雄ラットの交配使用頻度と妊孕率および着床数について

若藤靖匡・高倉元史・外尾亮治・津江本由美子・
高橋和明*・今道友則*

(財団法人動物繁殖研究所 *日本獣医畜産大学)

著者らは、これまでに多産系ラットに少数例認められる低産仔数発現の原因について検討し、雌側に要因があると考えられる問題については既に報告した¹⁻³⁾。また前報では種雄毎に交配雌の産仔数を解析し、低産仔数を示す雄ラットを発見した。この低産仔数雄ラットでは精巢の精子形成減、受精部位において受精能獲得精子数が少なく、卵に対する受精率が低いことを認め、この家系を兄妹交配によって遺伝的に維持できることを明らかにした。今回は正常雄ラットを用いて自然交配により精子数の減少あるいは未熟精子の増加を招くであろうと考えられる条件、つまり雄の交配使用頻度を高めて繁殖機能に過酷な負荷をかけた場合に低産仔数発現について検討した。

材料と方法

供試動物：成熟 SPF ウィスター今道ラットの 10~13 週齢の雌 (578 例)、16~18 週齢の雄 (118 例) を用いた。

飼育環境：供試ラットはバリエーションシステムによる飼育条件下で温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50~60%、換気回数 1 時間 13 回、人工照明 14 時間 (午前 5 時~午後 7 時) に設定した動物室で飼育した。標準配合飼料³⁾ および固型飼料 MM 2 (船橋農場製) を高圧蒸気滅菌器により 121°C 、20 分間加熱し、20 対 1 の割合で混合し不断給与した。飲水は 60 分間高圧蒸気滅菌した。飼育室の衛生管理には十分注意した。

交配条件：雄 1 匹に対し発情雌 1 匹単日交配群と連日

5 日間新たに発情した雌 1, 2, 3, 5 匹交配群を、また 3 匹交配についてはさらに連日 10 日間交配群を設けた。雄は単日交配群については 64 例、連日交配群については各群 5 例を用いた。

発情雌の選択と交配：外陰部所見において陰部の腫脹を認め、ロードーシス (雄許容姿勢反応) を示す発情前期の動物を選び、午後 5 時から翌朝 10 時まで雄 1 匹と同居させた。そして腔内の腔栓を確認するとともにケージの下に落ちた腔栓数 (射精回数数の指標とする) を調べ、次に腔内の精子の存在の有無を確認するため腔垢を採取した後、雄と分離した。

妊娠の判定：雄との同居後、8 日目 (妊娠 7 日目相当) に雌を解剖し、着床の有無と着床しているものは着床数を調べた。

処女雌の解剖：雌の自然排卵数を調べるため 10~13 週齢の成熟雌 89 例をロードーシスを示す日の翌日剖検し、輸卵管を摘出して生理食塩水を滴下した 2 枚のスライドグラスに挟み、位相差顕微鏡を用いて排卵された卵数を数えた。

雄ラットの解剖と生殖器系臓器の形態学的検査：雄の交尾と生殖器系機能との関係を調べるため 16~18 週齢の成熟雄を用い交配前 (未交配)、交配 (雄 1 対雌 1 単日) 後翌日、2 日目、3 日目、4 日目、5 日目と経日的に各 5 例の解剖を行い、精巢、精巢上体、前立腺、精囊腺、凝固腺の重量を測定した。なお、精巢と精巢上体については未交配対照、交配後翌日、2 日目の組織を鏡検した。

有意差の検定：Student の *t*-test と χ^2 検定法によった。

成 績

1) 雄 1 匹に対し発情雌 1 匹単日交配の妊孕率および着床数

交配に用いたラットは雄 64 例 雌 64 例であり、すべて妊娠 (100%) した。着床数は最小 8 個最大 19 個、平均 14.8 ± 1.7 ($\pm \text{SD}$) 個であった。最少 8 個の例はわずか 1 例 (1.6%) で、以後着床数 8 個以下を示すものを

Frequency of mating in single male rat and decrease in pregnancy rate and number of implantation sites.

WAKAFUJI, Yasumasa, Motoshi TAKAKURA, Ryouji HOKAO, Yumiko TSUEMOTO, Kazuaki W. TAKAHASHI* & Tomonori IMAMICHI* (Imamichi Institute for Animal Reproduction, Dejima-mura, Niihari-gun, Ibaraki 300-01, *Nippon Veterinary and Zootechnical College, Musashino-shi, Tokyo 180).

Japan. J. Anim. Reprod., 31 (3), 1985.

Fig. 1. Frequency distribution of number of implantations when one male was mated with one female for one day.

Fig. 2. Distribution of pregnancy rate when one male was mated with one or several female for 5 and 10 consecutive day.

低着床と定義する。そして着床数 15・16 個を頂値として一峰性の分布を示した。なおこの分布状態は自然排卵数 (89 例) の分布 (15.2 $\pm$ 2.0) と良く一致した (図 1)。また射精回数と平均腔栓数は 4.5 $\pm$ 1.8 個であった。

2) 雄 1 匹に対し連日発情雌 1, 2, 3, 5 匹交配の妊娠率および着床数

妊娠率の分布成績を図 2 に示した。

各群交配に用いた雄は 5 例で 5 日間を通じての妊娠率

は雄 1 対発情雌 1, 2, 3, 5 匹交配ではそれぞれ 88%, 54%, 43%, 28% であった。さらに発情雌 3 匹交配については 10 日間を通じての妊娠率は 41% であり, 5 日間交配の値と変わりなかった。交配 1 日目では妊娠率は発情雌 2 から 3 匹まで希に不妊を生じ若干の低下を示すに過ぎないが, 発情雌 5 匹を交配すると 60% (供試雄 5 例いずれにおいてもほぼ同様) と著しく低下した。交配 2 日目, 3 日目では妊娠率は発情雌 1 匹の場合で 80% とやや低下したが, 発情雌が複数の場合では 4~33% と

Fig. 3. Distribution of number of implantations when one male was mated with one or several female for 5 and 10 consecutive day

¹⁾ Average number of implantations male:female

* Mean ± SD

○— 1 : 1
●— 1 : 2
△— 1 : 3
◇— 1 : 5

著しい低下が認められた。また発情雌 2 匹交配の場合で 4 日目に回復の徴候が認められることもあった。なお、交配 2 日目以降に多発した不妊雌のうち（発情雌 3 匹 5 日間交配群）交配後腔内に精子を認めた例は 16/43 であった。しかし、大部分 (60%) は正常性周期を回帰した。また腔栓は交配 1 日目に 4~6 個認められたが 2 日目以降では 0~3 個と著しく減少した。

着床成績を図 3 に示した。

妊娠個体の着床数は各群交配 1 日目では大部分が正常範囲にあり低着床の個体が少数例みられたが、交配 2 日目以降では低着床の発現率が増加した。その発現率は交配 1 日目では発情雌 1, 2, 3, 5 匹交配で 0% (0/5), 11.1% (1/9), 15.4% (2/13), 6.7% (1/15) であり、2 日目以降では 25.0% (4/16), 22.2% (4/18), 27.1% (13/48), 35.0% (7/20) であった。この 2 日目以降の成績は図 1 の単日交配の低着床の発現率 1.6% (1/64) と比較してそれぞれ高い値を示し χ^2 検定により有意差が ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$) 認められた。

3) 雄ラットの解剖と生殖系臓器の形態学的検査

雄の交尾と生殖系機能との関係を調べるために、未交配（交配前）と 1 回交配させてから後翌日、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目で経日的に各 5 例を剖検した。

精巣と精巣上体の重量は 1 日の交配前後では有意差はなかった。前立腺、精囊腺、凝固腺の 3 者の重量はいず

れも交配により著しく低下した ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$) が、交配後 3~4 日目で交配前の値まで回復した。なお、精巣と精巣上体は交配による組織像の変化は認められなかった。

考 察

著者らは遺伝的雄性低産仔 1 例を発見し、継代育種中である⁴⁾。正常雄ラットでも交配使用頻度を高め繁殖機能に負荷をかければ妊娠率および着床数は当然低下すると思われる。正常雄に発情雌を単日 1 匹交配すると、妊娠率は 100%，着床数は 14.8 ± 1.7 個であった。次に、正常雄に単日（連日交配第 1 日目相当）に交配する発情雌数を増すと 2 匹、3 匹ですでに不妊が生じ妊娠率の若干の低下と着床数の低下が発現し、単日に 5 匹の発情雌を交配するとさらに妊娠率および妊娠率が低下した。しかし、着床数は正常範囲（平均 13.3 ± 2.9 ）であり雌 1 例に低着床数のものがあつたに過ぎない（図 2, 3）。恐らく正常雄は単日に多数の雌と交配しても 3 匹程度を妊娠させるのが限度ではないと思われる。

正常雄に毎日新たに発情した雌を連日交配すると発情雌 1 匹の場合は妊娠率は若干低下（88%）にとどまったが、発情雌が複数となると妊娠率は著しく低下し、特に交配 2 日目、3 日目で顕著であった。また着床数は単日交配に比べて低着床個体が増加した（図 2, 3）。この原因は種々考えられるが、マウスでは連日交配 1 日目から

5 日目まで交尾回数にほとんど差が認められない⁵⁾。今回の実験で腔栓数より推定した射精回数は交配 1 日目では 4~6 回であった。2 日目以降では雄副生殖器重量の減少などより 0~3 回となり、これが妊娠率および着床数の低下の原因と思われる。

一般にラットでは低産仔数の発現の原因は、雌側にある場合が多く、雄側では妊娠の成立可能な精子数であれば着床数は正常値を示し、精子過少症では不妊、偽妊娠となり、中間値や低着床を示すことはないとされている。これはラットで 1 回に受精部位に達する精子数は 100 個以下ということに基づいている⁶⁾。マウスでは竹島、豊田⁷⁾が人工授精の手法を用いて注入精子濃度と受胎率、産仔数の関係を調べ、注入精子数が少なくなると受胎率や産仔数の低下を招くことを実証している。ラットについては尾川、鈴木^{8,9)}は排卵前後の種々の時間に人工授精を実施し授精適期について調べ、排卵直前に最も高い受胎率 (80%) を得ることができ、それ以外では受胎率の低下を招くと報告しているが産仔数についてはふれていない。著者ら¹⁰⁾はラットで発情期の午前 6 時以降に交尾が成立する場合、産仔数が著しく低下すること、またその原因は子宮内環境が精子の上向性に不适当で、受精部位に達する有効精子数が減少することにあることを示唆した。ラットで卵管膨大部の精子数が 1 回射精の場合、多回射精にくらべ著しく少ない (未発表)。今回の成績は正常雄ラットの交配使用頻度を高めることで受精部位に達する精子数が減少したことによるものと推察される。

今後は、問題として雄ラットの交配回数を繁殖成績に支障をきたすことのないように制限し、安全性試験などの信頼性を高めるべきであろう。

要 約

正常雄ラットで交配使用頻度の増加による着床数低下について検討した。

実験群として、雄 1 匹に対し発情雌 1 匹単日交配群と連日 5 日間新たに発情した雌を 1, 2, 3, 5 匹交配群を、3 匹交配についてはさらに連日 10 日間交配群をもうけた。雌は単日交配群について 64 例、連日交配群につい

て各群 5 例を用いた。全ての雌は妊娠 7 日目にて剖検し、妊娠率および着床数を調べた。

正常雄に発情雌を単日 1 匹交配すると妊娠率は 100%, 着床数は 14.8 ± 1.7 個 (使用雄 64) であった。次に、正常雄に単日 (連日交配 1 日目相当) に交配する発情雌数を増してみると 2 匹, 3 匹では希に不妊が生じ妊娠率の若干の低下と着床数の低下が少数例みられる。さらに単日に 5 匹の発情雌を交配すると供試雌 5 匹いずれにおいてもほぼ同様に妊娠率は低下し妊娠率は 60% であった。しかし、着床数は正常範囲 (平均 13.3 ± 2.9) であった。一方、正常雄に毎日新たに発情した雌を連日交配してみると発情雌 1 匹の場合は妊娠率は若干低下 (88%) したに過ぎないが発情雌が複数 (2, 3, 5 匹) となると妊娠率は 28~54% と著しく低下した。また着床数に関してみると単日交配に比べて低着床を示す雌の発現率がきわめて多くなった。その発現率は雄 1 対雌 1 単日交配では 1.6% に過ぎなかったが連日発情雌 1, 2, 3, 5 匹交配では 25.0%, 22.2%, 27.1%, 35.0% にも認められた。

以上の結果、正常雄ラットでも発情雌を連日交配することで妊娠率および着床数の低下を引き起こすことが明らかになった。
(1985. 4. 8 受付)

文 献

- 1) 若藤 (靖)・今道 (友): 本誌, 28, 36, 1982.
- 2) 若藤 (靖)・外尾 (亮)・高橋 (和): 本誌, 28, 145, 1982.
- 3) 若藤 (靖)・外尾 (亮)・天尾 (弘)・高橋 (和)・今道 (友): 実験動物, 33, 156, 1984.
- 4) 若藤 (靖)・外尾 (亮)・黄 (坤)・高倉 (元)・高橋 (和)・今道 (友): 本誌, 30, 140, 1984.
- 5) 高橋 (和)・齊藤 (徹)・鈴木 (通)・天尾 (弘)・外尾 (亮)・若藤 (靖): 実験動物技術, 19, 28, 1984.
- 6) BRADEN, AWH & CR AUSTIN: *Aust. J. Biol. Sci.*, 7, 543, 1954.
- 7) 竹島 (勉)・豊田 (祐): 実験動物, 26, 317, 1977.
- 8) 尾川 (昭)・鈴木 (善): 本誌, 1, 67, 1955.
- 9) 尾川 (昭)・鈴木 (善): 本誌, 3, 78, 1957.
- 10) 外尾 (亮)・若藤 (靖)・高倉 (元)・高橋 (和)・今道 (友): 本誌, 29, 43, 1983.

Summary

Decrease in reproductive performance in male rats by frequent mating was investigated under various male to female ratio and different diucepion of cohabitation. Major parameters for assessment were incidence of pregnancy, number of implantation site in the female, and weight and histology of the reproductive organs in the male.

In case of one day pairmating, fertility was close to 100% and number of implantation was 14.8 ± 1.7 (mean $\pm$ sd). By replacing the female partner every day for five consecutive day, or by prolonged polygamy, the values decreased significantly.

It is clear that when a single male rat was tempted to mate frequently, his reproductive performance is impaired quickly and, even in vivid sire, 4-5 days of rest is required for recovery. This admonishes that mating schedule in rats should be regulated for assessment of drug effects for reproduction.