間の採卵においては、採卵数は、1 個体あたり平均 20 個と減少したが、21.7%が形態的に健全な桑実胚，68.3%が形態的に健全な胚盤胞であった（表 6）。

表 5. 交配後 28 時間における卵の形態

採卵数	動物数	1 細胞期+1 極体	1 細胞期+2 極体	2 細胞期	変性卵
385	14	93 (24.2%)	62 (16.1%)	208 (54.0%)	22 (5.7%)

表 6. 交配後 96 時間における卵の形態

採卵数	動物数	桑実胚	胚盤胞	変性卵
60	3	13 (21.7%)	41 (68.3%)	6 (10.0%)

## 妊娠黄体数

妊娠黄体数は妊娠の初期，中期，後期における黄体数には，有意差を認めなかった。（表 7）。したがって，排卵に伴って導入される黄体が妊娠全期間を通じて存続されることが推定された。妊娠各期の全ての例の妊娠黄体数は， $38.5 \pm 1.8$  個であり，交配後 22-28 時間の採卵数の平均  $27.7 \pm 2.0$  個（表 3）および交配後 28 時間で卵巣の排卵卵胞数  $25.3 \pm 2.7$  個（表 4）に比べて有意（それぞれ  $p < 0.01$ ， $p < 0.05$ ）に高い値であった。またこの妊娠黄体数は，交配後 28 時間で卵巣の排卵卵胞数と未排卵大卵胞数との和  $36.0 \pm 2.3$ （表 4）と有意差を認めなかった。交配後 18 時間以降における未排卵卵胞の大部分は前述の如く卵胞壁が肥厚し黄体化の兆候（図 4）があり，排卵卵胞に加えてこれらの未排卵卵胞が妊娠黄体となった可能性が示唆された。

表 7. 妊娠各期の卵巣に存在する黄体数

初期 4-12 日	中期 14-18 日	後期 22 日	妊娠全期間
$36.8 \pm 1.8$ (8)	$34.5 \pm 2.6$ (6)	$44.2 \pm 4.26$ (6)	$38.5 \pm 1.8$ (20)

( ) 内は例数

## 考 察

本研究によって、ナキウサギは、産仔数、着床数の約 4-5 倍もの約 30 個近くの卵が自発的に排卵され（生理的過排卵）さらに、排卵数を上回る数の黄体を妊娠期間に導入する（生理的過剰黄体形成）するという極めて特異な性質を有する動物であることが明らかとなった。このように自発的な過排卵を示す動物は非常に珍しく、わずかに野生動物において、食虫類のイワハネジネズミやチンチラ科のビスカチアで報告されているのみ[9]で、家畜や実験動物においては未だその例をみない。

一般に哺乳類では、卵巣に多数存在するの小卵胞のごく一部が性周期ごとに急速に発育を開始する。しかしながら、その大部分も発育途中で退行し、その種の産仔数に見合った排卵数に相当する卵胞のみが選抜され、最終的に排卵に至る。多数の卵を得るために、FSH あるいは eCG 等の FSH 作用を持つホルモンを用いてこのような卵胞の選抜機序を解除し、発育途上で閉鎖する卵胞の一部を rescue し、人工的な過剰排卵をおこさせることは家畜、実験動物で広く行われている。いわゆる過排卵誘起である。ナキウサギは、まさにこの過剰排卵を自然におこす動物であり、特に哺乳類の卵胞発達から排卵過程における排卵数の決定機序の追究において貴重な実験モデルとなることが示唆される。

また、ナキウサギの過剰排卵、過剰黄体形成の生理的意義についても興味深い課題である。一つの可能性は卵の損耗の予備としての過剰排卵が考えられる。しかしながら、交配後 28 時間において、第二極体の放出と 2 細胞期への発達を受精の指標とすれば、採卵数の約 70%が、少なくとも受精したと考えられた。さらには交尾後 96 時間で回収された卵の 90%が少なくとも健全な胚盤胞や桑実胚まで発達し、これらはなお着床数を大きく上回った。したがって、着床期までの卵の損耗の予備としての過剰排卵の意義は少ないと考えられる。しかしながら、より早く発達した卵が優先的に着床し、そこで選抜がなされることも考えられる。もう一つの可能性は、プロジェステロンの供給源としての過剰黄体形成の意義である。哺乳類の妊娠の維持・成立にはプロジェステロンが必須である。プロジェステロンの供給源は、妊娠初期は、総じて排卵卵胞が変化した黄体であるが、ヒトなどのように途中から胎盤が主なプロジェステロンの供給源となる動物も存在する。またはウマは、妊娠中に胎盤から分泌される eCG によって卵胞発育を誘起し、その後いわゆる副黄体を形成し、プロジェステロン供給の補強を図る。またブタ、家兔のように妊娠の全期間を通じて卵巣の排卵卵胞より形成された黄体由来のプロジェステロンが必要な種も存在する。本研究での、妊娠期間におけるプロジェステロンレベルの動態、および卵巣摘出実験の結果より、ナキウサギにおいても他の哺乳類と同様に妊娠の成立・維持にはプロジェステロンが必須であった。またプロジェステロンの供給源は妊娠全期間を通じて卵巣であることが示された。ところで、ナキウサギにおいて全妊娠期間を通して存在する黄体数は、排卵数、排卵卵胞数より有

意に多く、排卵時の卵巣に存在した未配卵大卵胞も黄体化する可能性が考えられた。過剰に排卵した卵胞が黄体になることのみでもすでに過剰な黄体形成であるが、さらにそれを上回る黄体の形成は、プロゲステロンの供給源としての過剰黄体形成の意義を示唆しているのかもしれない。ナキウサギの生理的な過剰排卵および過剰黄体形成の生理的意義の解明についてはさらなる検討が必要とされる。

## 要 約

実験動物化が進められているナキウサギ (*Ochotona rufescens rufescens*) のメスの生殖機能について検討した。ナキウサギは実験室条件で連続発情、交尾排卵であり、妊娠期間は  $26.5 \pm 0.5$  日であった。妊娠期間中の血中プロゲステロン濃度は、妊娠 4 日より上昇し、妊娠 22 日に頂値となり、分娩後、急激に基底値レベルまで低下した。妊娠各期における卵巣除去によって、血中プロゲステロンの急激な低下とそれともなう着床不全、流産、死産または分娩死をおこし、ナキウサギの妊娠の成立、維持には卵巣由来のプロゲステロンが必須であることが明らかとなった。交尾後 22-28 時間においての排卵数は  $27.7 \pm 2.0$  個であり、この動物の着床数  $6.7 \pm 0.5$ 、産仔数  $5.1 \pm 0.5$  に比べてはるかに多かった。妊娠黄体数は  $38.5 \pm 1.8$  個で、さらに排卵数よりも有意に多かった。

以上の結果より、ナキウサギは、自然の過剰排卵および自然の過剰黄体形成という極めて特異的な特徴をもつ実験動物であることが明らかとなり、生殖生理学分野において貴重な実験モデルとなることが示唆された。

## 文 献

- 1) Puget A: The Afghan pika (*Ochotona rufescens rufescens*) : a new laboratory animal. Lab Animal Sci 23: 248-251(1973)
- 2) Puget A: *Ochotona rufescens rufescens* in captivity : reproduction and behaviour. J Insti Animal Tech 24: 17-25(1973)
- 3) 松崎哲也, 齊藤宗雄, 山中聖敬, 江崎孝三郎, 野村達次 : 実験動物としてのナキウサギ(*Ochotona rufescens rufescens*)の室内飼育および繁殖. 実験動物 29: 165-170 (1980)
- 4) Nishimura H, Shiota K, Uwabe C, Nomura T: Joint study on the teratogenic sensitivity of the pika (*Ochotona rufescens rufescens*) to Selected drugs. Exp Anim 35: 387-408 (1985)
- 5) Kodama Y, Sakai T, Naito K, Horiuchi S: Experimental Stomach-ulcer on Pika. Exp Anim 39: 35-41 (1990)
- 6) Kodama Y, Sakai T, Naito K, Horiuchi S: Biological feature of the skin of the pika *Ochotona rufescens rufescens* - concentration of histamine in the skin -. Exp Anim 39: 401-406 (1990)
- 7) Lao ZW, Othman T, Piad JNC, Cao Y: Anatomical and neurochemical peculiarities of the pika retina : basis for lack of circadian rhythm of core temperature. A Neurosci Lett 259: 13-16 (1999)

- 8) Takahashi M, Murakami M, Naito H, Suzuki Y: Blockade of pseudopregnancy in the rat by treatment in the antiprogestosterone serum. *Biol Reprod* 22: 423-428 (1980)
- 9) Amuroso EC, Perry JS: Ovarian activity during gestation. : In *The ovary Vol. II* (eds Zukerman L, Wein BJ) pp316-398 Academic press New York (1977)