性周期に伴う雌ヒツジの排尿行動とそれに対する 雄ヒツジの匂い嗅ぎ行動

小田切 敬子

(財)平岡環境科学研究所, 川崎市 215

(1996年10月2日受理)

緒 言

繁殖期における雌ヒツジの排尿行動は、雌自身の性的許容状態を雄に伝える重要な役割を果たしている。そして、雄は雌の尿の匂いを嗅ぐことによって雌の発情の度合を確かめていると考えられる。匂い嗅ぎ行動には、鼻つけ行動とフレーメンの2種類があるが、このうち尿に対して多く発現する行動として、フレーメンがよく知られている。雄ヒツジのフレーメンの発現頻度は、雌の性周期に伴って変動し、発情期に最も高頻度に発現する¹⁾。しかしながら、BLISSITら^{2,3)}は、雄ヒツジは必ずしもフレーメンによって雌の発情期と非発情期の尿を区別しているとは限らないと論じた。一方、雌の排尿行動は発情期に頻発するといわれてきた⁴⁾。しかしながら、雌ヒツジの排尿行動は発情期よりもむしろ非発情期に多く発現するという報告⁵⁾もあり、未だ不明確である。そこで、本研究では性周期に伴う雌ヒツジの排尿回数と雌の尿に対する雄の匂い嗅ぎ行動の発現回数について観察をした。さらに実験的研究として、雌の尿の噴霧に対する雄の反応を調べた。

材料および方法

(1) 行動観察

① 供試ヒツジおよび飼養管理

コリデール系の雑種雄2頭(年齢;2,7才,体重;56,90kg)と雌5頭(年齢;2~4才,体重;27~42kg)を用いた。飼育は、一隅にシエルター

が設置してある屋外パドック(4×8m)において行った。飼料はNRC飼養標準⁶⁾に準拠して、生草、ハイキューブおよび濃厚飼料を1日2回与え、水および固型塩は自由摂取できるようにした。夜間照明(40w)は60ルクスを基準に自動点灯および消灯するように蛍光灯を設置した。

② 行動の記録と解析

雌雄をペアリングさせ、5組についての行動を観察した。期間はそれぞれ、1994年8月20~9月1日、9月3日~9月17日、9月25日~10月10日、10月17日~11月3日、11月4日~11月18日であった。ペアリングは、血中プロゲステロンの定性判定によって雌の黄体期初期を確認してから開始した^{7,8)}。雌の発情が終わって黄体期が回復するまでのすべての行動をビデオ撮影し、雌の排尿行動、雄の乗駕行動、鼻つけ行動、フレーメン行動について記録した。雌ヒツジが腰を低く下げる姿勢を排尿行動とみなした。

乗駕行動が初めて発現した日を0日とし、-9日から5日まで、上記の4行動について解析した。-9日から5日までの行動の回数を24時間ごとに集計した。そして、5ペアについてのそれぞれの発現回数を平均した。また、雌の排尿行動、雄の鼻つけ行動およびフレーメン行動の性周期に伴う変動については一要因の分散分析を行った。また、性周期に伴う上記3行動の発現回数については、対応のある平均値の差の検定を行った。

(2) 尿に対する反応試験

① 供試ヒツジおよび飼養管理

Jpn. J. Sheep Sci., 33: 11-16, 1996

The relationship between a ram's sniffing and a ewe's urinating behavior during estrous cycle.

Keiko ODAGIRI

The Hiraoka Environmental Science Laboratory, Kawasaki-shi 215

採尿には、前述の行動観察期間中にペアリングを行った雌ヒツジ5頭を使用した。これらの尿に対する反応試験にはコリデル系雑種雄ヒツジ(1~7才)9頭を使用した。雄ヒツジは行動観察のためのパドックから視覚および嗅覚的情報を遮断された実験場(ビニールハウス、5×3.5×15m、色;緑)において飼育された。NRC 飼養標準に準拠して生草、ヘイキューブおよび濃厚飼料を1日2回与えた。水は常置した。

② 反応試験とフレーメン判定

ペアリング期間中、毎日雌ヒツジの尿を採取した。午前6時に雌ヒツジの外陰部下方にプラスチックケースを装着し、排尿時にケースの中に尿が入る方法で採取した。プラスチックケースは午前7時に回収した。

採取した尿(10~25 cc)は速やかに小型噴霧器に入れ替え(2~3 cc)、雄ヒツジの鼻孔に2~3回噴霧して反応試験を行った。そして、噴霧直後にフレーメンが起こったかどうかを記録した。判定は-、±、+の3段階とした。噴霧時に、無反応の場合は-、少し口をあけて鼻をかすかに震わせた場合は±、頸をのばして上唇を大きく巻上げ、明らかなフレーメン反応を示した場合を+と判定した(Fig. 1)。-9日から8日までについてのフレーメン判定について集計した。

結 果

(1) 行動観察

性周期に伴う雌の排尿、雄の乗駕、フレーメン、鼻つけ行動の変動をFig. 2に示した。乗駕行動は0日から2日の3日間発現し、0日に全体の50%、1日に48%発現した。排尿回数は性周期に伴って

有意に変動した [$F(14, 60) = 1.86, P < 0.01$]。また、排尿回数は-1日から急激に増加し始め、0日において他のどの日より有意に多く発現した(t検定: $p < 0.05$)。その後、1日には排尿回数は急激に減少し、2日以降は-2日以前の回数に戻った。

尿に対するフレーメンは雌の排尿回数と同様の発現パターンを示し、-1日から増加し、0日に最も多く発現した。そして、排尿回数と同様に1日には減少し、その後、低値を示した。雌ヒツジの性周期に伴う排尿と雄のフレーメン回数との間には有意な正の相関関係が認められた ($r = 0.98, p < 0.001$)。また、排尿行動に対してフレーメンが発現する割合は、観察期間を通して平均37%(29~47%)であった。

尿に対する鼻つけ行動の回数は、-1日(平均±標準誤差、 9.6 ± 4.6)と0日(8.2 ± 2.0)において

Fig. 2. Relationship between mounting, urinating and sniffing behavior. Sniffing behavior was divided between flehmen and nosing. Column bar represents S.E.

Fig. 1. Qualitative judgments of flehmen response.

- : Flehmen doesn't occur. ± : Lips open a little.

+ : Lips curl to contact the nostril.

多く発現する傾向が見られた。また、排尿回数に対する鼻つけ行動の割合は、-1日(42%)において他の日(平均24%)よりも高い傾向がみられた。性周期に伴う鼻つけの発現回数はフレイメンより有意に少なかった($p<0.005$)。また、2者の発現回数の間には有意な正の相関関係が認められた($r=0.84$, $p<0.001$)。雌の排尿行動と雄の鼻つけ行動との間にも同様に有意な正の相関関係が認められた($r=0.89$, $p<0.001$)。

(2) 反応試験

5頭の雌の尿に対する9頭(No. 1~No. 9)の雄のフレイメン反応の結果をTable 1に示した。性周期を発情休止期、発情前期、発情期とに分け、それぞれのステージで発現するフレイメン反応に

Table 1. Frequency and % of donor rams' flehmen responses on three estrus stages

	- (%)	± (%)	+ (%)	Total
Anestrus	232 (59)	16 (4)	148 (37)	396
Pro-estrus	19 (53)	4 (11)	13 (36)	36
Estrus	61 (59)	8 (8)	35 (33)	104

anestrus: day -9 to day -2 and day 3 to day 5, pro-estrus: day -1, estrus: day 0 to day 2

ついて、±、+の3段階評価を行った結果、これら3段階の発現割合はそれぞれのステージ間においても差は認められなかった。また、3種類のどの発情ステージにおいても、約40% (41~47%)の割合でフレイメン反応(±、+)が認められた。

次に、5頭の雌ヒツジの尿に対する9頭の雄それぞれにおけるフレイメン反応の発現回数と割合を調べた(Table 2)。最も年齢の高いNo. 1が最も高い割合で+反応を示した。フレイメンの-反応が50%以上だった個体はNo. 2(5才)、No. 3(3才)、No. 4(2才)およびNo. 8(1才)であった。また、±反応の発現は少なく、9頭における±反応の発現割合は平均6%であった。また、No. 3(3才)、No. 8(1才)およびNo. 9(1才)の個体は±反応を全く示さなかった。

考 察

本研究においては、個体の行動を持続的に追跡する連続記録法を用いた⁹⁾。そして、5頭の雌のそれぞれの性周期におけるすべての行動を記録し、24時間ごとに集計した。その結果、5頭の雌ヒツジにおいて発情前日から頻尿となり、発情初日に排尿回数は最も多くなることが明らかとなった。従って、雌の排尿回数は性周期を把握するための指標になると考えられた。しかしながら、BLAND and JUBILAN¹⁰⁾は、雌ヒツジの排尿回数は発情初日に最も少なくなると報告した。また、STEVENS

Table 2. Number and % of nine rams' flehmen responses

Ram. No.	Age (year)	Judgements						Total
		—		±		+		
		Times	%	Times	%	Times	%	
No. 1	7	13	24	3	6	38	70	54
No. 2	5	20	71	1	4	7	25	28
No. 3	3	68	87	0	0	10	13	78
No. 4	2	67	79	2	2	16	19	85
No. 5	2	40	49	6	7	36	44	82
No. 6	2	26	37	4	6	40	57	70
No. 7	1	30	38	16	21	32	41	78
No. 8	1	35	69	0	0	16	31	51
No. 9	1	4	40	0	0	6	60	10
Total	—	303	57	32	6	201	38	536

ら⁵⁾は、非発情の雌ヒツジは発情中の雌ヒツジよりも頻回に排尿すると報告した。これらの研究は、発情前日から頻尿となり、発情初日に排尿回数は最も多くなった我々の研究結果とは異なった。これは、我々の観察方法が連続記録法を用いた長時間の観察であるのに対して、彼らの研究方法は観察時間が5分間と短かったり、性周期に伴う個体毎の排尿回数を調べたものではなかったためと考えられた。排尿行動における個体差や日内変動を考慮して、記録は個体別に長期間にわたって持続的にとることが必須であると考えられる。

また、雌ヒツジの排尿回数と雄ヒツジのフレイメンの発現回数の変動には密接な関係が認められ、性周期を通して排尿行動の約37%に対してフレイメンが発現した。また、雌ヒツジの排尿回数が発情初日にピークを示すことから、雌ヒツジはコミュニケーションの媒体として尿を利用し、排尿行動によって自らの繁殖に係わる生理的情報を雄に提供していると考えられた。そして、雄は雌からのメッセージを匂い嗅ぎ行動によって常に一定の割合で受け取っていると考えられる。

また、雌ヒツジから視覚的および嗅覚的に隔離された9頭の雄による雌の尿に対する反応試験において、フレイメン反応(+)、(±)は非発情期から発情期にわたってほぼ一定の割合(平均43%)で発現した。これは、前述の性周期にともなうフレイメンの観察における発現割合(37%)と差は認められなかった。これらのことより、雄のフレイメン行動は雌の性周期のステージに関係なく常に一定の割合で起こっていることが示唆された。

また、本研究においてはフレイメンの発現と年齢との間には関連はみられず、若い雄よりも成熟した雄の方が頻度高くフレイメン行動を示すというVICTOR¹¹⁾の研究とは異なった。もし、フレイメンが雌の発情を認知する役割をもっているのであれば、雄の繁殖戦略としては若い個体より成熟した雄においてフレイメンを頻回に行うことが有利であると考えられる。しかしながら、フレイメン行動の役割が単に尿の匂いを嗅ぐだけであるのならば、鋤鼻器が正確に機能する個体は年齢に関係なくフレイメンが発現することは予想される。実際にDONCHINら¹²⁾は1週令未満のヒツジにフレイメン行動を誘発させている。

フレイメン行動は鋤鼻器への匂いの取り込みを助長したり、さらに鼻口蓋管を通して口腔内に匂いを取り込む役割を果たしていると言われている¹²⁻¹⁴⁾。フレイメン行動によって鋤鼻器を経由する匂い情報は副嗅球で中継された後、脳の認識中枢ではなく本能的な行動を支配している視床下部へ送られる。この嗅覚経路を副嗅覚系という¹⁵⁾。

他方、鼻腔粘膜の嗅上皮で受容される匂いは、主嗅球で中継されて大脳辺縁系に送られ、より判断力を伴う反応を引き起こす。この嗅覚経路を主嗅覚系という¹⁵⁾。このように、嗅覚系には副嗅覚系と主嗅覚系の2種類が存在し、それぞれお互いに機能を分担している¹⁶⁻¹⁹⁾。

マウスにおける匂いの識別能は主嗅覚系が無傷であれば、鋤鼻器あるいは副嗅球を破壊しても阻害されないといわれている^{14, 20, 21)}。また、ヒツジにおいても発情と非発情の識別は主嗅覚系によってなされているとBLISSITTら³⁾は論じた。

本研究におけるフレイメンの発現割合は、雌の排尿回数に相関しており、雌の発情ステージによって変動しなかった。一方、鼻つけは雌の排尿回数と相関はしたものの、発情前日に最も多く発現し、発情が開始すると減少する傾向がみられた。これは、発情開始前には雄ヒツジが雌の発情を知るために尿を頻回に嗅ぎ、尿中の匂いの変化を調べていると考えられる。発情が開始すると鼻つけが減少したのは、雄が一旦発情を確認したのならば、もはや頻回に尿の匂いをかぐ必要がないからであろう。つまり発情と非発情の匂いの区別はフレイメンによって行われるのではなく、鼻つけ行動によって行われると考えられる。もし、鼻つけ行動が主嗅覚系由来の行動であるならば、上記の考えは雄ヒツジがフレイメンによって発情と非発情の尿を区別しないというBLISSITTら³⁾の意見を支持する。

今後は、フレイメンおよび鼻つけが発現している時の嗅覚神経細胞の変化、あるいは、副嗅覚系あるいは主嗅覚系を阻害した時の行動の観察といった実験的研究が必要となるであろう。

要 約

性周期に伴う雌ヒツジの排尿回数と、その尿に対する雄ヒツジの匂い嗅ぎ行動および乗駕行動と

の関係について検討した。乗駕行動が発現した初日を0日とし、-9日から5日までの雌雄の行動を全てVTRで録画し、これらについて連続記録法で解析した。その結果、雌ヒツジの排尿は-1日から増加し、0日に他のどの日よりも有意に多く発現した ($P<0.05$)。フレーメンは排尿と同様の発現パターンを示し、雌の尿に対して一定の割合 (37%) で発現した。一方、鼻つけの発現回数はフレーメンおよび排尿回数と有意な正の相関 ($p<0.001$) を示したが、発現のピークは-1日であった。次に、行動観察期間中に採取された雌の尿を、雌ヒツジから隔離された雄に人為的に噴霧した時のフレーメン反応について調べた。その結果、発情期と非発情期の雌の尿に対する雄のフレーメンの発現割合には差は認められなかった。

以上より、雌ヒツジの排尿行動は性周期を把握する指標となることが示唆された。また、フレーメンは雌の尿を常に一定の割合で探査しており、発情期と非発情期の識別は鼻つけによって行われていることが示唆された。

謝 辞

本研究は茨城大学においてなされたものです。研究支援をしていただきました茨城大学・増殖管理学研究室、松沢安夫教授ならびに柘野通子氏、北川哲也氏、藤谷明憲氏ら学生諸氏に対して深謝いたします。

文 献

- 1) ODAGIRI, K., H. MARUMO, Y. MATSUZAWA and Y. YOSHIKAWA, Changes in serum progesterone concentration in ewes and mounting and sniffing behaviour in rams during ewes' oestrous cycle. *J. Ethol.* 1996. (in press)
- 2) BLISSIT, M.J., K.P. BLAND and D.F. COTTELL, Discrimination between the odours of fresh oestrus and non-oestrus ewe urine by rams. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, **25** : 51-59.1990 a.
- 3) BLISSITT, M.J., K.P. BLAND and D.F. COTTELL, Olfactory and vomeronasal chemoreception and the discrimination of oestrus and non-oestrus ewe urine odours by the ram. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, **27** : 325-335.1990 b.
- 4) HART, B.J., The behavior of domestic animals.

W.H. Freeman and company, New York. 1985.
(森 裕司 訳, Dr. ハートの動物行動学入門, チクサン出版社. 1995)

- 5) STEVENS, K., G.C. PERRY and S.E. LONG, Effect of ewe urine and vaginal secretions on ram investigative behaviour. *J. Chem. Ecol.*, **8** : 23-29.1982.
- 6) 吉本 正 監修 (出岡謙太郎訳), NRC 飼養標準, めん羊, 日本綿羊研究会. 1991.
- 7) 小田切敬子・丸茂契子・松沢安夫・山海 直・吉田高志, プロジェステロン定性測定用キットによる雌羊の性周期判定. 日本綿羊研究会誌. **31** : 1-4, 1994.
- 8) ODAGIRI, K. and H. MARUMO, Estrus diagnosis in ewes by using a plasma/serum progesterone enzyme immunoassay (EIA) kit. *Anim. Sci. Technol. (Jpn)*, **67** : 713-718. 1996.
- 9) 小田切敬子・松沢安夫, 子ヒツジの遊び行動における瞬間サンプリング法の適用の検討. 動物心理学研究. **43** : 9-16. 1993.
- 10) BLAND, K.P. and B.M. JUBILAN, Correlation of flehmen by male sheep with female behaviour and oestrus. *Anim. Behav.*, **35** : 735-738.1987.
- 11) VICTOR, R. Flehmen, mounting and copulation among members of a semi-wild cattle herd. *Anim. Behav.*, **31** : 641-650. 1983.
- 12) DONCHIN, G.W., G.W. De VANE and D. CATON, Metkephamid-induced flehmen in lambs. *Physiol. Behav.*, **33** : 335-337. 1983.
- 13) MELESE-D'HOSPITAL, P.Y. and B.L. HART, Vomeronasal organ cannulation in male goats: evidence for transport of fluid from oral cavity to vomeronasal organ during flehmen. *Physiol. Behav.*, **35** : 941-944. 1985.
- 14) LADEWIG, J. and B.L. HART. Flehmen and vomeronasal organ function in male goats. *Physiol. Behav.*, **24** : 1067-1071. 1980.
- 15) MEREDITH, M., Pheromones and Reproduction in Mammals. (Vandenbergh, J.G. ed.), pp 199-252, Academic Press, 1983.
- 16) KEVERNE, E.B. Olfaction and taste-dual systems for sensory processing. *Trends Neurosci.*, **1** : 32-34. 1978 a.
- 17) HRADECKY, P., R.F. SIS and W.R. KLEMM, Distribution of flehmen reactions of the bull throughout the bovine estrous cycle.

- Theriogenology*, **20** : 197-207. 1983.
- 18) KEVERNE, E.B. Olfactory cues in mammalian sexual behaviour. In *Biological Determinations of Sexual Behaviour* (Hutchinson, J. ed.), pp. 723-763. John Wiley Chichester, 1978 b.
 - 19) 梶 秀人・瀬戸勝男, 匂いの記憶と生殖内分泌, *日本生理学雑誌*, **53** : 151-168. 1991.
 - 20) LOMAS, D.E. and E.B. KEVERNE, The role of the vomeronasal organ and prolaction in the acceleration of puberty in female mice. *J. Reprod. Fert.*, **66** : 101-107. 1982.
 - 21) REYNOLD, J. and E.B. KEVERNE, The accessory olfactory system and its role in the pheromonally mediated suppression of oestrus in grouped mice. *J. Reprod. Fert.*, **57** : 31-35. 1979.

Summary

Relationship between the frequency of a ewe's urination and the sniffing and mounting behavior of a ram during estrous cycle was examined. The first day on which mounting behavior occurred was standardized as day 0. All ewe and ram behavior was recorded from day -9 to day 5 and analyzed. The frequency of urination increased from day -1, and on day 0 it occurred more than on any other day ($p < 0.05$). The frequency of flehmen showed the same pattern of urinating, and that of flehmen to ewe's urine occurred at a constancy rate (37%). On the other hand, though the number of nosings correlated with those of flehmen and urinating, the peak occurred on day -1. And also, a ewe's urine was sprayed artificially towards rams isolated from ewes and rams' flehmen responses were investigated. As a result, there were no significant differences between the rate of a ram's flehmen to a ewe's estrous urine and that of non-estrous urine. These results were demonstrated that ewe's urinating behavior became the index of the estrous cycle. Furthermore, it was suggested that flehmen behavior have a function to monitor ewes' urine constantly during estrous cycle.